

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl

Etablierung der „Reflected Light Oblique
Transillumination“-Mikroskopie zur Analyse der
Leukozytenmigration *in vivo*

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

Vorgelegt von
Christian Martin Moser
aus Dachau
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. F. Krombach
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. U. Welsch Priv.-Doz. Dr. S. Ihrler
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. T. Mempel
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	20. Dezember 2007

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. EINLEITUNG	9
1.1. VORBEMERKUNG	9
1.2. LEUKOZYTENREKRUTIERUNG	10
1.2.1. <i>Hämodynamische Prinzipien</i>	10
1.2.2. <i>Adhäsionsrezeptor-vermittelte Mechanismen</i>	11
1.2.3. <i>Proteasen-vermittelte Mechanismen</i>	15
1.3. INTRAVITALMIKROSKOPIE	18
1.3.1. <i>Reflected Light Oblique Transillumination (RLOT)</i>	19
1.4. ZIELSETZUNG	20
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1. VERSUCHSTIERE	21
2.2. PRÄPARATION DES <i>MUSCULUS CREMASTER</i>	21
2.2.1. <i>Anästhesie</i>	21
2.2.2. <i>Implantation der Katheter</i>	22
2.2.3. <i>Chirurgische Präparation des Musculus cremaster</i>	23
2.3. EXPERIMENTELLE PROTOKOLLE	24
2.3.1. <i>Experimentelles Protokoll zur Etablierung der RLOT-Mikroskopie</i>	25
2.3.2. <i>Experimentelles Protokoll zur Analyse der Rolle der Serinproteinasen ELA2 und PRTN3 während der Leukozytenrekrutierung</i>	25
2.4. INTRAVITALMIKROSKOPIE	26
2.4.1. <i>Intravitale Fluoreszenzmikroskopie</i>	27
2.4.2. <i>Reflected Light Oblique Transillumination (RLOT)-Mikroskopie</i>	27
2.4.3. <i>Blutfließgeschwindigkeit</i>	29
2.5. QUANTITATIVE PARAMETER	29
2.5.1. <i>Blutbild</i>	29
2.5.2. <i>Gefäßdurchmesser, Mikrohäodynamik und Leukozytenkinetik</i>	30
2.5.2.1. <i>Off-line Analyse am Monitor</i>	30
2.5.2.2. <i>Gefäßdurchmesser</i>	30
2.5.2.3. <i>Blutfließgeschwindigkeit und Scherrate</i>	31
2.5.2.4. <i>Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen</i>	31
2.5.2.4.1. <i>Anteil rollender Leukozyten</i>	32
2.5.2.4.2. <i>Anzahl adhärenter Leukozyten</i>	32
2.5.2.5. <i>Transendothelial und interstitiell migrierende Leukozyten</i>	33
2.5.2.5.1. <i>Anzahl transendothelial migrierter Leukozyten</i>	33
2.5.2.5.2. <i>Interstitielle Migration von Leukozyten</i>	34
2.6. IMMUNHISTOLOGIE	35
2.6.1. <i>Immunhistologische Färbung der Präparate</i>	35

2.6.2. <i>Quantitative Auswertung der Histologie</i>	36
2.7. DATENVERARBEITUNG UND STATISTIK	36
2.7.1. <i>Datenverarbeitung</i>	36
2.7.2. <i>Statistik</i>	37
3. ERGEBNISSE	38
3.1. ETABLIERUNG DER REFLECTED LIGHT OBLIQUE TRANSILLUMINATION (RLOT)- MIKROSKOPIE	38
3.1.1. <i>Verbesserter Bildkontrast mittels RLOT- Mikroskopie</i>	38
3.1.2. <i>RLOT-Mikroskopie in Verbindung mit der Präparation des murinen M. cremaster</i>	40
3.1.3. <i>Quantifizierung der Leukozytenrekrutierung mittels RLOT-Mikroskopie</i>	42
3.1.3. <i>Quantifizierung der Leukozytenrekrutierung mittels RLOT-Mikroskopie</i>	43
3.1.3.1. Blutbild	43
3.1.3.2. Gefäßdurchmesser und Mikrohämodynamik	44
3.1.3.3. Anteil rollender Leukozyten	45
3.1.3.4. Anzahl adhärenter Leukozyten	46
3.1.3.5. Anzahl transendothelial migrierter Leukozyten	47
3.1.4. <i>Leukozytenrekrutierung in P-Selektin-defizienten Mäusen</i>	49
3.1.5. <i>Leukozytenrekrutierung in ICAM-1-defizienten Mäusen</i>	50
3.2. ANALYSE DER ROLLE DER SERINPROTEASEN ELA2 UND PRTN3 WÄHREND DER LEUKOZYTENREKRUTIERUNG	52
3.2.1. <i>ELA2/PRTN3-defiziente Mäuse</i>	52
3.2.1.1. Blutbild	53
3.2.1.2. Gefäßdurchmesser und Mikrohämodynamik	54
3.2.1.3. Anteil rollender Leukozyten	54
3.2.1.4. Anzahl adhärenter Leukozyten	55
3.3.1.5. Anzahl transendothelial migrierter Leukozyten	56
3.3.1.6. Interstitielle Migration von Leukozyten	57
3.3.1.7. Immunhistologische Differenzierung emigrierter Leukozyten	59
3.3.2. <i>Pharmakologische Inhibition der Serinprotease ELA2</i>	62
3.3.2.1. Blutbild	62
3.3.2.2. Gefäßdurchmesser und Mikrohämodynamik	63
3.3.2.3. Anteil rollender Leukozyten	63
3.3.2.4. Anzahl adhärenter Leukozyten	64
3.3.2.5. Anzahl transendothelial migrierter Leukozyten	65
3.3.2.6. Immunhistologische Differenzierung emigrierter Leukozyten	66
4. DISKUSSION	68
4.1. RLOT-MIKROSKOPIE	68
4.2. DIE SERINPROTEASEN ELASTASE-2 UND PROTEINASE-3	74
4.2.1. <i>Physiologische – Pathophysiologische Relevanz</i>	81
5. ZUSAMMENFASSUNG	82

6. LITERATUR	83
7. EIGENE PUBLIKATIONEN	112
8. ABSCHLIEßENDE BEMERKUNGEN	114
9. LEBENSLAUF	116

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CD	Cluster of differentiation
D	Gefäßdurchmesser
DIK	Differential-Interferenzkontrast
ELA2	Elastase-2
ESAM	Endothelial cell-selective adhesion molecule
Hb	Hämoglobin
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
ICAM-2	Intercellular adhesion molecule-2
ICAM-3	Intercellular adhesion molecule-3
IL-1 β	Interleukin-1 β
JAM-A	Junctional adhesion molecule-A
JAM-B	Junctional adhesion molecule-B
JAM-C	Junctional adhesion molecule-C
KG	Körpergewicht
LFA-1	Leukocyte function-associated antigen-1 = CD11a/CD18
M.	Musculus
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)
PLT	platelet = Thrombozyt
PMN	PMNL, polymorphonuclear leukocyte, neutrophiler Granulozyt

PRTN3	Proteinase-3
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RBC	Red blood cell = Erythrozyt
RLOT	Reflected light oblique transillumination
SEM	Standard error of the mean
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
VCAM	Vascular cell adhesion molecule-1
WBC	White blood cells = Leukozyten

1. Einleitung

1.1. Vorbemerkung

Die Existenz eines intakten Immunsystems ist eine wesentliche Voraussetzung für das Überleben eines Individuums in seiner Umwelt. Ein Organismus ist ständig Aggressionen durch Fremdorganismen wie Viren, Bakterien, Pilzen und Helminthen ausgesetzt oder muss auf primär eigenes, aber funktionsgestörtes Gewebe wie Nekrosen oder maligne Zellen reagieren. Als zentraler Träger der zellulären und humoralen Immunantwort unseres Organismus sind Leukozyten direkt verantwortlich für das individuelle Überleben. Die Reaktion unseres Körpers auf diese unterschiedlichen Bedrohungen verläuft weitgehend einförmig in Form der Entzündung.

Im Rahmen akuter Entzündungsreaktionen marginieren und adhären insbesondere neutrophile Granulozyten (PMN) am Gefäßendothel, emigrieren entgegen chemotaktischen Gradienten ins Gewebe, wo sie mittels aktiver Zelleistungen wie Phagozytose, Bildung und Freisetzung hydrolysierender Enzyme sowie freier O₂-Radikale ihre spezifischen und unspezifischen Leistungen der Infekt- und Immunabwehr entfalten. Allerdings ist der Grad zwischen protektiven Effekten der Entzündungsreaktionen und durch die überschießende Freisetzung aggressiver Enzyme und toxischer Sauerstoffmetabolite hervorgerufenen akuten und chronischen Schädigungen äußerst schmal (Heymer, 1985). So wurde bereits in den 50er und 60er Jahren eine zentrale Beteiligung neutrophiler Granulozyten an der Pathogenese von Gewebeschäden wie dem Schwartzman- und dem Arthusphänomen, der akuten Abstoßungsreaktion sowie dem akuten Lungenschaden nachgewiesen (Cochrane et al., 1965; Flick et al., 1982; Johnson und Malik, 1980; Winn et al., 1973). Um die Rolle der Leukozyten bei der Pathogenese von Gewebeschäden im Rahmen akuter und chronischer Entzündungsreaktionen zu klären, hat sich die Analyse der Interaktion von Leukozyten mit dem

Gefäßendothel und der transendothelialen Migration zu einem Schwerpunkt der Mikrozirkulationsforschung entwickelt.

1.2. Leukozytenrekrutierung

Leukozyten befinden sich, nachdem sie sich entweder im Knochenmark oder im Thymus differenziert haben, in den Blutgefäßen. Das Pathogen, der Quell der Entzündung, findet sich in einer Großzahl der Fälle im interstitiellen Gewebe. Wie gelangt der mit dem Blutstrom durch den Körper zirkulierende Leukozyt an die Quelle der Entzündungsreaktion?

1.2.1. Hämodynamische Prinzipien

Bei hohen Fließgeschwindigkeiten, wie sie in Arteriolen des systemischen Kreislaufs vorherrschen, befinden sich Leukozyten aufgrund ihrer hohen Teilchengröße annähernd in der Gefäßmitte im so genannten Zentralstrom (Harell et al., 1979; Phibbs und Dong, 1970; Vejlens, 1938). Demgegenüber werden sie bei niedrigen Fließgeschwindigkeiten, z.B. in postkapillären Venolen des großen Kreislaufs, in die Randbereiche des Gefäßquerschnittes abgedrängt (Bagge und Karlsson, 1980; Goldsmith und Spain, 1984; Nobis et al., 1985; Schmid-Schönbein et al., 1981). Diese Veränderungen der radiären Verteilung der Leukozyten im Gefäßlumen resultieren aus der scherabhängigen Aggregation der Erythrozyten. Da Erythrozytenaggregate bei niedrigen Fließgeschwindigkeiten dazu neigen, den Zentralstrom einzunehmen, werden die Leukozyten in die Randbereiche abgedrängt (Gaehtgens et al., 1985).

Zudem beobachtet man im Bereich konvergierender Verzweigungen, wie z.B. in den postkapillären Venolen, eine Abdrängung der Leukozyten in die Endothel-nahen Randbereiche. Dieser Effekt scheint durch die Interaktion der aus den zuführenden Gefäßen

einfließenden Erythrozyten mit den Leukozyten (Bagge et al., 1983; Bagge und Karlsson, 1980; Blixt et al., 1985; Chien et al., 1984; Schmid-Schönbein et al., 1980) und die spezifischen Flussbedingungen mikrovaskulärer Konvergenzen bedingt zu sein (Blixt et al., 1985). Die in den Gefäßrandbereich verdrängten Leukozyten haben aufgrund des abgestumpft parabolischen Geschwindigkeitsprofils (Caro et al., 1978, Gaehtgens et al., 1985, McDonald, 1974; Schmid-Schönbein et al., 1975) innerhalb des Gefäßes eine deutlich niedrigere Fließgeschwindigkeit verglichen mit der Blutströmungsgeschwindigkeit im Zentralstrom. Ihre gegenüber dem Blutvolumen verzögerte Passage durch die Mikrozirkulation führt zu einer deutlich erhöhten Kontaktzeit mit dem Endothel.

1.2.2. Adhäsionsrezeptor-vermittelte Mechanismen

1867 beobachtete Cohnheim (Cohnheim, 1867) mittels Intravitalmikroskopie am Mesenterium des Frosches, dass ein Teil der passierenden Leukozyten langsam am Endothel kleiner Gefäße entlang rollt. Dieses Phänomen wurde von Atherton und Born erstmals 1972 in der Hamsterbackentasche quantitativ analysiert (Atherton und Born, 1973). Heutzutage wird das Rollen der Leukozyten in den Mikrogefäßen des großen Kreislaufs als erster Schritt einer so genannten Adhäsionskaskade (Butcher, 1991; Hogg und Berlin, 1995; Muller, 2003; Weber, 2003) verstanden, dem die feste Adhärenz der Leukozyten am Endothel und schließlich die Emigration der Leukozyten aus dem Intravasalraum ins Gewebe folgen können (Hogg und Berlin, 1995; Springer, 1990; von Andrian et al., 1993; Muller, 2003; Weber, 2003).

In den Mikrogefäßen des großen Kreislaufs sind die rezeptorvermittelten Prozesse des Rollens, der Adhärenz, der Emigration sowie der interstitiellen Migration von Leukozyten typische Charakteristika der akuten Entzündungsreaktion (Fiebig et al., 1991; Ley et al., 1995; Nolte et al., 1995; Springer, 1994; von Andrian et al., 1991) und scheinen auf die venösen

Gefäßbezirke beschränkt zu sein (Atherton et al., 1972; Atherton und Born, 1973; Firrell und Lipowsky, 1989; House und Lipowsky, 1988; Ley und Gaetgens, 1991; Mayrovitz, 1992; Mayrovitz et al., 1987; Nazziola und House, 1992; Nolte et al., 1994; Nolte et al., 1994²; Schmidt-Schönbein et al., 1975). Rollende Leukozyten konnten jedoch ebenfalls in Venolen der intakten Haut anästhesierter Mäuse (Janssen et al., 1992; Mayrovitz, 1992; Nolte et al., 1994²) und Ratten (Janssen et al., 1992) sowie in der Rückenhautkammer an BALB/c Mäusen (Nolte et al., 1994²) beobachtet werden und stellen somit auch ein physiologisches Phänomen dar.

Leukozyten-Rolling, Adhärenz und Emigration werden in den Mikrogefäßen des großen Kreislaufs durch Interaktionen endothelial und leukozytär exprimierter Adhäsionsrezeptoren vermittelt. Das Leukozyten-Rolling wird durch die Interaktion von Adhäsionsmolekülen der Selektin-Familie, d.h. dem von Lymphozyten, Monozyten und PMN exprimierten L-Selektin (CD62L) (Arbones et al., 1994; Hallman et al., 1991, Kishimoto et al., 1990; Knol et al., 1994, Ley et al., 1995; Ley et al., 1995²; Spertini et al., 1991) und den von Endothelzellen exprimierten E-(CD62E) (Abbassi et al., 1993; Alon et al., 1994; Bevilacqua et al., 1987; Bevilacqua et al., 1989; Lawrence und Springer, 1993) und P-Selektinen (CD62P) (Alon et al., 1994; Geng et al., 1990; Ley et al., 1995; Mayadas et al., 1993; Toothill et al., 1990), mit deren Liganden ermöglicht (Alon et al., 1995; Alon et al., 1995²; Alon et al., 1994; Foxall et al., 1992; Graves et al., 1994; Imai et al., 1992; Lasky, 1992; Lenter et al., 1994; Sako et al., 1993).

Die feste Leukozyten-Adhärenz beruht auf einer Bindung der leukozytären β_2 -Integrine CD11a,b/CD18 (LFA1, Mac1) (Argenbright et al., 1991; Larson und Springer, 1990; Luscinskas et al., 1994; Ruoslahti, 1991; Springer, 1990; Springer, 1994) an die endothelialen Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie ICAM-1 (Argenbright et al., 1991; Diamond et al., 1991; Randi und Hogg, 1994; Stanley et al., 1994), ICAM-2 (de Fougerolles et al., 1994) und ICAM-3 (de Fougerolles et al., 1994²; de Fougerolles und

Springer, 1992; Fawcett et al., 1992). Über die Mechanismen der Emigration von Leukozyten aus dem intravasalen Raum durch das Endothel in das umgebende, extravasale Gewebe (Diapedese), finden sich in der Literatur divergente Hypothesen. Feng und Mitarbeiter zeigten 1998, dass PMN *in vivo* nach Stimulation mit fMLP auf einem transzellulären Weg durch Endothelzellen hindurch in das Interstitium migrieren können (Feng et al., 1998). Diese Ergebnisse wurden *in vitro* bestätigt (Carman und Springer, 2004). Allerdings ergaben quantitative Analysen, dass zumindest *in vitro* die Mehrzahl der Leukozyten parazellulär, d.h. zwischen den Kontaktflächen zweier oder mehrerer Endothelzellen hindurch migrieren (Carman und Springer, 2004).

PECAM-1 war das erste endotheliale Zellkontaktprotein, für das gezeigt werden konnte, dass es im Prozess der transendothelialen Migration involviert ist. Sowohl Antikörper gegen PECAM-1 als auch PECAM-Fc Fusionsproteine können die transendotheliale Migration von PMN *in vitro* und *in vivo* in Mäusen wie in Ratten inhibieren (Muller et al., 1993; Vaporciyan et al., 1993; Liao et al., 1977). Obwohl die erste Untersuchung von PECAM-1-defizienten C57Bl/6 Mäusen keine signifikante Reduktion der Anzahl emigrierter PMN ergab (Duncan et al., 1999), führte dieselbe Gendefizienz zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl emigrierter PMN, wenn die Mäuse auf einen FVB/n Stamm zurück gekreuzt wurden (Schenkel et al., 2004). Es ist aber auch möglich, dass PECAM-1 als Signalrezeptor, beziehungsweise Ligand agiert. So wurde gezeigt, dass die homophile Interaktion von endothelialelem und leukozytärem PECAM-1 zu einer erhöhten Expression von $\alpha_6\beta_1$ Integrin auf transendothelial migrierenden PMN *in vivo* führt (Dangerfield et al., 2002).

Schenkel und Kollegen konnten die Relevanz des endothelial wie leukozytär exprimierten Adhäsionsmoleküls CD99 für die transendotheliale Migration von Monozyten und Lymphozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* belegen (Schenkel et al., 2002). *In vitro* zeigten sie, dass CD99 für die transendotheliale Migration humaner Monozyten notwendig ist. *In vivo* wiesen sie eine Beteiligung von CD99 bei der Diapedese von Lymphozyten in der Maus nach.

Mittels blockierender Antikörper konnte demonstriert werden, dass CD99 auf Endothelzellen luminaler als PECAM-1 exprimiert wird. Der Hypothese folgend nutzen Leukozyten während der Diapedese erst CD99 und anschließend PECAM-1 als endotheliale Adhäsionsmoleküle.

Darüber hinaus soll eine Reihe von Adhäsionsmolekülen, die als Stabilisatoren für Endothelzellkontakte dienen, an der Diapedese von Leukozyten beteiligt sein. Gotsch und Kollegen zeigten, dass die Blockierung von VE-Cadherin die transendotheliale Migration von PMN *in vivo* steigert (Gotsch et al., 1997).

Für JAM-A, ein endotheliales und epitheliales Adhäsionsmolekül, wurde mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen, dass es für die transendotheliale Migration von Monozyten und PMN von Bedeutung ist (Martin-Padura et al., 1998; Del Maschio et al., 1999). JAM-A ist ferner auf Leukozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Dendritische Zellen JAM-A-defizienter Mäuse migrieren *in vitro* effektiver durch Endothelzellen lymphatischer Gefäße als dendritische Zellen von Wildtyp Mäusen. In JAM-A defizienten Mäusen zeigten dendritische Zellen eine gesteigerte Migration im Lymphknotengewebe im Vergleich zu dendritischen Zellen in Wildtyp Mäusen (Cera et al., 2004).

Allerdings sind nicht nur Adhäsionsmoleküle für die Rekrutierung von Leukozyten an Orte akuter Entzündungen notwendig. Vielmehr sollen auch eine Reihe von Proteasen durch kontrollierte, limitierte Proteolyse von Rezeptoren, Matrixproteinen und Chemokinen beteiligt sein.

1.2.3. Proteasen-vermittelte Mechanismen

PMN exprimieren eine Vielzahl unterschiedlicher Proteasen. Dazu gehören sekretorische und membrangebundene Matrix-Metalloproteinasen, Serinproteasen, Cysteinproteasen und weitere lysosomale Enzyme (Lee und Downey, 2001).

Serinproteasen neutrophiler Granulozyten, wie Cathepsin G, Proteinase-3 (PRTN3) und Elastase-2 (ELA2), werden während der Myelopoese in großen Mengen synthetisiert und in azurophilen (primären) Granula der PMN gespeichert (Faurischou und Borregaard, 2003). Die ELA2 und PRTN3 kodierenden Gene stehen in enger Beziehung und sind direkt flankiert von den Genen des katalytisch inaktiven Azurocidin und des Komplementfaktors D (Adipsin) (Jenne, 1994). Das ELA2 kodierende Gen liegt in der terminalen Region des kurzen Arms auf Chromosom 19. Das Glykoprotein besteht aus 218 Aminosäuren mit vier Disulfidbrücken (Bode et al., 1989). PRTN3 ist eine kationische aus 228 Aminosäuren bestehende Serinprotease, die eine 54%ige Homologie zu ELA2 aufweist (Campanelli et al., 1990). Nach Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch Zytokine und chemotaktisch aktive Substanzen werden ELA2 und PRTN3 aus den azurophilen Granula an die Zelloberfläche transloziert (Csernok et al., 1994; Owen et al., 1997), wo sie an Rezeptoren (z.B. CD11b) binden (Cai und Wright, 1996; David et al., 2003).

ELA2 und PRTN3 haben die Fähigkeit zur proteolytischen Zerlegung endozytotisch aufgenommener Mikroorganismen oder Zelldebridments. Nach der Phagozytose von Bakterien und der Fusion mit den azurophilen Granula steigt der pH-Wert in den Phagolysosomen in den neutralen Bereich, in dem der optimale Wirkungsbereich der Serinproteasen liegt (Reeves et al., 2002).

Darüber hinaus kann ELA2 extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen, Elastin, Fibrin, Fibronectin und den Thrombozytenrezeptor gpIIb/IIIa degradieren (Si-Tahar et al., 1997), aber auch Cadherine (Carden et al., 1998; Ginzberg et al., 2001) und lösliche Proteine (Weiss,

1989). Owen und Kollegen konnten zeigen, dass Membran-gebundene ELA2 katalytische Aktivität gegenüber Fibronektin und Typ IV Kollagen aufweist (Owen et al., 1995²). Ferner wird ELA2 eine Rolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen zugesprochen (Lee und Downey, 2001; Bank und Ansorge, 2001).

Aufgrund dieser Datenlage wird ELA2 als Mediator vaskulärer und interstitieller Schäden verstanden. Und in der Tat ist die Inhibition von ELA2 mit protektiven Effekten in einer Reihe von Entzündungsmodellen verbunden. Ishii und Kollegen konnten zeigen, dass ELA2 die LPS- induzierte mikrovaskuläre Dysfunktion in der Leber verschlimmert. ELA2-Inhibitoren mildern diese Dysfunktion, indem sie die TNF- α und IL-2 β Produktion hemmen (Ishii et al., 2002). An einem Ischämie-Reperusionsmodell im Kaninchen wurde der protektive Effekt des Proteinaseinhibitors ONO-5046 demonstriert. Die mit ONO-5046 behandelten Tiere zeigten eine signifikant geringer ausgeprägte Infiltration an PMN in der Lunge, ein geringeres pulmonales Ödem und weniger intraalveoläre Einblutungen (Ishikawa et al., 2003). Weitere positive Effekte von ONO-5046 wurden in einem Modell der Kollagen-induzierten chronischen Arthritis der Ratte nachgewiesen (Kakimoto et al., 1995). Schließlich zeigten von Dobschuetz et al. für den ELA2-Inhibitor Lex032 eine Verringerung des Ischämie-Reperfusionsschadens im Pankreas (von Dobschuetz et al., 1999). Diese Einschätzungen werden durch die Ergebnisse von Young et al. unterstützt, die *in vivo* demonstrierten, dass die Leukozytenmigration durch ELA2-Inhibitoren unterdrückt werden kann (Young et al, 2004). Woodman et al. nutzten das Modell des *M. cremaster* der Ratte und untersuchten intravitalmikroskopisch die Leukozytenmigration nach PAF-Stimulation und ELA2-Inhibition mit Egelin C und L658,758 (Woodman et al., 1993). Während Egelin C Cathepsin G und ELA2 sowie begrenzt auch PRTN3 inhibiert (Rao et al., 1994; Renesto et al., 1994), wurde die Spezifität des humanen ELA2 Inhibitors L658,758 in Bezug auf die Homologie der Ratten spezifischen PRTN3 und Cathepsin G nicht bestätigt. Beide Inhibitoren

reduzierten die Anzahl emigrierter PMN aus Venolen, die mit PAF in einer Konzentration von 100 nM superfundiert wurden (Woodman et al., 1993).

Widersprüchliche Ergebnisse finden sich in einer Reihe von *in vitro* Studien, welche die transendotheliale Migration von PMN über Endothelzellen und/oder ein Basalmembran untersuchten (Rosengren und Arfors, 1990; Allport et al., 2002; Campanelli et al., 1990; Delclaux et al., 1996; Furie et al., 1987; Heck et al. 1987; Huber und Weiss, 1987; Mackarel et al., 1999). So fanden sich keine Effekte auf die transendotheliale Migration von PMN über kultivierte pulmonal- und umbilikalvenöse Endothelzellen und deren dazugehörige Basalmembran durch die Serinproteaseninhibitoren Pefabloc SC (Mackarel et al., 1999) und Diisopropyl-Fluoro-Phosphate (Huber et Weiss, 1989).

Berger et al. zeigten, dass PRTN3 für die Produktion von proinflammatorischen Chemokinen während des Rekrutierungsprozesses neutrophiler Granulozyten verantwortlich ist. PRTN3 kann extrazelluläre Matrixproteine wie Elastin, Fibronectin, Laminin, Vibronectin und Typ IV Kollagen degradieren (Rao et al., 1994), hat antimikrobielle Eigenschaften (Eisbach und Weiss, 1992), kann Thrombozyten aktivieren (Renesto et al., 1994) und soll ebenfalls als Regulator von Entzündungsreaktionen agieren (Bank und Ansorge, 2001). *In vitro* kann PRTN3 Bestandteile der Basalmembran degradieren (Rao et al., 1991) und könnte somit eine redundante Rolle bei der Migration von neutrophilen Granulozyten über die Endothelzellbarriere und durch die extrazelluläre Matrix spielen (Campanelli et al., 1990; Rao et al., 1991). Die funktionelle Überlappung beider Proteasen, ELA2 und PRTN3, bei der Degradation der extrazellulären Matrix erschwert die Interpretation vorhergehender Untersuchungen mit ELA2-defizienten Mäusen oder monospezifischen synthetischen Proteinaseinhibitoren.

Daher ist es verständlich, dass die biologische Signifikanz der limitierten, kontrollierten Proteolyse durch PRTN3 und ELA2 während der Migration von PMN kontrovers diskutiert wird (Burns et al., 2002). Fibronectin und Kollagen Typ IV, beides Komponenten der

Basalmembran, sollen die frühzeitige Aktivierung migrierender PMN unterdrücken, um den perivaskulären Schaden während der Leukozytenrekrutierung zu minimieren (Matzner et al., 1990; Monboisse et al., 1994).

Andererseits sind die pathologischen Langzeiteffekte der Matrixdegradation durch PRTN3 und ELA2 bei Patienten mit α_1 -Antitrypsin-Mangel offensichtlich. Diesen Patienten fehlt der lebenswichtige Plasmainhibitor von PRTN3 und ELA2, α_1 -Antitrypsin, und sie sterben an progredienten Lungenemphysemen in mittlerem Alter (Stockley, 1999). Von Seiten der forschenden Pharmaindustrie wurden große Anstrengungen unternommen, synthetische Inhibitoren zur Reduktion des Gewebeschadens während chronischer und akuter Entzündungsreaktionen zu finden. Eine Vielzahl von Ergebnissen zur klinischen Effizienz dieser Inhibitoren wurden allerdings nur teilweise bzw. gar nicht publiziert (Zeiber et al. 2002; Zeiber et al. 2004). Bisher ist nur ein Inhibitor, ONO-5046 (Sivelestat), zugelassen (ausschließlich in Japan), der sowohl ELA2 wie auch PRTN3 inhibiert.

1.3. Intravitalmikroskopie

Die intravitale Mikroskopie ist eine etablierte Technik zur Untersuchung von Veränderungen in der Mikrozirkulation. Die ersten dokumentierten *in vivo* Beobachtungen der Mikrozirkulation durch Marcello Malpighi liegen über drei Jahrhunderte zurück. Malpighi bezeichnete lange dünnwandige Röhren, über die Blut von Arteriolen zu Venolen fließt, als Kapillaren (zitiert nach Scarini et al., 1994; Saraf und Cockett, 1984). Die frühen intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden mit Hilfe der Transillumination in den durchsichtigen, leicht zugänglichen Geweben wie Mesenterium verschiedener Spezies, Froschwimnhäuten und -zungen (Zweifach und Kossmann; 1937), Fledermausflügel (Nicoll und Webb, 1946), Kaulquappenschwanz (Clark und Clark, 1935) durchgeführt. Bei

dieser Technik wird das Gewebe zwischen der Lichtquelle und dem das Licht detektierenden Mikroskop platziert.

1.3.1. Reflected Light Oblique Transillumination (RLOT)

In der Vergangenheit haben Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie die Beobachtung von initialen Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen ermöglicht. Aus diesen Untersuchungen konnten wertvolle Informationen über die beteiligten molekularen Mechanismen gewonnen werden (von Adrian und Mackay, 2000). Obwohl an einer Reihe von Tiermodellen, wie dem Kaninchenohr (Cliff, 1966), der Hamsterbackentasche (Raud et al., 1989), dem Mesenterium der Ratte (Werr et al., 1998) und der Maus (McLean et al., 2000) oder dem murinen *M. cremaster* (Hickey et al., 2000) deskriptive wie auch quantitative Untersuchungen der Leukozytenemigration wie auch deren interstitiellen Migration durchgeführt wurden, war die Identifikation morphologischer Details der beteiligten Leukozyten eingeschränkt. Ein Hauptgrund hierfür liegt in den eingeschränkten Bildkontrasten, die die Hellfeldmikroskopie von Zellstrukturen in einem trüben Medium wie dem Interstitium liefert.

Da die Visualisierung von Phasengradienten in ungefärbten Untersuchungsobjekten, wie in der Phasenkontrast- (Zernike, 1942), der Differential-Interferenzkontrast- (Normanski, 1955), oder der Hoffmann Modulationskontrastmikroskopie (Hoffmann und Gross, 1975), die Darstellung dynamischer Zellvorgänge *in vitro* ermöglicht, wurden in der vorliegenden Arbeit diese optischen Prinzipien in ein intravitalmikroskopisches Setup integriert.

1.4. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte drei Ziele:

1. die Etablierung einer intravitalmikroskopischen Methode zur Visualisierung aller konsekutiven Schritte der Leukozytenrekrutierung an Orte inflammatorischer Geschehnisse in der Präparation des murinen *M. cremaster*
2. die Untersuchung der Leukozytenrekrutierung mittels RLOT-Mikroskopie in P-Selektin- bzw. ICAM-1-defizienten Mäusen
3. die Analyse der Rolle der Serinproteasen Elastase-2 und Proteinase-3 während der Leukozytenrekrutierung

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Experimente der vorliegenden Arbeit erfolgten im Zeitraum August 2001 bis März 2004 am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München, nachdem zuvor die Genehmigung der Versuche durch die zuständige Regierungsbehörde eingeholt worden waren.

Die vorliegende Studie wurde an männlichen Mäusen folgender Stämme durchgeführt: C57Bl/6 Mäuse stammten von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland), P-Selektin-defiziente wurden generiert und zur Verfügung gestellt von Prof. Beaudet (Houston, Tx., USA) (Bullard et al., 1995) und ICAM-1-defiziente Mäuse wurden ursprünglich von Jackson Laboratory (Bar Harbor, Me., USA) käuflich erworben und werden nun in der institutseigenen Tierhaltung gezüchtet, Elastase-2/Proteinase-3-defiziente Mäuse wurden von Herrn PD Dr. Jenne (MPI für Biochemie, Martinsried, München) zur Verfügung gestellt. Bis zum jeweiligen Versuch wurden die Tiere bei einem 12-stündigen Helldunkel-Rhythmus mit dem handelsüblichen Futter für Nagetiere (Altromin[®] Standard-Diät für Ratten und Mäuse: 100 mg. Vitamin E, 15000 I.U. Vitamin A, Altromin GmbH & Co KG, Lang, Deutschland) und Wasser gehalten. Die Raumtemperatur betrug konstant 22°C, die relative Luftfeuchtigkeit 40%. Als Einstreu dienten Sägespäne.

2.2. Präparation des *Musculus cremaster*

2.2.1. Anästhesie

Die Narkose wurde mittels intraperitoneal appliziertem Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®], Parke Davis, Freiburg, Deutschland) und Dihydroxylidinothiazinhydrochlorid (Rompun[®], Bayer, Leverkusen, Deutschland) eingeleitet. Initial wurden 125 mg/kg/KG Ketamin-

hydrochlorid und 15 mg/kg/KG Dihydroxyidinothiazinhydrochlorid verabreicht. Die Narkosetiefe der Tiere wurde an Hand des Kornealreflexes sowie des mittleren arteriellen Blutdruckes beurteilt. Während der Versuche wurden bei nachlassender Narkosetiefe zusätzlich 40 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid intraperitoneal appliziert. Die Versuchstiere atmeten während des gesamten Versuches spontan.

2.2.2. Implantation der Katheter

Nach Narkotisierung der Versuchstiere wurden die rechte Hals- und linke Inguinalregion mit der Enthaarungscreme Pilkamed[®] enthaart. Es folgte eine zweiminütige Desinfektion der Operationsfelder mit Kodan-Tinktur-Forte-Spray (Fa. Schülke & Mayer GmbH, Nordstedt, Deutschland). In der Halsregion wurde die Haut mittels eines 1 cm langen Schnittes vom rechten Unterkieferast bis zur Clavikula eröffnet. Zur Insertion des venösen Katheters in die Vena jugularis externa wurde das Gefäß von dem umgebenden Fett- und Bindegewebe frei präpariert und zur Darstellung gebracht. Anschließend wurden um die Vene kaudal wie kranial jeweils eine Ligatur vorgelegt. Für alle Ligaturen wurde Naht-Seide (Perma Hand[®] Seide, schwarz, geflochten, 7-0, silikonbeschichtet, Firma Ethikon, Nordstedt, Deutschland) verwendet. Im Bereich der kaudalen Ligatur wurde eine Yarsagil- Klemme (Yarsagil[®], Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) angelegt, um größere Blutverluste zu vermeiden. Anschließend wurde die kraniale Ligatur zugezogen. Mit einer spitzen Pinzette wurde die Vene erfaßt, mit einer Mikroschere eröffnet und ein mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllter Katheter wurde über diese Öffnung herzwärts vorgeschoben. Sobald sich der Katheter in der Vene befand, konnte die den Katheter sichernde kaudale Ligatur zugezogen und verknotet werden. Abschließend wurde die Yarsagil-Klemme entfernt und die Hautwunde mittels 3-4 Einzelknopfnähten (Ethibond[®], geflochten, 5-0, Fa. Ethikon, Nordstedt, Deutschland) verschlossen.

In der linken Inguinalregion wurde mit einem ca. 1,5 cm langen Schnitt, der im rechten Winkel zum Ligamentum inguinale verlief, die Haut eröffnet. Nach Entfernung des Fettgewebes wurde die Arteria femoralis mittels spitzer Pinzetten dargestellt und von der Vena femoralis getrennt. Anschließend wurden um die Arterie distal eine Ligatur vorgelegt und sofort zugezogen. Im proximalen Bereich der Arterie wurde eine Ligatur vorgelegt. Um Blutverluste zu verhindern, wurde im Bereich der proximalen Ligatur eine Yarsagil-Klemme angelegt. In die mit Pinzetten erfasste und mittels einer Mikroschere eröffnete Arterie wurde ein mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllter Katheter eingeführt. Die proximale Ligatur wurde primär nur unvollständig zugezogen, die Yarsagil-Klemme geöffnet und der Katheter bis zur Bifurkation der Aorta vorgeschoben. Abschließend wurde die Ligatur vollständig fixiert und die Hautwunde mit 4-5 Einzelknopfnähten (Ethibond[®], geflochten, 5-0- Fa. Ethikon, Nordstedt, Deutschland) verschlossen. Die an den Katheter angeschlossene Blutdrucksonde diente der Messung des Blutdruckes.

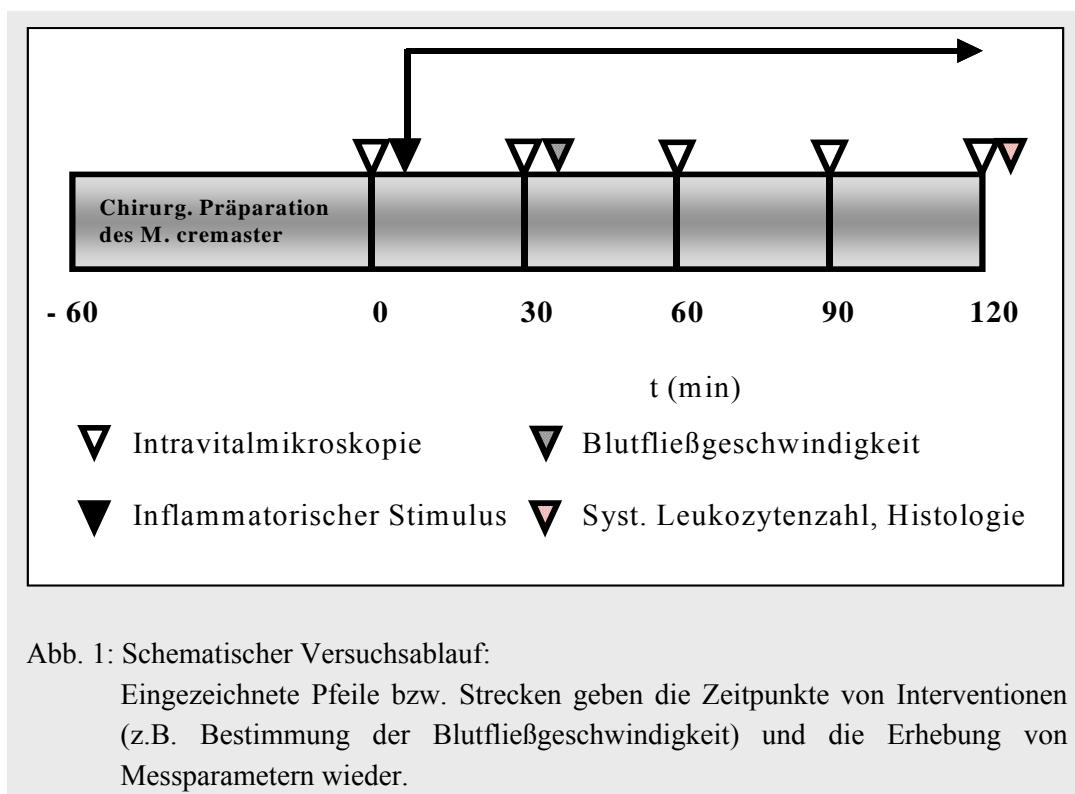
2.2.3. Chirurgische Präparation des *Musculus cremaster*

Die chirurgische Präparation des *M. cremaster* erfolgte mit minimalen Veränderungen nach der Beschreibung von Baez (Baez, 1973). Zu Beginn wurde das Skrotum der Versuchstiere mit Pilkamed[®] Creme enthaart und desinfiziert. Anschließend wurden die narkotisierten Versuchstiere auf einer selbstkonstruierten Plexiglasbühne gelagert. Das Skrotum wurde mit einem ca. 1 cm langen Schnitt eröffnet, und der *M. cremaster* freigelegt. In einem gefäßarmen Areal wurde der Muskel ventral eröffnet und planar fixiert. Dabei entstehende Blutungen wurden mittels Elektrokoagulator gestoppt. Hoden sowie Nebenhoden wurden von dem Muskel gelöst und zurück in die Bauchhöhle geschoben. Während der gesamten chirurgischen Präparation wurde der Muskel mit bikarbonat-gepufferter, Temperatur-regulierter (37°C) Ringer's Injection Lösung superfundiert. Nach Beendigung der Präparationsphase, die

durchschnittlich 30 Minuten dauerte, wurde die Plexiglasbühne unter dem Mikroskop platziert, wo die Temperatur der Superfusion wie auch der Maus durch eine Infrarot-Wärmelampe konstant bei 37°C gehalten wurde. Die Körperkerntemperatur wurde mittels rektaler Temperatursonde kontrolliert.

2.3. Experimentelle Protokolle

Für die Etablierung der RLOT-Mikroskopie und die Analyse der Rolle der Serinproteasen ELA2 und PRTN3 während der Leukozytenrekrutierung wurden zwei unterschiedliche experimentelle Protokolle erarbeitet.



Narkose, Implantation der Katheter und chirurgische Präparation waren in beiden Protokollen identisch und wurden bereits ausführlich erläutert. Ebenfalls war der zeitliche Ablauf, welcher schematisch in Abbildung 1 gezeigt ist, in beiden Protokollen identisch.

2.3.1. Experimentelles Protokoll zur Etablierung der RLOT-Mikroskopie

Pro Versuchstier wurden drei postkapilläre Venensegmente zufällig ausgewählt. Die Venolen mussten mindestens 150 µm von einer benachbarten Vene entfernt liegen und durften über einen Verlauf von 150 µm keine Zuflüsse aufweisen. Nach Erfassung der Ausgangswerte rollender, fest adhärenter und emigrierter Leukozyten in allen drei Venensegmenten wurde der inflammatorische Stimulus mittels topischer Applikation von *platelet-activating factor* (PAF; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) in einer finalen Konzentration von 100 nM (Mempel et al. 2003) beziehungsweise KC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) in einer finalen Konzentration von 6,25 nM induziert. Die Anzahl rollender, adhärenter und emigrierter Leukozyten wurde alle 30 Minuten quantifiziert. Zusätzlich wurde nach 30 Minuten die Blutfließgeschwindigkeit bestimmt. Nach 120 Minuten wurde zur Bestimmung der systemischen Leukozytenzahl intrakardial Blut entnommen und das Versuchstier mittels einer intraarteriell applizierten Überdosis an Pentobarbital euthanasiert. Im Anschluss wurde das Tier mit PBS perfundiert, mit 4%igem Formaldehyd perfusionsfixiert und der *M. cremaster* zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

2.3.2. Experimentelles Protokoll zur Analyse der Rolle der Serinproteinasen ELA2 und PRTN3 während der Leukozytenrekrutierung

Pro Versuchstier wurden drei postkapilläre Venensegmente zufällig ausgewählt. Die Venolen mussten mindestens 150 µm von einer benachbarten Vene entfernt liegen und durften über einen Verlauf von 150 µm keine Zuflüsse aufweisen. Nach Erfassung der Ausgangswerte der Anzahl rollender, adhärenter und emigrierter Leukozyten sowie der interstitiellen Verteilung der emigrierten Leukozyten in allen drei Venensegmenten wurde der inflammatorische Stimulus mittels topischer Applikation von PAF (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) in

einer finalen Konzentration von 100 nM induziert (Mempel et al. 2003). Die Anzahl rollender, adhärenter und emigrierter Leukozyten wurde alle 30 Minuten wiederholt gemessen. Ferner wurde zu jedem Untersuchungszeitpunkt die interstitielle Verteilung der emigrierten Leukozyten quantifiziert. Zum Zeitpunkt 30 Minuten wurde die Blutfließgeschwindigkeit bestimmt. Nach 120 Minuten wurde zur Bestimmung der systemischen Leukozytenzahl intrakardial Blut entnommen und das Versuchstier mittels einer intraarteriell applizierten Überdosis an Pentobarbital euthanasiert. Im Anschluss wurde das Tier mit PBS perfundiert, mit 4%igem Formaldehyd perfusionsfixiert und der *M. cremaster* zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

Der pharmakologische Inhibitor ONO-5046 (N-[2-[4-(2,2-dimethyl-propionyloxy)-phenylsulfonylamino] amino acetic acid) (Ono Pharmaceuticals, Osaka, Japan) wurde in NaCl aufgelöst und intravenös verabreicht. Die Versuchstiere erhielten entweder das Verum in einer finalen Konzentration von 90 mg/kg oder eine äquivalente Menge an NaCl (Ishii et al., 2002).

2.4. Intravitalmikroskopie

Als Mikroskop diente ein Olympus BX50 Aufrechtmikroskop (OLYMPUS Microscopy, Hamburg, Deutschland), welches für stroboskopische Fluoreszenzepiillumination ausgestattet war. Als Lichtquelle nutzten wir eine 75 W Xenon Lampe, die monochromatisches Licht der Wellenlänge 700 nm durch einen galvanischen Scanner (Polychrome II; T.I.L.L. Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland) lieferte. Der Lichtstrahl wurde via eines FITC Filters und einen dichroitischen Teilerspiegel (DCLP 500, LP515; OLYMPUS) durch Olympus Wasserimmersionsobjektive (20x/NA 0.5 und 40x/NA 0.8) auf das Untersuchungsobjekt projiziert. Mikroskopische Abbildungen wurden mit Olympus Wasserimmersionsobjektiven (20x/NA 0.5 und 40x/NA 0.8) generiert. Die Abbildungen wurden entweder mit einer

digitalen CCD Kamera (Imago; T.I.L.L. Photonics GmbH) aufgenommen und anschließend auf einem PC mittels kommerziell erhältlicher Software (TILLvisION; T.I.L.L. Photonics GmbH) gespeichert, oder mittels einer analogen schwarz-weiß CCD Videokamera (Cohu 4920; Cohu, Inc., San Diego, CA, USA) und einem analogen Videorekorder (AG-7350-E; Panasonic, Hamburg, Deutschland) aufgezeichnet.

2.4.1. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Visualisierung und Quantifizierung des Leukozyten-Rollings und der Leukozyten-Adhärenz nutzten wir im ersten Teil der Versuche den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G (Sigma, St. Louis, MO, USA). Rhodamin 6G wurde in einer Konzentration von 0.05 g/ml als 20 µl Bolus über einen intravenösen Katheter in die Vena jugularis der Versuchstiere vor den Untersuchungen injiziert. Intravital gefärbte Blutzellen wurden mit einer Wellenlänge von 527 nm angeregt, die mit Hilfe eines Monochromators (Polychrome II; T.I.L.L. Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland) generiert wurde. Die Emissionswellenlänge von Rhodamin 6G liegt bei 557 nm.

2.4.2. Reflected Light Oblique Transillumination (RLOT)-Mikroskopie

Oblique Illumination wurde erreicht, indem ein spiegelnder Reflektor direkt unter das zu untersuchende Präparat positioniert und der Neigungswinkel je nach Präparat variiert wurde (vgl. Abb. 2). Der Reflektor bestand aus einem runden Deckgläschen (Dicke 0,19-0,22 mm, Durchmesser 11,8 mm), das mit Aluminium bedampft wurde (Freichel & Co. oHG, Kaufbeuren, Deutschland). Der Reflektor wurde in direkten Kontakt mit dem darüber liegenden zu untersuchenden Präparat gebracht.

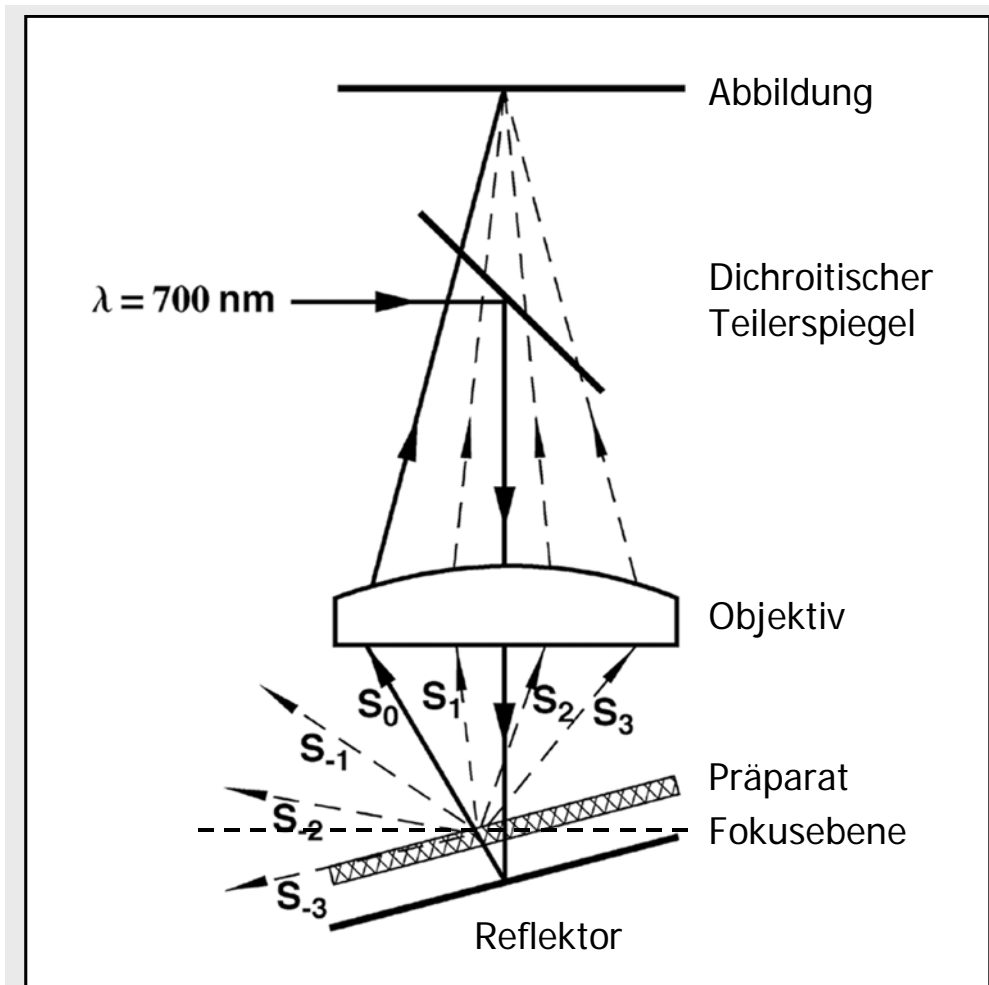


Abb. 2: Schematische, vereinfachte Darstellung der Lichtwege bei der RLOT-Mikroskopie: Nahinfrarotes Licht durchdringt das Präparat und trifft auf einen schrägen Reflektor. Das reflektierte Licht wird durch die Strukturen im Präparat gebeugt. Daraus gehen Strahlungsmaxima hervor. Während ein Teil (S-1-S-3) das Objektiv verfehlt, führen die Strahlungsmaxima (S1-S3) zu einem *pseudo-dreidimensionalen* Abbild.

2.4.3. Blutfließgeschwindigkeit

Die Blutfließgeschwindigkeit wurde mittels fluoreszierenden Mikrosphären (6 μm Durchmesser; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) bestimmt. Die Mikrosphären wurden über einen intraarteriellen Katheter in die Arteria femoralis retrograd injiziert. Während ihrer Passage durch das Gefäßbett wurden sie mittels stroboskopischer Illumination zum Fluoreszieren angeregt (Exposition eine Millisekunde, Zykluszeit zehn Millisekunden, $\lambda=488$ nm). Die time-lapse Videoaufnahmen wurden mittels der bereits beschriebenen digitalen Videokamera aufgezeichnet. Die Videobilder wurden über einen Zeitraum von mindestens 80 Millisekunden integriert. Dies erlaubte die Aufzeichnung mehrerer Videobilder derselben Mikrosphäre in einem Videoframe. Mikrosphären, die frei in der Mitte des Gefäßes flossen, wurden zur Errechnung der Blutfließgeschwindigkeit genutzt. Die hierfür verwendeten Formeln finden sich im folgenden Abschnitt.

2.5. Quantitative Parameter

2.5.1. Blutbild

Nach jedem Versuch wurden per Herzpunktion ca. 200 μl Blut in eine heparinisierte (Heparin, Ratiopharm GmbH & Co., Ulm) Spritze (CH.-B., B. Braun Melsungen AG, Melsungen) zur Analyse des peripheren Blutbildes entnommen.

In einem Coulter-Gerät (Coulter Counter T540, Coulter Electronics, Inc., Krefeld) wurden Erythrozyten- (RBC), Leukozyten- (WBC), Thrombozytenzahlen (PLT) und Hämoglobingehalt (Hb) im peripheren Blut bestimmt.

2.5.2. Gefäßdurchmesser, Mikrohämodynamik und Leukozytenkinetik

2.5.2.1. Off-line Analyse am Monitor

Gefäßdurchmesser, Mikrohämodynamik und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den untersuchten Gefäßen wurden durch off-line Analyse der aufgenommenen Videobänder am Bildschirm quantifiziert. Die Eichung des optischen Systems in den Horizontal- und Vertikalebene des Monitors erfolgte durch Ausmessung von unter Versuchsbedingungen aufgenommenen Mikrometerskalen (Leica GmbH, Wetzlar). Da geringfügige Verzerrungen der abgebildeten Mikrometerskalen ausschließlich in den Randbereichen des Monitors auftraten, wurden nur Gefäßgebiete analysiert, die im zentralen, geometrisch planen Bereich des Bildschirms lagen. Wiederholte Abmessungen der abgebildeten Mikrometerskalen ergaben, dass unter Berücksichtigung dieser Prämissen die Messgenauigkeit des Bildverarbeitungssystems bei $\pm 1 \mu\text{m}$ liegt.

Die off-line Analyse am Monitor erfolgte interaktiv mittels eines computergestützten Bildverarbeitungssystems (Cap-Image, Zeintl, Heidelberg, Deutschland).

2.5.2.2. Gefäßdurchmesser

Die Gefäßdurchmesser wurden in randomisiert ausgewählten Venolen mittels RLOT-Mikroskopie visualisiert, analog auf Videobändern gespeichert und off-line mittels Cap-Image (Zeintl et al, 1989) ausgewertet. Hierfür war die digitale Übertragung der Analogbilder auf einen Farbmonitor erforderlich. Die Bestimmung des Gefäßdurchmessers in den beobachteten Venolen des murinen *M. cremaster* erfolgte manuell. Hierzu wurde durch Anklicken der zwei Randpunkte (jeweils in der Mitte der Gefäßwand) die Durchmesserstrecke direkt markiert und exakt senkrecht zum Verlauf des Blutgefäßes gelegt. Auf diese Weise wurden drei Einzelwerte ermittelt und ein Mittelwert berechnet.

2.5.2.3. Blutfließgeschwindigkeit und Scherrate

Die Veränderung der Gefäßdurchmesser und der Blutfließgeschwindigkeiten haben Änderungen der auf die zellulären Blutbestandteile wirkenden Scherkräfte zur Folge (House und Lipowsky, 1987; Lipowsky et al., 1978). Die Wandscherrate γ (Perry und Granger, 1991) als Ausdruck der an der intravasalen Gefäßwand auftretenden Scherkräfte wurde in den postkapillären Venolen unter Verwendung des Poiseuille'schen Gesetzes für Newton'sche Flüssigkeiten berechnet als:

$$\gamma = 8 \times vQ / D$$

Dabei wurde eine zylindrische Gefäßgeometrie vorausgesetzt.

2.5.2.4. Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Um die Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen während ihrer Rekrutierung in inflammatorisch stimuliertes Gewebe detailliert zu analysieren, wurde eine Klassifizierung der Leukozyten in rollende und adhärente Zellen entsprechend dem Stufen-Modell der Leukozytenrekrutierung (Muller, 2003; Weber, 2003) vorgenommen. Die quantitative Analysen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen erfolgten an Hand von intravital-mikroskopischen Videoaufnahmen, die sowohl unter Verwendung der RLOT-Mikroskopie als auch der klassischen Fluoreszenzmikroskopie entstanden.

2.5.2.4.1. Anteil rollender Leukozyten

Als erster Schritt der Rekrutierung von Leukozyten gilt die Interaktion von spezifischen Adhäsionsmolekülen auf aktivierten Endothelzellen mit deren Liganden auf Leukozyten. Diese Interaktion hat eine Verlangsamung der Leukozyten zur Folge, wodurch diese im Gefäßstrom als am Endothel entlang rollende Zellen sichtbar werden.

In den zu Beginn ausgewählten postkapillären Venolen wurden Zellen als rollende Leukozyten definiert, wenn sie sich am mikrovaskulären Endothel entlang bewegten und eine gedachte Linie mit deutlich verlangsamter Geschwindigkeit passierten .

Die absolute Zahl frei passierender und rollender Leukozyten in einem Gefäß ist entscheidend abhängig von der Mikrohämodynamik. Daher wurde der Anteil rollender Leukozyten (Rolling fraction) an der Gesamtheit der passierten Leukozyten als besser vergleichbarer Parameter quantifiziert, da dieser vom aktuellen Leukozytenflux im Gefäß unabhängig ist (von Andrian et al., 1991; von Andrian et al., 1992):

$$\text{Rolling fraction (\%)} = \frac{\text{Anzahl rollender}}{\text{Anzahl frei passierender} + \text{Anzahl rollender Leukozyten}}$$

2.5.2.4.2. Anzahl adhärenter Leukozyten

Die Anzahl der adhärenenten Leukozyten wurde in einem definierten Gefäßsegment der Länge L_{seg} bestimmt und auf die innere Gefäßwandoberfläche des Segments bezogen (Pries, 1990). Als adhärent wurden Leukozyten definiert, die über eine Beobachtungsperiode von 30 Sekunden statisch am Endothel hafteten.

Unter Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie kann die Anzahl adhärenter Leukozyten pro Gefäßwandoberfläche (A_d) bestimmt werden als:

$$A_d = \text{Anzahl adhärenter Leukozyten} / (D \times \pi \times L_{\text{seg}}) \times 10^6$$

2.5.2.5. Transendothelial und interstitiell migrierende Leukozyten

Nach den initialen Schritten der Adhäsionskaskade müssen Leukozyten, um an den Ort inflammatorischen Geschehens zu gelangen, die Endothelzellbarriere überwinden und durch das interstitielle Bindegewebe migrieren. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die Anzahl emigrierter Leukozyten als auch die interstitiell zurückgelegte Distanz dieser Leukozyten auf einen definierten inflammatorischen Stimulus quantitativ erfasst.

2.5.2.5.1. Anzahl transendothelial migrierter Leukozyten

Als emigrierte Leukozyten wurden Zellen quantifiziert, die sich zum Untersuchungszeitpunkt in definierten Arealen zu den beiden Seiten einer ausgewählten postkapillären Venole befanden (Abb. 3). Diese Areale variierten je nach Fragestellung zwischen $100 \times 50 \mu\text{m}$ und $100 \times 75 \mu\text{m}$. Um der Dreidimensionalität des *M. cremaster* gerecht zu werden, wurde durch die gesamte Tiefe des Muskels fokussiert, um alle emigrierten Leukozyten zu erfassen.

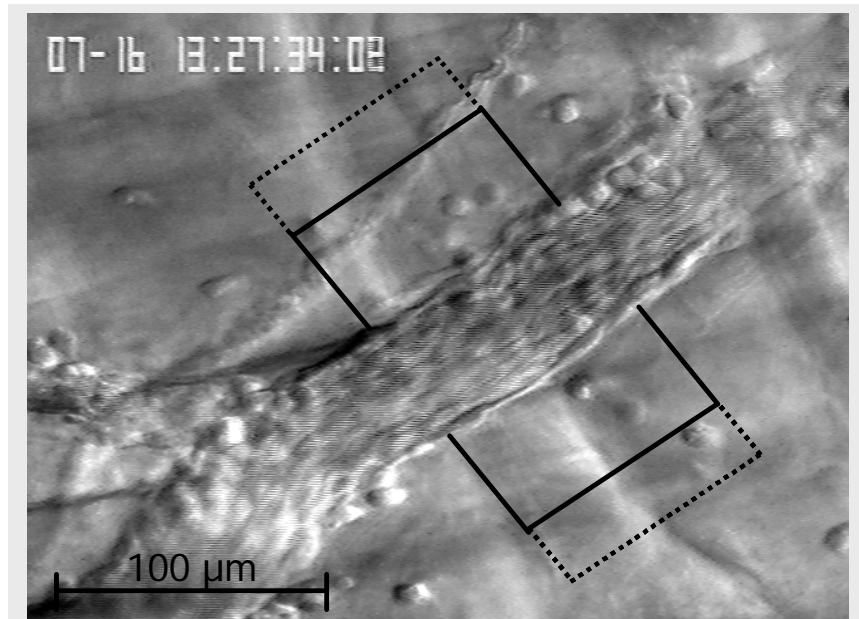


Abb. 3: Emigrierte Leukozyten wurden in rechteckigen Arealen von 50 x 100 µm, bzw. 75 x 100 µm zu beiden Seiten der untersuchten postkapillären Venole quantifiziert.

2.5.2.5.2. Interstitielle Migration von Leukozyten

Zur Untersuchung des interstitiellen Migrationsverhaltens wurden die Areale, in denen zuvor die absolute Anzahl emigrierte Leukozyten quantifiziert wurden, in zwei Subkompartimente unterteilt (Abb. 4), ein Gefäß-nahes Areal (25 x 100 µm) und ein Gefäß-fernes Areal (50 x 100 µm). Die unterschiedliche Verteilung der emigrierten Leukozyten in diesen Arealen erlaubt Aussagen über die von den Leukozyten zurückgelegten Migrationsstrecken.

Da die absolute Anzahl emigrierter Leukozyten je nach Intervention variiert, wurde die prozentuale Verteilung der emigrierten Leukozyten auf die zwei Subkompartimente als unabhängiger Parameter quantifiziert.

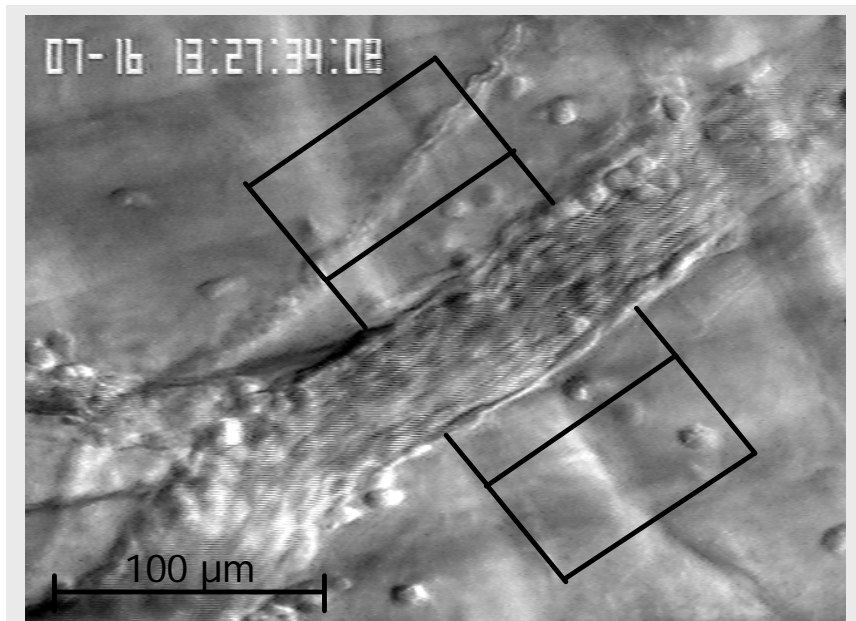


Abb. 4: Die extravaskuläre Verteilung emigrierter Leukozyten wurde als prozentuale Verteilung der Leukozyten auf ein Gefäß-nahes und Gefäß-fernes Kompartiment quantifiziert.

2.6. Immunhistologie

2.6.1. Immunhistologische Färbung der Präparate

Zur weiteren Charakterisierung der emigrierten Zellen wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurde das Versuchstier über den arteriellen Katheter in der Arteria femoralis mit PBS perfundiert und im Anschluss mit 4%igem Formalin perfusionsfixiert. Der *M. cremaster* wurde entnommen, auf einem Korkplättchen aufgespannt und für 24 Stunden in 4%igem Formalin fixiert. Nach Einbettung der Präparate in Paraffin wurden serielle Schnitte erstellt. Der erste zweier aufeinander folgender Paraffinschnitte wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Panleukozyten-Antigen CD45 (Biopharmigene), der zweite mit einem monoklonalen Antikörper gegen das für PMN charakteristische Antigen Ly-6G (Biopharmigene) inkubiert.

2.6.2. Quantitative Auswertung der Histologie

Um eine quantitative Aussage über die Subpopulationen der emigrierten Leukozyten treffen zu können, wurden pro Präparat 200 extravasal liegende CD45⁺ Zellen ausgezählt. Im darauf folgenden seriellen Schnittpräparat wurden diese CD45⁺ Zellen auf ihre Ly-6G Expression hin untersucht. Alle CD45⁺, Ly-6G⁺ Zellen wurden als PMN, alle CD45⁺, Ly-6G⁻ Zellen als mononukleäre Zellen dokumentiert und gegeneinander in Verhältnis gesetzt.

2.7. Datenverarbeitung und Statistik

2.7.1. Datenverarbeitung

Die Parameter der Gefäßmorphologie, der Mikrohämodynamik und der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurden mit dem computergestützten Bildverarbeitungsprogramm CAMAS (Dr. Zeintl, Heidelberg, Germany) quantifiziert und manuell in Datensheets des Tabellenkalkulationsprogramms MS-Excel (Microsoft GmbH, München, Deutschland) eingetragen. Mit Hilfe programmierter Formeln wurden die abgeleiteten Parameter errechnet. Die erhaltenen Werte wurden zusammen mit den Stammdaten – wie Datum, Versuchsnummer – auf CD gespeichert. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Computerprogramm SigmaPlot (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) verwendet.

2.7.2. Statistik

Die statistische Auswertung der gemessenen und berechneten Daten erfolgte an einem Personalcomputer unter Verwendung des Statistikprogramms SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

Für Vergleiche zwischen den Werten verschiedener Versuchsgruppen diente der one-way-ANOVA Test für unverbundene Stichproben, gefolgt vom Student-Newman-Keuls Test. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$ wurde als signifikant angesehen. Falls nicht anders vermerkt, sind alle Werte als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung der Reflected Light Oblique Transillumination (RLOT)-Mikroskopie

3.1.1. Verbesserter Bildkontrast mittels RLOT- Mikroskopie

Um den Einfluss von RLOT auf den Kontrast mikroskopischer Abbildungen zu untersuchen, wurden zu Beginn 15 μm große Mikrosphären bei unterschiedlicher Reflektorneigung visualisiert. Bei einer Reflektorneigung von 0° gleicht das mittels RLOT-Mikroskopie gewonnene Bild (Abb. 5B) der einer mittels konventioneller Durchlichtmikroskopie angefertigten Aufnahme (Abb. 5A). Durch graduelle Steigerung der Reflektorneigung gewinnt das mikroskopische Abbild an Plastizität. Diese Plastizität wird ermöglicht durch eine intensivere Schattierung der Strukturen im zu untersuchenden Präparat (Abb. 5C, 5D).

Um die Verbesserung des Bildkontrasts für feinmorphologische Details zu demonstrieren, wurde eine humane Schleimhautzelle zum Vergleich bei einer Reflektorneigung von 0° (Abb. 5E), was der klassischen Transillumination entspricht, und bei einer Neigung von 15° (Abb. 5F) visualisiert. Durch den Einsatz der RLOT-Mikroskopie werden in Abbildung 5F subzelluläre Strukturen sichtbar, die bei Transillumination noch nicht erkennbar waren. Im Vergleich mit konventionellen Mikroskopiemethoden wie Phasenkontrast (Abb. 5G) und Differential-Interferenzkontrast (DIK) (Abb. 5H) wird deutlich, dass RLOT verwandte Bilder liefert.

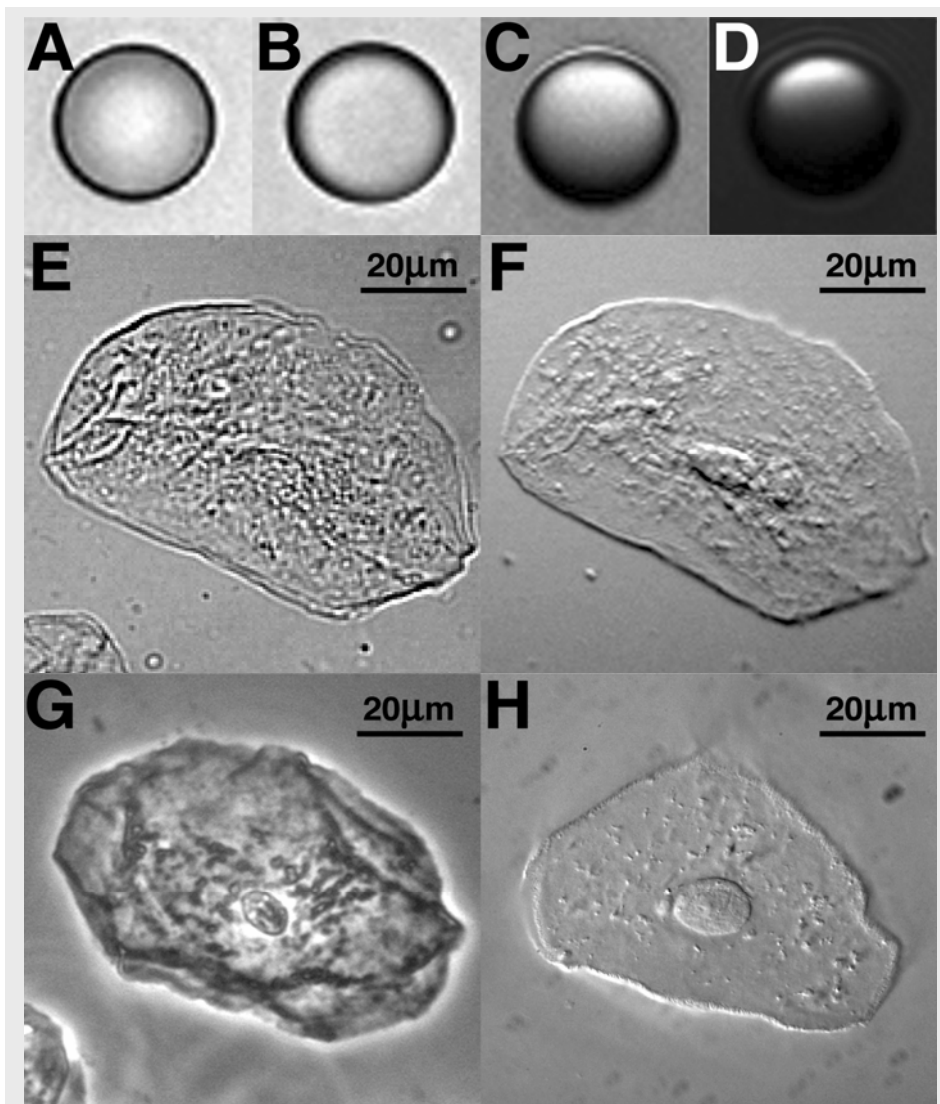


Abb. 5: 15 µm große Mikrosphären visualisiert mittels Transillumination (A) und RLOT-Mikroskopie (B-D); der Neigungswinkel beträgt 0°, 15° bzw. 30° in B, C bzw. D.

RLOT-Mikroskopie (Reflektorneigung 15°) ermöglicht durch das entstehende *pseudo-dreidimensionale* Abbild die Darstellung subzellulärer Strukturen (F: humane Schleimhautepithelzelle); zum Vergleich die identische Zelle bei Transillumination (E); humane Schleimhautepithelzellen (G: Phasenkontrast-; H: DIK-Mikroskopie)

3.1.2. RLOT Mikroskopie in Verbindung mit der Präparation des murinen *M. cremaster*

Die Kombination der RLOT-Mikroskopie mit der Präparation des *M. cremaster* ermöglicht die Visualisierung von Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen sowie der transendothelialen und interstitiellen Migration von Leukozyten.

Abbildungen 6A und 6B zeigen eine identische postkapilläre Venole mit einem Durchmesser von ca. 35 μm . Die Abbildungen wurden mittels klassischer Durchlichtmikroskopie (Abb. 6A) und RLOT-Mikroskopie (Abb. 6B) gewonnen. In Abbildung 6A erschwert die Absorption des intravaskulären Hämoglobins sowie des extravaskulären Myoglobins die Identifikation von Leukozyten.

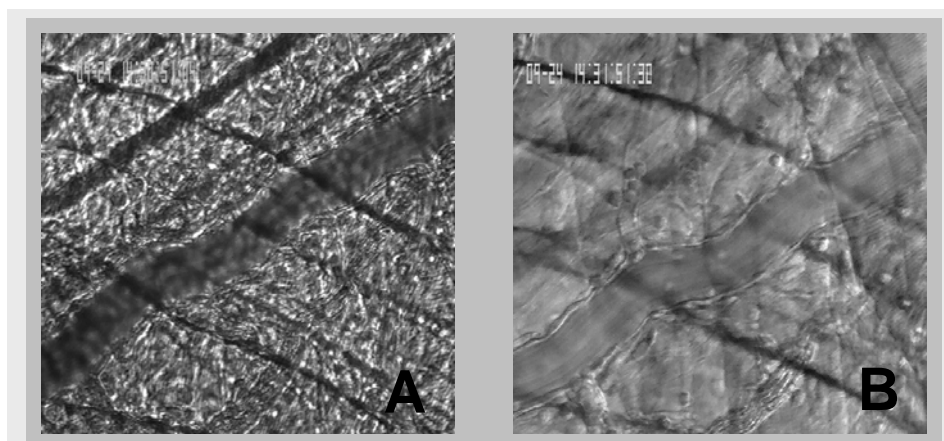


Abb. 6: Eine postkapilläre Venole 120 Minuten nach topischer Superfusion mit PAF (100 nM). (A) wurde mittels konventioneller Durchlichtmikroskopie, (B) mittels RLOT-Mikroskopie akquiriert, welche die Identifikation von emigrierten Leukozyten und endothelialen Strukturen erlaubt.

Die Reduktion der Myo- und Hämoglobinextinktion durch das bei der RLOT-Mikroskopie verwendete nahinfrarote Licht ermöglicht die Darstellung bindegewebiger und endothelialer Strukturen. Sowohl intra- als auch extravasal liegende Leukozyten kommen detailgetreu zur Darstellung (Abb. 6B).

Zusätzlich erlaubt die Verwendung nahinfraroten Lichtes durch die geringere Energieübertragung auf das Präparat längere Beobachtungszeiten bei gleichzeitiger Minimierung der Phototoxizität. Durch den anaxialen Strahlengang kommt es an zellulären Strukturen des *M. cremaster* zu einer Aufspaltung des Lichtes in unterschiedliche Phasengradienten. Dies führt zu einer *pseudo-dreidimensionalen* Darstellung zellulären Strukturen (Abb. 6 und 7).

Abbildung 7 zeigt ein dichtes inflammatorisches Infiltrat um eine postkapilläre Venole nach 120 Minuten kontinuierlicher topischer Superfusion des *M. cremaster* mit 100 nM PAF.

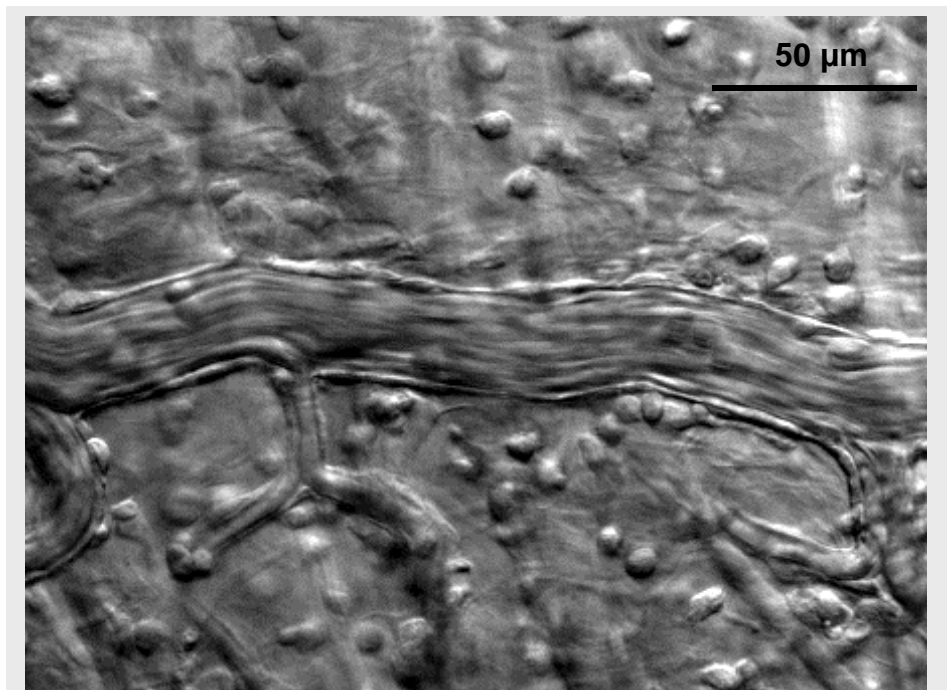


Abb. 7: Die Abbildung wurden nach 120 Minuten topischer Applikation von 100 nM PAF mittels RLOT- Mikroskopie aufgenommen. Es zeigt sich ein dichtes inflammatorisches Infiltrat in der Umgebung der postkapillären Venole. Bei 20x Objektivvergrößerung lassen sich endotheliale Strukturen und Leukozyten identifizieren.

Abbildungen A-D zeigen Standbilder einer Videosequenz eines migrierenden Leukozyten. Bei 40facher Objektvergrößerung werden zelluläre Strukturen wie Protrusionen und Lamellipodien erkennbar. Ferner kommen intrakapilläre Erythrozyten zur Darstellung.

Die optimale Reflektorneigung muss an die unterschiedlichen Objektive angepasst werden, um eine suffiziente Extraktion des im Präparat gebrochenen Lichtes zu erlangen. Die Reflektorneigung ist abhängig vom Durchmesser der Frontlinse, des Arbeitsabstandes und der numerischen Apertur des verwendeten Objektivs und wurde bei dem für diese Untersuchungen verwendeten Mikroskop empirisch bestimmt. Für die 20x Linse wurde eine optimale Darstellung bei einer Neigung von 10° , für die 40x Linse bei einer Neigung von 20° ermittelt.

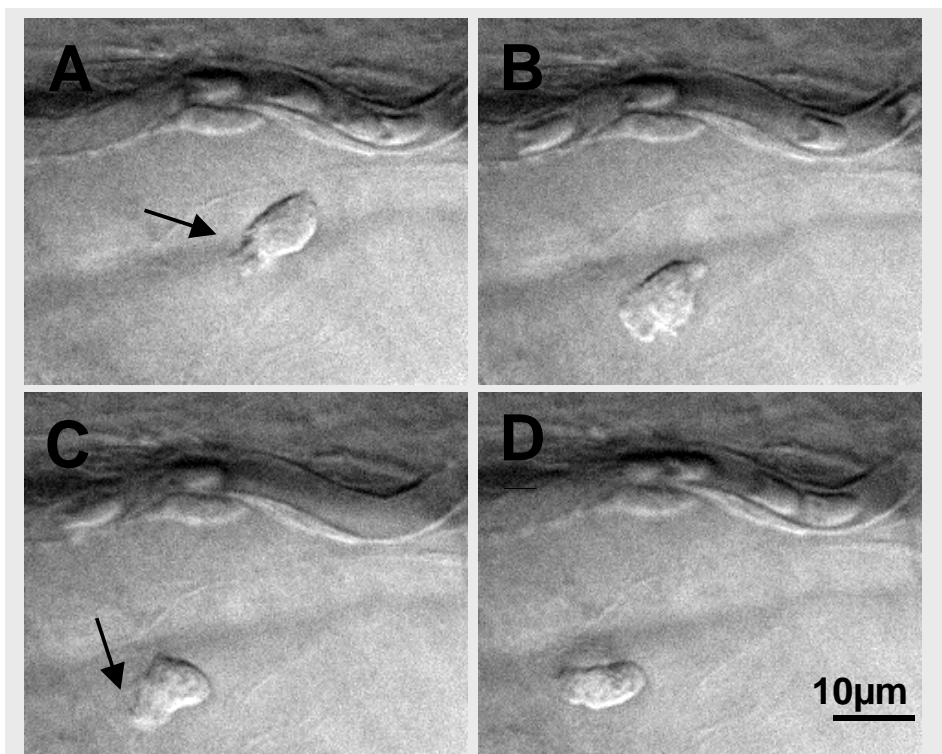


Abb. 8: Bei den Abbildungen handelt es sich um Standbilder einer Videosequenz, die nach 120 Minuten topischer Applikation von 100 nM PAF mittels RLOT-Mikroskopie aufgenommen wurden. Bei 40x Objektivvergrößerung werden Lamellipodien des migrierenden Leukozyten (-►), sowie intrakapilläre Erythrozyten erkennbar.

3.1.3. Quantifizierung der Leukozytenrekrutierung mittels RLOT-Mikroskopie

Die Leukozytenrekrutierung wurde in drei Versuchsgruppen an je 5 Tieren mittels RLOT-Mikroskopie an der Präparation des *M. cremaster* visualisiert und quantifiziert. Es wurden eine Kontrollgruppe und zwei Versuchsgruppen gebildet, in denen durch die Zugabe chemotaktisch aktiver Substanzen zur topischen Superfusion eine Entzündung simuliert wurde. Als Entzündungsmediatoren dienten PAF in einer Konzentration von 100 nM sowie KC in einer Konzentration von 6,25 nM.

3.1.3.1. Blutbild

Die unter Versuchsbedingungen erhobenen Blutbilder sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Erythrozyten- (RBC), Leukozyten- (WBC) und Thrombozytenzahlen (PLT), sowie des Hämoglobingehalts (Hb).

Tab. 1: Peripheres Blutbild unter Versuchsbedingungen

	RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)
Kontrollgruppe	$6,6 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,2$	503 ± 42	$12,1 \pm 0,6$
PAF-Gruppe	$7,4 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,6$	732 ± 122	$13,2 \pm 0,4$
KC-Gruppe	$5,9 \pm 0,7$	$3,8 \pm 0,4$	468 ± 105	$11,2 \pm 1,2$

Parameter: Erythrozyten- (RBC), Leukozyten- (WBC) und Thrombozytenzahlen (PLT), Hämoglobingehalt (Hb) im arteriellen Blut.
Mittelwert \pm SEM; n = 5; n.s.

3.1.3.2. Gefäßdurchmesser und Mikrohämodynamik

Pro Versuchstier wurde die Rekrutierung von Leukozyten an 3 postkapillären Venolen untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden nur postkapilläre Venolen mit einem Durchmesser von 20 – 40 μm ausgewählt, die zusätzlich über mindestens 150 μm keine Verzweigungen aufwiesen. Die Blutfließgeschwindigkeit wurde gemessen und in ihrer Abhängigkeit die Wandscherrate γ berechnet.

Tab. 2: Gefäßdurchmesser und Mikrohämodynamik in postkapillären Venolen des murinen *M. cremaster* unter Versuchsbedingungen

	D (μm)	V_Q (mm/s)	γ (s^{-1})
Kontrollgruppe	$25,6 \pm 0,86$	$2,11 \pm 0,19$	$662 \pm 43,9$
PAF- Gruppe	$26,0 \pm 0,80$	$2,02 \pm 0,22$	$636 \pm 80,8$
KC- Gruppe	$26,1 \pm 1,02$	$1,70 \pm 0,16$	$517 \pm 37,5$

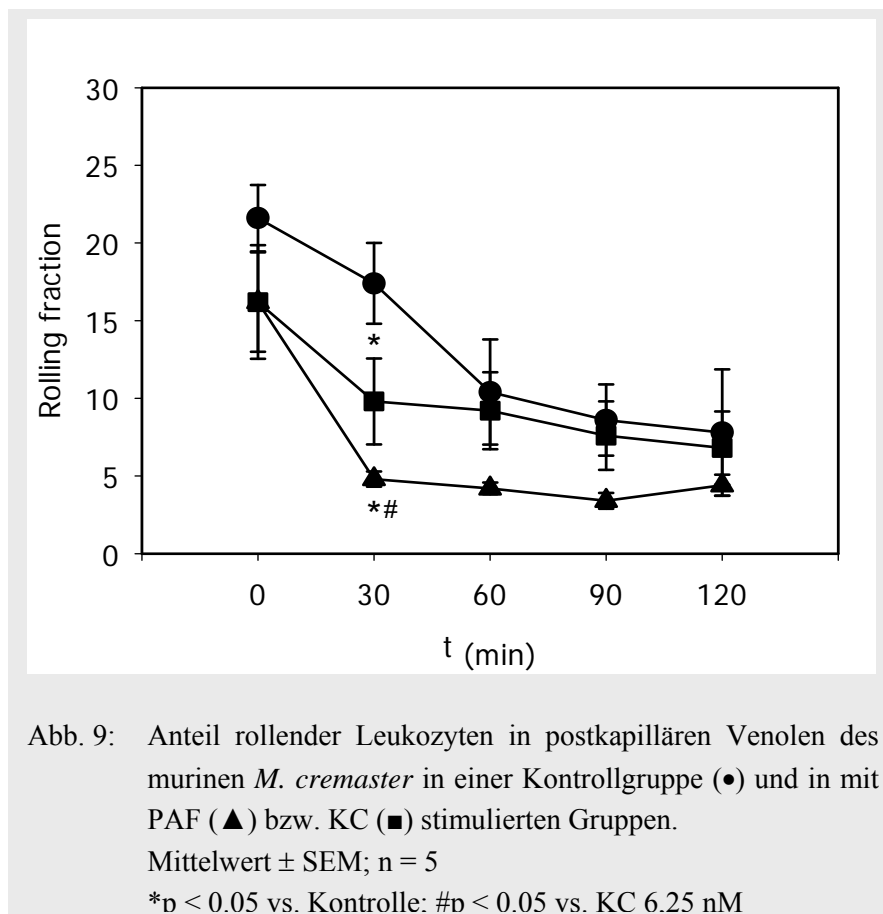
Parameter: Gefäßdurchmesser (D), mittlere Blutfließgeschwindigkeit (V_Q), Wandscherrate (γ); Mittelwert \pm SEM; n = 5; n.s.

Die untersuchten postkapillären Venolen wiesen nahezu identische Gefäßdurchmesser, Blutfließgeschwindigkeiten und Wandscherraten auf.

Aufgrund dieser Übereinstimmung können die in den unterschiedlichen Gruppen erhobenen Daten unmittelbar miteinander verglichen werden (Kim und Sarelius, 2004).

3.1.3.3. Anteil rollender Leukozyten

Der Anteil rollender Leukozyten lag nach Präparation des murinen *M. cremaster* in allen drei Gruppen auf vergleichbarem Niveau (Abb. 9). Die initial erhöhten Prozentsätze (Kontrolle: $21,7 \pm 2,0$; PAF: $16,2 \pm 3,2$; KC: $17,7 \pm 4,7$) erklären sich durch die chirurgische Präparation und sind P-Selektin vermittelt (Kunkel et al., 1996).



In der Kontrollgruppe sank der Anteil rollender Leukozyten im Verlauf des 120 Minuten dauernden Experiments kontinuierlich auf $7,9 \pm 4,1\%$ ab. Durch Zugabe der chemotaktischen Substanzen kam es bereits nach 30 Minuten Stimulation mit 100 nM PAF, bzw. mit 6,25 nM KC zu einer signifikanten Reduktion des Anteils an rollenden Leukozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ferner führte PAF zum Zeitpunkt 30 Minuten zusätzlich zu einer signifikanten Reduktion der Rolling fraction im Vergleich zu KC. Zum Ende des

Beobachtungszeitraumes von 120 Minuten glichen sich alle drei Gruppen auf niedrigem Niveau einander an.

3.1.3.4. Anzahl adhärenter Leukozyten

Als zweiter Schritt der Leukozytenrekrutierung folgt auf das Leukozyten-Rolling die feste Adhärenz der Leukozyten am Endothel. Die Anzahl adhärenter Leukozyten war unter Baseline-Bedingungen in allen Gruppen mit circa einem Leukozyten pro 10000 μm^2 Endotheloberfläche vergleichbar gering (Abb. 10). In der Kontrollgruppe stieg die Anzahl adhärenter Leukozyten über den Versuchszeitraum von 120 Minuten stetig auf durchschnittlich neun Leukozyten pro 10000 μm^2 Endotheloberfläche an.

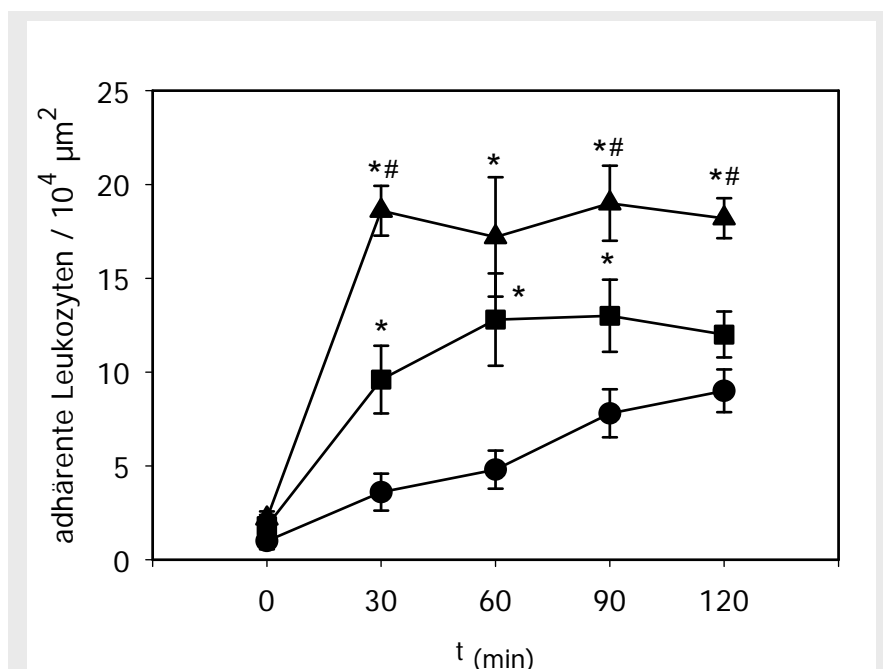


Abb. 10: Anzahl adhärenter Leukozyten in postkapillären Venolen des murinen *M. cremaster* in einer unstimulierten Kontrollgruppe (●) und in mit PAF (▲) bzw. KC (■) stimulierten Gruppen. Mittelwert \pm SEM; n = 5
*p < 0.05 vs. Kontrolle; #p < 0.05 vs. KC 6,25 nM

Dieser Anstieg ist, wie die Abnahme der Rolling fraction, durch die chirurgische Präparation zu erklären. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe stieg die Anzahl in der mit 100 nM PAF behandelten Versuchsgruppe während der ersten 30 Minuten signifikant auf Werte um 17 Leukozyten pro 10000 μm^2 Endotheloberfläche an. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums arrestierte der Wert auf konstant hohem Niveau von durchschnittlich 16 adhärenen Leukozyten.

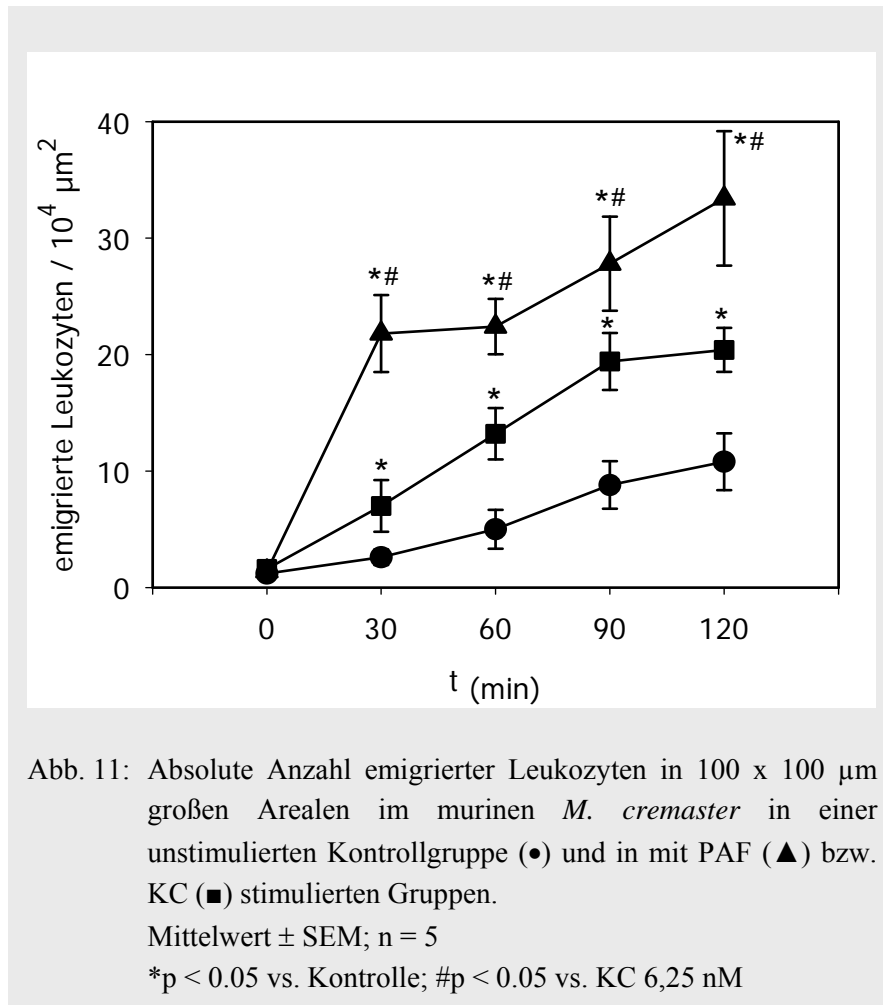
Die Zugabe von KC in einer Konzentration von 6,25 nM führte zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl adhärenen Leukozyten verglichen mit der Kontrollgruppe. Allerdings verlief der Anstieg weniger steil als in der mit 100 nM PAF stimulierten Versuchsgruppe, und ein Plateau war erst nach 60 Minuten mit durchschnittlich 12 adhärenen Leukozyten pro 10000 μm^2 Endotheloberfläche erreicht.

Der Vergleich der inflammatorisch stimulierten Versuchsgruppen untereinander zeigte, dass 100 nM PAF zu einer signifikant höheren Anzahl adhärenen Leukozyten führte als 6,25 nM KC.

3.1.3.5. Anzahl transendothelial migrierter Leukozyten

Unter Baseline-Bedingungen fanden sich nahezu keine Leukozyten im interstitiellen Gewebe (Abb. 11). In der Kontrollgruppe stieg die Anzahl der emigrierten Leukozyten über den Beobachtungszeitraum von 120 Minuten minimal an. Am Versuchsende fanden sich im Mittel zehn emigrierte Leukozyten in dem die postkapilläre Venole umgebenden Gewebe.

Die Zugabe von PAF in einer Konzentration von 100 nM zur Superfusion des *M. cremaster* hatte eine signifikante Steigerung der Emigration von Leukozyten zur Folge. So kam es zu einem steilen Anstieg der Anzahl an emigrierten Leukozyten während der ersten 30 Minuten auf durchschnittlich 21 Leukozyten.



Im Anschluss folgte eine Plateauphase, bis es nach 60 Minuten zu einem zweiten Anstieg der Anzahl emigrierter Leukozyten kam, der bis zum Ende des Experiments andauerte. Nach 120 Minuten fanden sich durchschnittlich 28 emigrierte Leukozyten im perivaskulären Gewebe. Die Stimulation mit KC zeigte eine signifikante Steigerung der Anzahl emigrierter Leukozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Anzahl emigrierter Leukozyten war jedoch signifikant geringer als in der mit PAF stimulierten Versuchsgruppe. Ferner zeigte sich eine divergente Dynamik. Verließ der Anstieg in der PAF-Versuchsgruppe biphasisch, so nahm die Anzahl emigrierter Leukozyten in der KC-Versuchsgruppe kontinuierlich über die ersten 90 Minuten zu, um dann bei circa 21 Leukozyten bis zum Versuchsende zu stagnieren.

3.1.4. Leukozytenrekrutierung in P-Selektin-defizienten Mäusen

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahlen sowie des Hämoglobingehalts im Blutbild zwischen P-Selektin-defizienten ($CD62P^{-/-}$) und Wildtyp-Mäusen ($CD62P^{+/+}$). Pro Versuchstier wurde die Rekrutierung von Leukozyten an 3 bis 5 postkapillären Venolen pro Versuchstier untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden einzig postkapilläre Venolen mit einem Durchmesser von 20–40 μm ausgewählt, die über mindestens 150 μm keine Verzweigungen aufwiesen

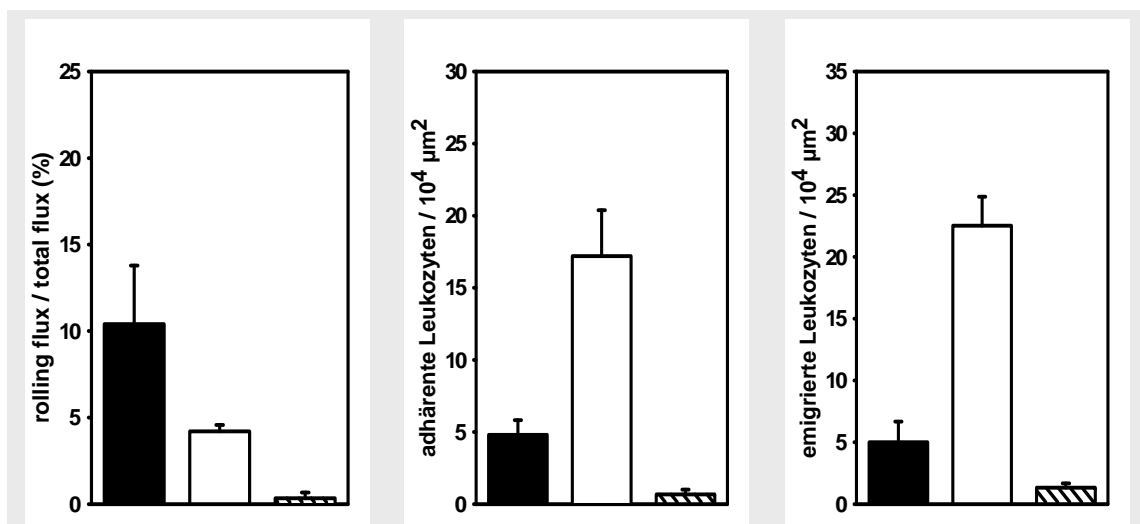


Abb. 12: Anteil rollender sowie Anzahl adhärenter und emigrierter Leukozyten zum Zeitpunkt 60 Minuten. Im linken Panel der Anteil rollender Leukozyten, im mittleren Panel die Anzahl adhärenter Leukozyten und im rechten Panel die absolute Anzahl emigrierter Leukozyten. Der Anteil an rollenden Leukozyten blieb nach 60 Minuten Stimulation mit 100 nM PAF in P-Selektin-defizienten Versuchstieren (▨) deutlich hinter der Anzahl an rollenden Leukozyten in P-Selektin-potenten (□) und unstimulierten (■) Versuchstieren zurück. Ebenso zeigte sich in P-Selektin-defizienten (▨) Versuchstieren die Anzahl an adhärenter und emigrierter Leukozyten gegenüber der P-Selektin-potenten (□) Vergleichsgruppe deutlich reduziert. Mittelwert \pm SEM; n= 3-5

Die untersuchten postkapillären Venolen wiesen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Gefäßdurchmesser, Blutfließgeschwindigkeiten und Wandscherraten auf.

In CD62P^{-/-} Mäusen fand sich während des gesamten Beobachtungszeitraumes von 120 Minuten in mit 100 nM PAF stimulierten postkapillären Venolen kein Leukozyten-Rolling. In CD62P^{-/-} Versuchstieren fanden sich während der ersten 60 Minuten weder adhärente noch emigrierte Leukozyten. Exemplarisch zeigt Abbildung 12 die Untersuchungsergebnisse zum Zeitpunkt 60 Minuten.

3.1.5. Leukozytenrekrutierung in ICAM-1-defizienten Mäusen

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahlen sowie des Hämoglobingehalts im Blutbild zwischen ICAM-1-defizienten (CD54^{-/-}) und Wildtyp-Mäusen (CD54^{+/+}). Pro Versuchstier wurde die Rekrutierung von Leukozyten an 3 bis 5 postkapillären Venolen pro Versuchstier untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden nur postkapilläre Venolen mit einem Durchmesser von 20 – 40 µm ausgewählt, die über mindestens 150 µm keine Verzweigungen aufwiesen. Die untersuchten postkapillären Venolen wiesen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Gefäßdurchmesser, Blutfließgeschwindigkeiten und Wandscherraten auf.

Abbildung 13 stellt graphisch die erhobenen Daten der Leukozytenrekrutierung zum Zeitpunkt 60 Minuten dar.

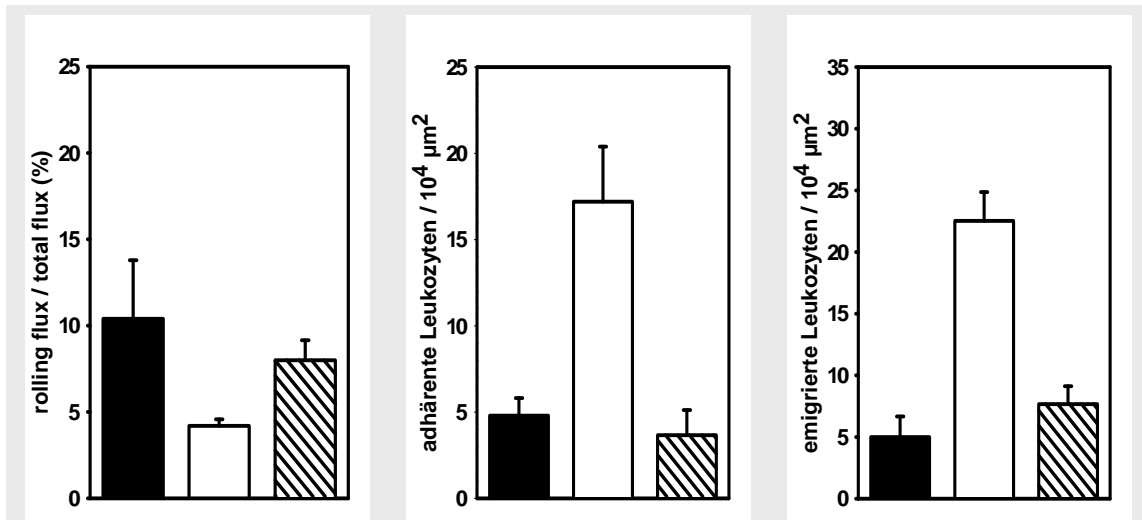


Abb. 13: Anteil rollender sowie Anzahl adhärenter und emigrierter Leukozyten zum Zeitpunkt 60 Minuten. Im linken Panel der Anteil rollender Leukozyten, im mittleren Panel die Anzahl adhärenter Leukozyten und im rechten Panel die Anzahl emigrierter Leukozyten. Der Anteil an rollenden Leukozyten war nach 60 Minuten Stimulation mit 100 nM PAF in CD54^{-/-} Versuchstieren (▨) vergleichbar mit der Anzahl an rollenden Leukozyten in mit 100 nM stimulierten (□) und unstimulierten (■) CD54^{+/+} Versuchstieren. Die Anzahl adhärenter Leukozyten blieb in CD54^{-/-} Mäusen (▨) hinter der unstimulierten CD54^{+/+} Versuchsgruppe (■) zurück. Ebenso zeigte sich in CD54^{-/-} (▨) Versuchstieren die Anzahl an adhärenten und emigrierten Leukozyten gegenüber der CD54^{+/+} (□) Vergleichsgruppe deutlich reduziert. Mittelwert ± SEM; n= 3-5

In CD54^{-/-} Mäusen zeigte sich kein Unterschied im Anteil rollender Leukozyten in mit 100 nM PAF stimulierten postkapillären Venolen im Vergleich zu mit 100 nM PAF stimulierten postkapillären Venolen von CD54^{+/+} Mäusen. Im Gegensatz zu der Kontrollgruppe kam es jedoch in den CD54^{-/-} Mäusen zu keinem Anstieg der Anzahl adhärenter Leukozyten. Erst in den zweiten 60 Minuten zeigte sich ein diskreter Anstieg der Anzahl adhärenter Leukozyten. Die Absolutwerte an adhärenten Leukozyten blieben jedoch drastisch hinter denen der Kontrollgruppe zurück. Die Anzahl an emigrierten Leukozyten in CD54^{-/-} Mäusen war im Vergleich zur PAF-stimulierten Kontrollgruppe deutlich reduziert. Es kam lediglich zu einem langsamen, kontinuierlichen Anstieg der Anzahl emigrierter Leukozyten über den Beobachtungszeitraum von 120 Minuten. Vergleichbar mit den Beobachtungen zur Adhärenz

von Leukozyten blieben die Absolutwerte der emigrierten Leukozyten deutlich unter denen der Kontrollgruppe.

3.2. Analyse der Rolle der Serinproteasen ELA2 und PRTN3 während der Leukozytenrekrutierung

Der Anteil rollender Leukozyten, die Anzahl adhärenter und emigrierter Leukozyten sowie die interstitielle Migration der emigrierten Leukozyten wurde mittels RLOT-Mikroskopie im *M. cremaster* visualisiert und quantifiziert. PAF in einer Konzentration von 100 nM diente als inflammatorischer Stimulus.

3.2.1. ELA2/PRTN3-defiziente Mäuse

Die zuvor genannten Parameter wurden in ELA2/PRTN3-defizienten (ELA2/PRTN3^{-/-}) und zum Vergleich in ELA2/PRTN3-potenten (ELA2/PRTN3^{+/+}) Mäusen analysiert. Pro Versuchsgruppe wurden 7 Tiere untersucht.

3.2.1.1. Blutbild

Die unter Versuchsbedingungen erhobenen Blutbilder sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Erythrozyten- (RBC), Leukozyten- (WBC) und Thrombozytenzahlen (PLT) sowie des Hämoglobingehalts (Hb).

Tab. 3: Peripheres Blutbild unter Versuchsbedingungen

	RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)
ELA2/PRTN3 +/+	$6,3 \pm 0,5$	$6,2 \pm 0,6$	266 ± 24	$12,4 \pm 0,8$
ELA2/PRTN3 -/-	$6,6 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,3$	272 ± 26	$13,5 \pm 0,7$

Parameter: Erythrozyten- (RBC), Leukozyten- (WBC) und Thrombozytenzahlen (PLT), Hämoglobingehalt (Hb) im arteriellen Blut. Mittelwert \pm SEM; n= 7; n.s.

3.2.1.2. Gefäßdurchmesser und Mikrohämodynamik

Pro Versuchstier wurde die Rekrutierung von Leukozyten an 3 bis 5 postkapillären Venolen untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden einzig postkapilläre Venolen mit einem Durchmesser von 20 – 40 μm ausgewählt, die über mindestens 150 μm keine Verzweigungen aufwiesen. Die Blutfließgeschwindigkeit wurde gemessen und in ihrer Abhängigkeit die Wandscherrate γ berechnet.

Tab. 4: Gefäßdurchmesser und Mikrohämodynamik in postkapillären Venolen des murinen *M. cremaster* unter Versuchsbedingungen

	D (μm)	V_Q (mm/s)	γ (s^{-1})
ELA2/PRTN3 $+/+$	$30,7 \pm 1,5$	$2,5 \pm 0,3$	653 ± 73
ELA2/PRTN3 $-/-$	$30,2 \pm 1,2$	$2,9 \pm 0,3$	774 ± 91

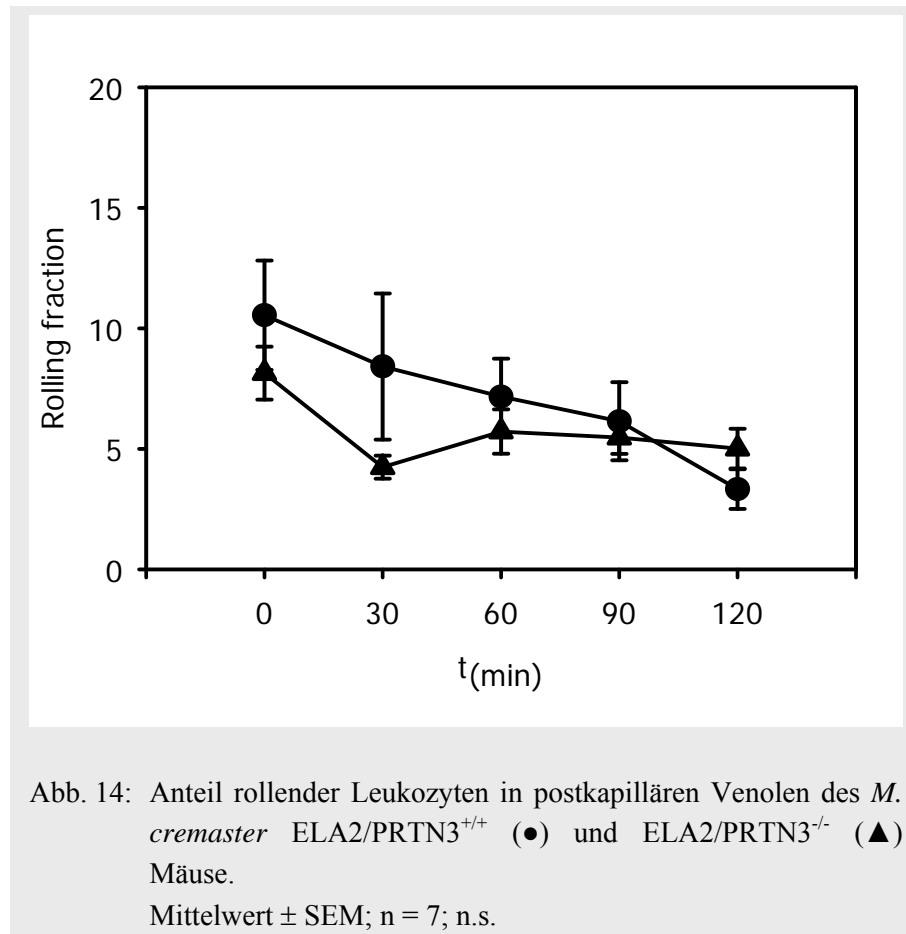
Parameter: Gefäßdurchmesser (D), mittlere Blutfließgeschwindigkeit (V_Q), Wandscherrate (γ). Mittelwert \pm SEM; n= 7; n.s.

Die untersuchten postkapillären Venolen wiesen nahezu identische Gefäßdurchmesser, Blutfließgeschwindigkeiten und Wandscherraten auf. Aufgrund dieser Übereinstimmung können die in den unterschiedlichen Gruppen erhobenen Daten unmittelbar miteinander verglichen werden (Kim und Sarelius, 2004).

3.2.1.3. Anteil rollender Leukozyten

Nach Präparation des *M. cremaster* fanden sich vergleichbare Werte für den Anteil an rollenden Leukozyten in ELA2/PRTN3 $^{+/+}$ und ELA2/PRTN3 $^{-/-}$ Versuchstieren (Abb. 14). Durch topische Zugabe von 100 nM PAF nach den Baseline-Untersuchungen mit einem

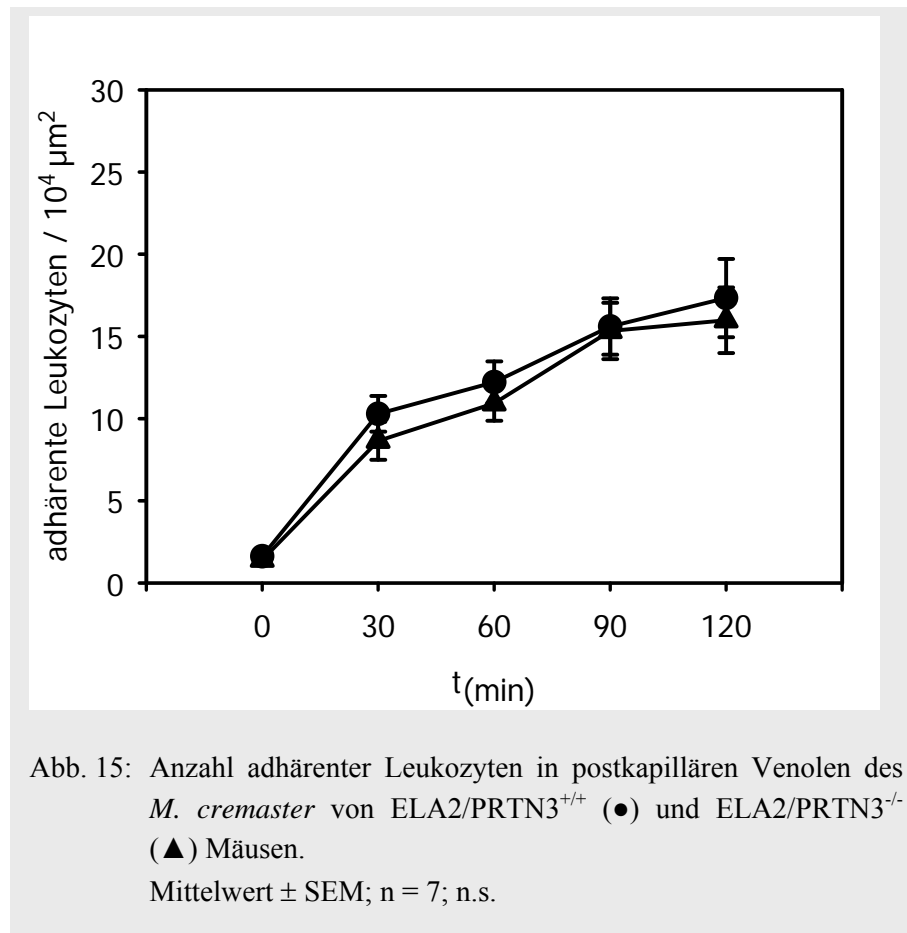
präparationsbedingt erhöhten Anteil an rollenden Leukozyten kam es zu einer vergleichbaren Reduktion rollender Leukozyten in beiden Gruppen.



3.2.1.4. Anzahl adhärenter Leukozyten

Unter Baseline-Bedingungen fanden sich in beiden Versuchsgruppen nur vereinzelte adhärenente Leukozyten (ELA2/PRTN3^{+/+}: 1,6/10⁴ μm²; ELA2/PRTN3^{-/-}: 1,4/10⁴ μm²; Abb. 15). Nach Stimulation mit 100 nM PAF stieg die Anzahl an adhärenenten Leukozyten in beiden Versuchsgruppen kontinuierlich, nahezu parallel auf finale Werte von ca. 17 pro 10000 μm² Endotheloberfläche in den ELA2/PRTN3^{+/+} und ca. 16 pro 10000 μm² in den ELA2/PRTN3^{-/-} Versuchstieren nach 120 Minuten an. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt fand sich ein

signifikanter Unterschied in der Anzahl an adhärenenten Leukozyten zwischen den Versuchsgruppen.

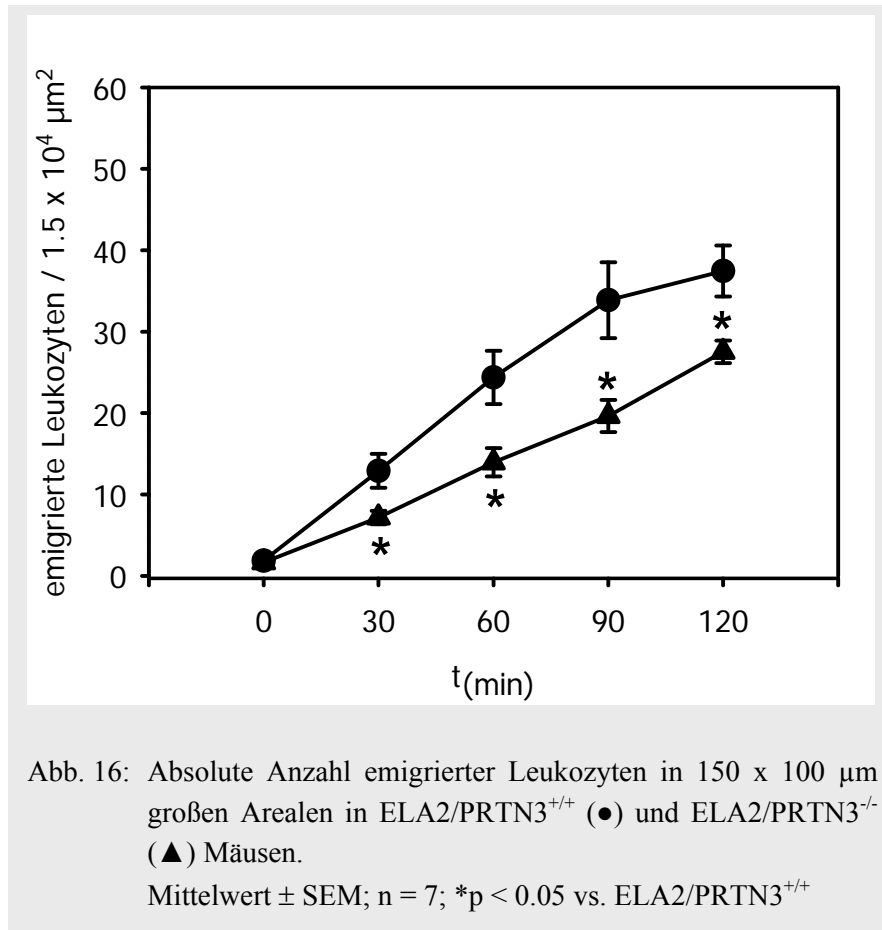


3.3.1.5. Anzahl transendothelial migrierter Leukozyten

Die Anzahl emigrierter Leukozyten wurde in 75 x 100 μm großen Arealen zu beiden Seiten der ausgewählten postkapillären Venolen quantifiziert. Zu Beginn der Untersuchung fanden sich in beiden Gruppen nur vereinzelt emigrierten Leukozyten (ELA2/PRTN3^{+/+}: 1,2/1,5x10⁴ μm²; ELA2/PRTN3^{-/-}: 1,4/1,5x10⁴ μm²).

Während es in den ELA2/PRTN3^{+/+} Mäusen zu einer kontinuierlichen Akkumulation emigrierter Leukozyten über den Versuchszeitraum von 120 Minuten kam, emigrierte in den

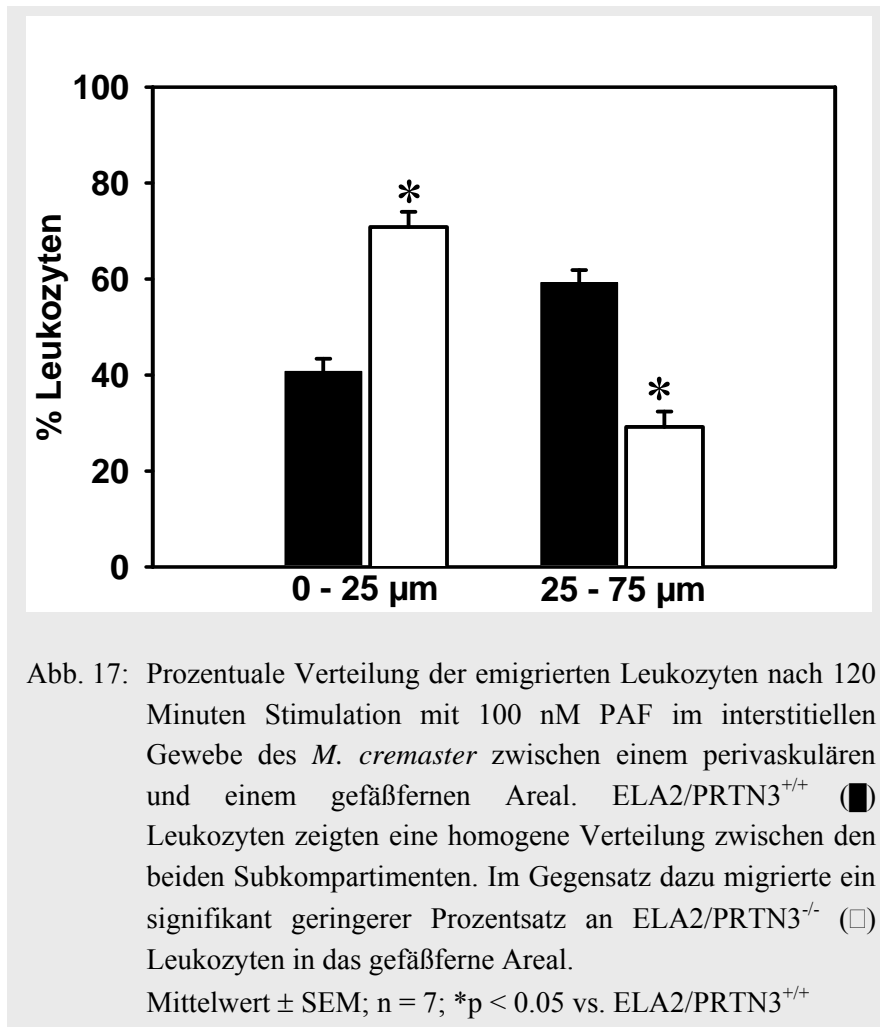
ELA2/PRTN3^{-/-} Versuchstieren eine signifikant geringere Anzahl an Leukozyten. Nach 120 Minuten waren in den ELA2/PRTN3^{-/-} Versuchstieren durchschnittlich 30% weniger Leukozyten emigriert (Abb. 16).



3.3.1.6. Interstitielle Migration von Leukozyten

Um die Bedeutung von ELA2 und PRTN3 auf den Prozess der interstitiellen Migration von emigrierten Leukozyten zu untersuchen, wurde die Verteilung der emigrierten Leukozyten im interstitiellen Gewebe analysiert.

Hierfür wurden die zuvor festgelegten 75 x 100 μm großen Areale in zwei Subkompartimente unterteilt. Es ergaben sich ein 25 x 100 μm großes perivaskuläres sowie ein 50 x 100 μm großes gefäßfernes Areal zu beiden Seiten der untersuchten postkapillären Venole.



In ELA2/PRTN3^{+/+} Versuchstieren zeigte sich eine homogene Verteilung der emigrierten Leukozyten. Nach 120 Minuten Stimulation mit 100 nM PAF fanden sich durchschnittlich 40 % der emigrierten Leukozyten im perivaskulären Areal (Abb. 17). Im Gegensatz dazu zeigten ELA2/PRTN3^{-/-} Leukozyten eine verminderte Migrationsbereitschaft. So befand sich nach 120 Minuten ein signifikant größerer Anteil von 70 % der emigrierten Leukozyten im perivaskulären Areal. Videosequenzen, die nach 90 Minuten Stimulation mit PAF aufgenommen wurden, veranschaulichen das unterschiedliche Migrationsverhalten der ELA2/PRTN3^{+/+} und ELA2/PRTN3^{-/-} Leukozyten.

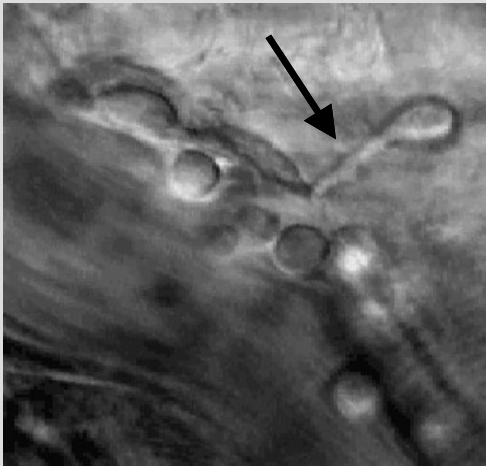


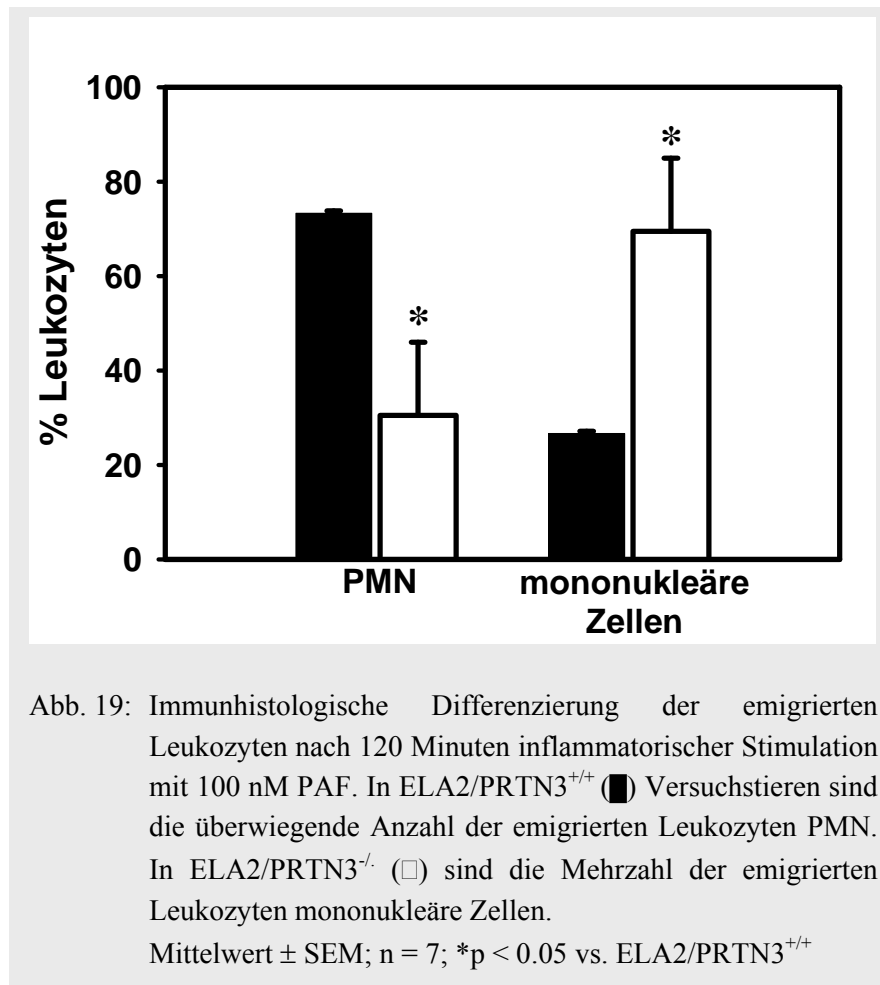
Abb. 18: Standbild aus einer Videosequenz nach 90 Minuten Stimulation des *M. cremaster* eines ELA2/PRTN3^{-/-} Versuchstieres mit 100nM PAF. Auf der linken Bildhälfte ist eine postkapilläre Venole mit einigen intravasalen Leukozyten zu erkennen. Ein Pfeil weist auf den Uropod eines transmigrierenden Leukozyten, der am Endothel zu verharren scheint.

Diese Videosequenzen zeigen deutlich die herabgesetzte Beweglichkeit der interstitiell migrierenden Leukozyten. Vielfach hat es den Anschein, als ob ELA2/PRTN3^{-/-} Leukozyten am Endothel (Abb. 18) mit ihrem Uropod verharren.

3.3.1.7. Immunhistologische Differenzierung emigrierter Leukozyten

Da die RLOT-Mikroskopie keine Differenzierung der verschiedenen leukozytären Subpopulation erlaubt, wurden hierfür immunhistologische Analysen durchgeführt. Paraffinschnitte des *M. cremaster* wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen das Panleukozytenantigen CD45 und das für PMN spezifische Antigen Ly-6G (Gr1) inkubiert.

In ELA2/PRTN3^{+/+} Mäusen waren durchschnittlich 78 % der emigrierten Leukozyten positiv für CD45 und Ly-6G (Abb. 19) und somit als PMN zu identifizieren.



In ELA2/PRTN3^{-/-} Versuchstieren waren lediglich durchschnittlich 34 % der emigrierten Leukozyten PMN.

Abbildung 20 zeigt zwei Beispiele histologischer Schnitte, welche mit LY-6G Antikörpern gefärbt wurden. Auch in der Histologie findet sich das bereits mittels Intravitalmikroskopie beschriebene interstitielle Verteilungsmuster emigrierter Leukozyten. In ELA2/PRTN3^{+/+} Versuchstieren (Abb. 20B) verteilen sich die emigrierten Leukozyten homogen über den gesamten histologischen Schnitt. Im Vergleich dazu konzentrieren sich emigrierte Leukozyten in ELA2/PRTN3^{-/-} Versuchstieren um die postkapillären Venolen (Abb. 20A).

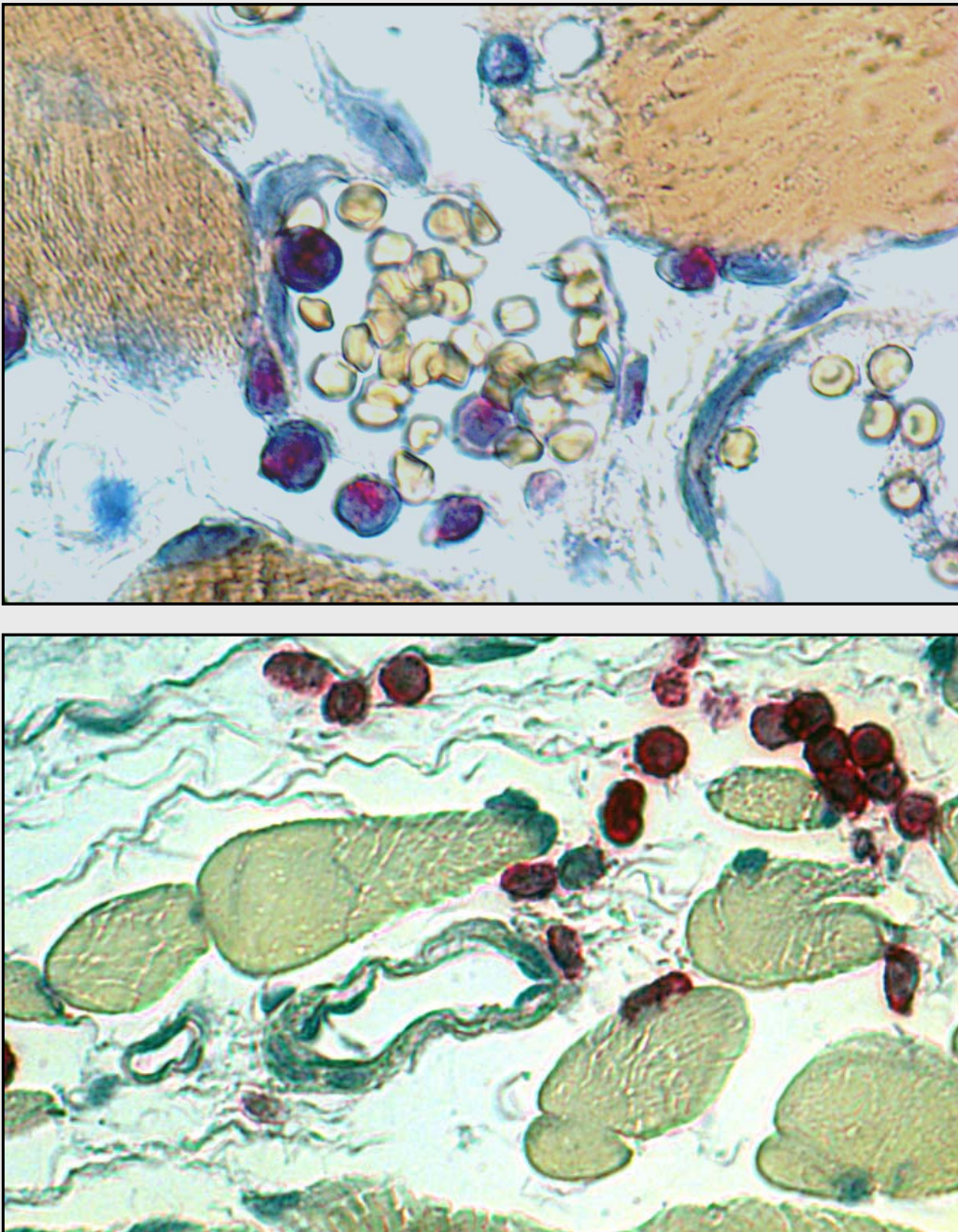


Abb. 20: Histologische Schnittpräparate gewonnen aus *Mm. cremasteres* nach 120 Minuten inflammatorischer Stimulation mit 100 nM PAF. Die leukozytären Zellen wurden mittels monoklonalen Antikörpern gegen das für PMN spezifische Antigen Ly-6G angefärbt (rot). (A) postkapilläre Venole mit umgebenden ELA2/PRTN3^{-/-} PMN. (B) ELA2/PRTN3^{+/+} PMN homogen im gesamten interstitiellen Raum

3.3.2. Pharmakologische Inhibition der Serinprotease ELA2

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus den Versuchen mit ELA2/PRTN3-defizienten Mäusen wurden die Auswirkungen einer pharmakologischen Inhibition der ELA2 und PRTN3 mittels des synthetischen Inhibitors ONO-5046 analysiert. Entsprechend den vorhergehenden Versuchen mit ELA2/PRTN3^{-/-} Mäusen wurde die Leukozytenrekrutierung in Versuchstieren des Stamms SV129 an der Präparation des murinen *M. cremaster* mit Hilfe der RLOT-Mikroskopie visualisiert und im Anschluss off-line quantifiziert. PAF in einer Konzentration von 100 nM in der topischen Superfusion diente als inflammatorischer Stimulus. Es wurden 7 Versuchstiere pro Gruppe untersucht.

3.3.2.1. Blutbild

Die unter Versuchsbedingungen erhobenen Blutbilder sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Erythrozyten- (RBC), Leukozyten- (WBC) und Thrombozytenzahlen (PLT) sowie des Hämoglobingehalts (Hb) im peripheren Blut.

Tab.5: Blutbild unter Versuchsbedingungen

	RBC (10 ⁶ /μl)	WBC (10 ³ /μl)	PLT (10 ³ /μl)	Hb (g/dl)
Kontrollgruppe	5,6 ± 0,5	3,7 ± 0,4	491 ± 95	11,2 ± 0,6
ONO-5046	6,7 ± 0,6	3,2 ± 0,5	322 ± 41	12,9 ± 0,4

Parameter: Erythrozyten- (RBC), Leukozyten- (WBC) und Thrombozytenzahlen (PLT), Hämoglobingehalt (Hb) im arteriellen Blut.

3.3.2.2. Gefäßdurchmesser und Mikrohämodynamik

Pro Versuchstier wurde die Rekrutierung von Leukozyten an 3 postkapillären Venolen untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden einzig postkapilläre Venolen mit einem Durchmesser von 20 – 40 μm ausgewählt, die über mindestens 150 μm keine Verzweigungen aufwiesen. Die Blutfließgeschwindigkeit wurde gemessen und in ihrer Abhängigkeit die Wandscherrate γ berechnet.

Tab. 6: Gefäßdurchmesser und Mikrohämodynamik in postkapillären Venolen des murinen *M. cremasters* unter Versuchsbedingungen

	D (μm)	V_Q (mm/s)	γ (s^{-1})
Kontrollgruppe	$25,6 \pm 0,9$	$3,1 \pm 0,2$	973 ± 79
ONO-5046	$23,8 \pm 1,2$	$3,5 \pm 0,2$	1183 ± 75

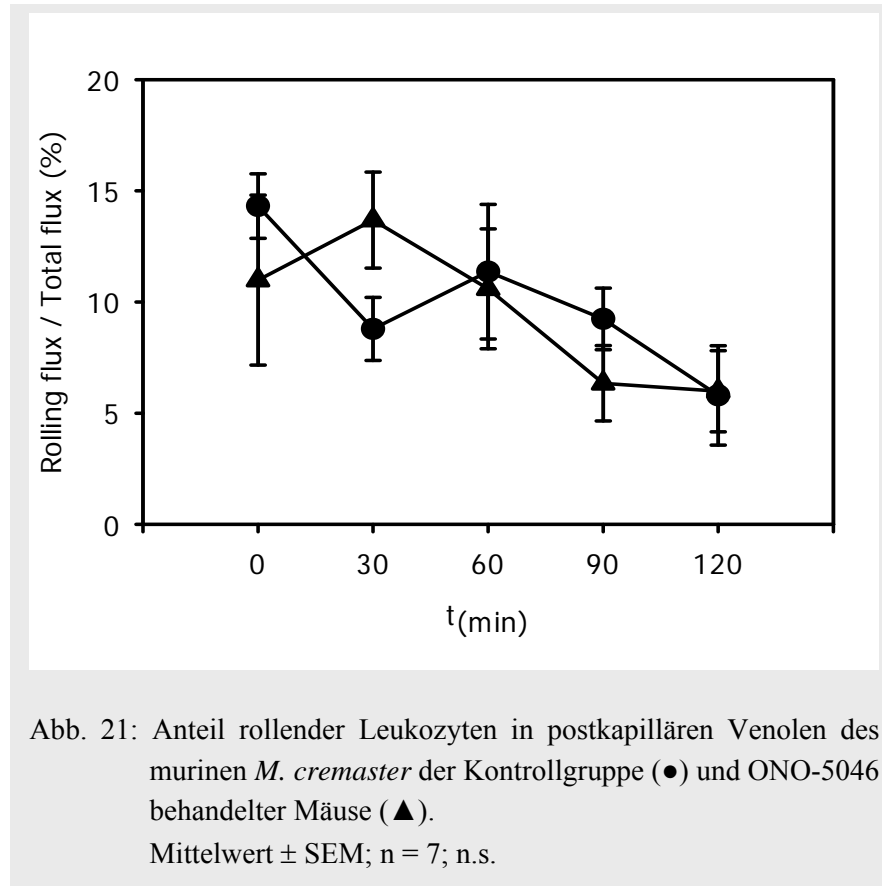
Parameter: Gefäßdurchmesser (D), mittlere Blutfließgeschwindigkeit (V_Q), Wandscherrate (γ)

Die untersuchten postkapillären Venolen wiesen nahezu identische Gefäßdurchmesser, Blutfließgeschwindigkeiten und Wandscherraten auf. Aufgrund dieser Übereinstimmung können die in den unterschiedlichen Gruppen erhobenen Daten unmittelbar miteinander verglichen werden (Kim und Sarelius, 2004).

3.3.2.3. Anteil rollender Leukozyten

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse graphisch zusammengefasst. Der Anteil rollender Leukozyten lag nach Präparation des *M. cremaster* in beiden Gruppen auf vergleichbarem Niveau. Wie bereits erläutert, erklärt sich der initial erhöhte Prozentsatz an rollenden Leukozyten durch die chirurgische Präparation. Nach den Baseline-Untersuchungen wurde

PAF in einer Konzentration von 100 nM zur Superfusion des *M. cremasters* hinzugefügt. Die Verumgruppe erhielt über einen venösen Katheter den pharmakologischen ELA2 Inhibitor ONO-5046 bis zu einer finalen Konzentration von 90 mg/kg KG.

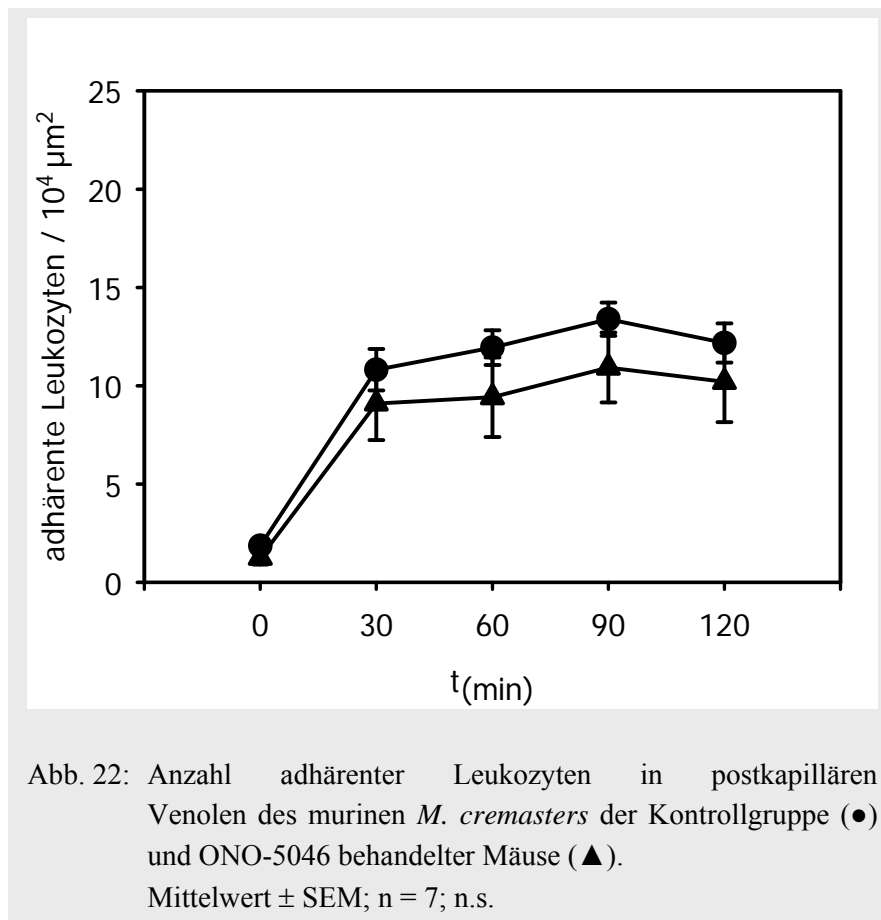


Die Kontrollgruppe erhielt die identische Menge an NaCl jedoch ohne Wirksubstanz. Im Verlauf des Experiments nahm der Anteil rollender Leukozyten ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ab, um in beiden Versuchsgruppen nach 120 Minuten auf identischem Niveau zu enden.

3.3.2.4. Anzahl adhärenter Leukozyten

Die Anzahl adhärenter Leukozyten war zu Beginn des Experiments in beiden Versuchsgruppen auf identischem Niveau (Abb. 22). Nach Stimulation mit 100 nM PAF stieg die Anzahl der adhärenter Leukozyten sowohl in der Kontrollgruppe wie auch in der mit

ONO-5046 behandelten Versuchsgruppe während der ersten 30 Minuten steil an, um sich dann für die restlichen 90 Minuten auf hohem Niveau zu stabilisieren.

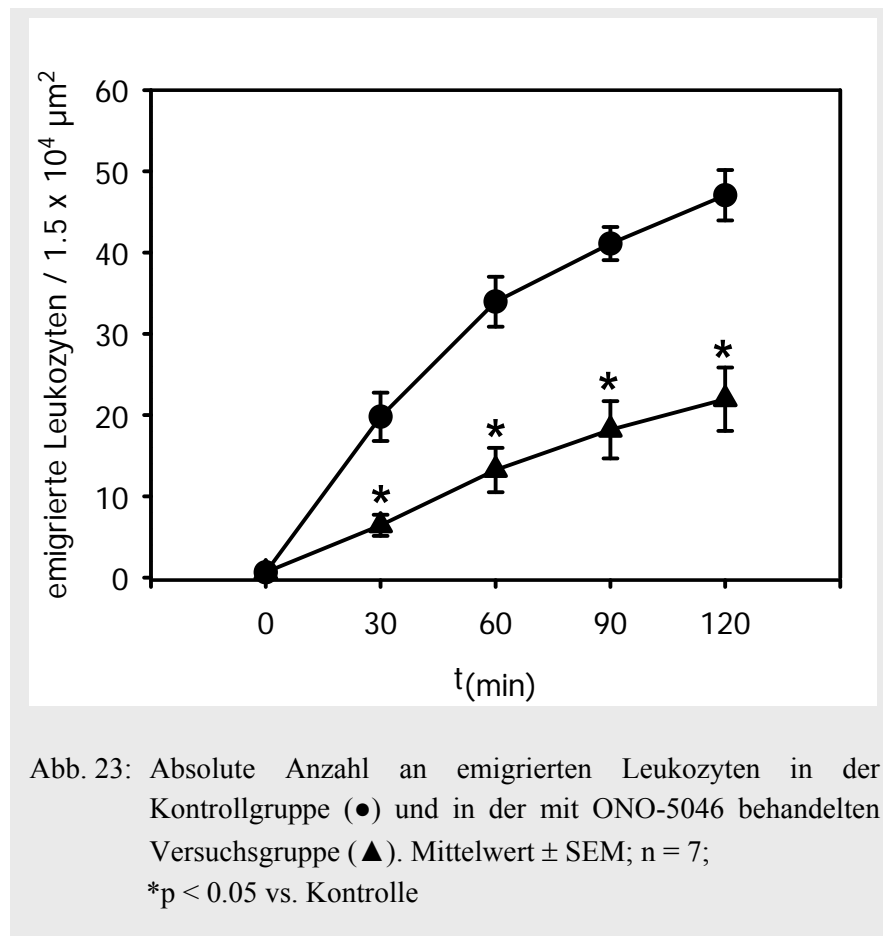


Es zeigte sich für den gesamten Versuchszeitraum kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppen und der mit ONO-5046 behandelten Versuchsgruppe.

3.3.2.5. Anzahl transendothelial migrierter Leukozyten

Die Anzahl emigrierter Leukozyten wurde in rechtwinkligen 75 x 100μm großen Arealen zu beiden Seiten der untersuchten postkapillären Venole quantifiziert. Unter Baseline-Bedingungen fanden sich in beiden Versuchsgruppen nur vereinzelt emigrierte Leukozyten. In der Kontrollgruppe induzierte 100 nM PAF während der ersten 60 Minuten einen steilen Anstieg der Anzahl emigrierter Leukozyten (Abb. 23). In den zweiten 60 Minuten nahm die Anzahl an emigrierten Leukozyten nur noch geringfügig zu. Im Gegensatz dazu emigrierten

in der mit ONO-5046 behandelten Versuchsgruppe über den gesamten Versuchszeitraum signifikant weniger Leukozyten als in der Kontrollgruppe.



Die Infusion von ONO-5046 führte nach 120 Minuten Stimulation mit 100 nM PAF zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl emigrierter Leukozyten (21.9 ± 3.9 vs. 47.0 ± 3.1 ; n/1.5 x $10^4 \mu\text{m}^2$, Mittelwert ± SEM).

3.3.2.6. Immunhistologische Differenzierung emigrierter Leukozyten

In den mit ONO-5046 behandelten Versuchstieren zeigte sich wie bei den Untersuchungen mit ELA2/PRTN3^{-/-} Versuchstieren eine signifikante Reduktion an emigrierten PMN (Abb. 24). In der Kontrollgruppe war ein signifikant höherer Prozentsatz der emigrierten Zellen

positiv für CD45 und Ly-6G als in der mit ONO-5046 behandelten Versuchsgruppe ($70.8 \pm 6.9\%$ vs. $53.5 \pm 0.7\%$).

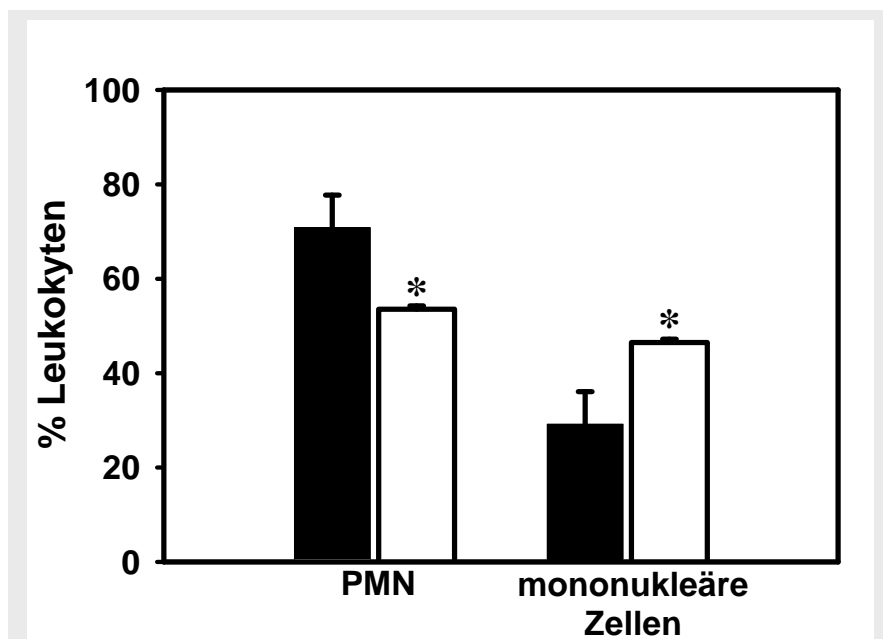


Abb. 24: Immunhistologische Differenzierung der emigrierten Leukozyten nach 120 Minuten inflammatorischer Stimulation mit 100 nM PAF. In der mit dem Proteaseninhibitor ONO-5046 behandelten Versuchsgruppe (□) waren prozentual signifikant weniger PMN unter den emigrierten Leukozyten als in der Kontrollgruppe (■).

Mittelwert \pm SEM; n = 7; *p < 0.05 vs. Kontrolle

4. Diskussion

4.1. RLOT-Mikroskopie

Die mikroskopische Abbildung ungefärbter Objekte ist auf prinzipiell zwei Wegen möglich. Einerseits verändern lichtabsorbierende Strukturen, wie zum Beispiel Pigmente, den Kontrast, indem die Amplitude der Wellenlänge des durchdringenden Lichts reduziert wird. Die Mehrzahl biologischer Objekte besitzt allerdings einen zu geringen Anteil an geeignetem Kontrast-induzierenden Pigments, um eine ausreichende Kontrastierung zu erreichen. Andererseits sind Unterschiede in Brechungsindizes in biologischen Strukturen nahezu ubiquitär vorhanden. In der Phasenkontrast- (Zernike, 1942), der differentiellen Interferenz- (Nomarski, 1945) und der Hoffman modulation contrast Mikroskopie (Hoffman, 1975) nutzt man diese schon seit langem.

Die Unterschiede der Brechungsindizes ermöglichen die Visualisierung struktureller Details in lebenden, unmarkierten Untersuchungsobjekten. Trotz dieser Möglichkeiten fanden diese Mikroskopiermethoden bisher, mit Ausnahme von Untersuchungen an *C. elegans* (Thomas et al., 1996), kaum Eingang in die Intravitalmikroskopie. Gründe hierfür mögen die Notwendigkeit eines Polarisators, spezifischer Filter und insbesondere deren präzise optische Ausrichtung bei häufig räumlich eingeschränkten Bedingungen in der Intravitalmikroskopie gewesen sein. Intravitale Reflected Light Oblique Transillumination-(RLOT) Mikroskopie ermöglicht die Übersetzung optischer Gradienten in lebenden Objekten in Intensitätsunterschiede im mikroskopischen Abbild. Dies erlaubt die Darstellung morphologischer Details in ungleichmäßigen Strukturen, wie zum Beispiel in interstitiellem Gewebe. Der schräg unterhalb des zu untersuchenden Präparats liegende Reflektor dient zur Ablenkung und Aufspaltung des durchdringenden Lichts in zu den optischen Achsen des Mikroskops versetzt liegenden Richtungen. Wie Abbildung 2 zeigt, schließt dies Anteile des reflektierten Lichts (S_{-1} – S_{-3}), die außerhalb der Apertur der Objektivlinse liegen, aus. Allerdings gehen die

verbleibenden Strahlengänge (S_1 – S_3), die phasenverschoben gegen den ungebrochenen, direkten Lichtstrahl (S_0) verlaufen, konstruktive und destruktive Interferenzen mit dem direkten Lichtstrahl im zu untersuchenden Präparat ein. Diese führen zu sowohl verstärkten wie auch verminderten Kontrastierungen in der mikroskopischen Abbildung (Ellis, 1978). Wenn Lichtstrahlen ein Objekt in paralleler Richtung zu der optischen Achse transilluminieren, wie es in der konventionellen Hellfeldmikroskopie geschieht, summieren sich die „side-bands“ des gebrochenen, reflektierten Lichts in der Summe auf 90° außerhalb der Phase des direkten Lichtstrahls. Das verhindert das Auftreten von konstruktiven oder destruktiven Interferenzen (Zernike, 1942). Differentielle Brechungsindizes innerhalb der Gewebe schaffen Phasenunterschiede zwischen gebrochenen und ungebrochenen Lichtstrahlen. Hierbei entstehen Interferenzen, die als unterschiedliche Lichtintensitäten und Kontrastierungen im mikroskopischen Abbild imponieren. Da die Entstehung solcher Abbildungen nicht von der Lichtabsorption abhängig ist, kommt in der RLOT-Mikroskopie nah-infrarotes Licht der Wellenlänge ($\lambda=700$ nm) zu Anwendung, um die Absorption von intravasalem Hämoglobin und muskulärem Myoglobin zu minimieren und die Eindringtiefe in das Gewebe zu maximieren (MacVicar, 1984).

In einer früheren Studie nutzten MacDonald und Kollegen einen ähnlichen Ansatz, um Abbildungen der Mikrozirkulation solider Organe, wie Leber, Milz oder Pankreas mit hoher Kontrastierungen zu erhalten (MacDonald et al., 1987). Indem sie ihre Untersuchungsobjekte auf die transparente Bühne eines invertierten Mikroskops platzierten und diese von oben herab transilluminieren, generierten sie Abbildungen der Organoberflächen (MacDonald et al., 1987). So gelang die „Transillumination“ solider Organe, da das Licht nicht das gesamte Organ durchdringen musste, bevor es die Objektivlinse erreichte. Damit gelingt eine geringe Ablenkung der Lichtstrahlen im Gewebe. Diese Methode ist allerdings direkt abhängig von der Zugänglichkeit der zu untersuchenden Organe. Bei RLOT wird der Reflektor unterhalb des Präparats positioniert und erweitert somit die Anzahl potentieller Untersuchungsobjekte.

In der RLOT-Mikroskopie dient die Objektivlinse gleichzeitig zur Illumination wie auch zur Lichtsammlung, was zu einer weiteren Optimierung der Bildqualität beiträgt (Koehler Illumination).

Obwohl der Fortschritt der Multiphotonenmikroskopie (Denk et al., 1990) ein wirksames Werkzeug zur Untersuchung tiefliegender organischer Strukturen in lebenden Organismen mittels Fluoreszenzmarkern erlaubt, schränken die hohen Kosten einen flächendeckenden Einsatz ein. Ferner hängt Multiphotonenmikroskopie von der Verfügbarkeit spezifischer Fluoreszenzmarker ab. Schließlich schließt die relativ langsame Aufzeichnungsgeschwindigkeit (scan rate) die Untersuchung schneller dynamischer Vorgänge aus. Im Gegensatz dazu erlaubt RLOT-Mikroskopie die Visualisierung und Analyse dynamischer Vorgänge mit Videorate und ist unabhängig von Fluoreszenzmarkern. Nichtsdestotrotz lässt sich RLOT-Mikroskopie gut mit der klassischen Fluoreszenzmikroskopie kombinieren. Als limitierender Faktor ist die Voraussetzung der Transillumination zu nennen. Allerdings erfüllen eine Reihe von Geweben wie der *M. cremaster* der Maus oder der Ratte (Hickey et al., 2000; Dangerfield et al., 2002), das Mesenterium der Maus oder der Ratte (Thompson et al., 2000; McLean et al., 2000), sowie die Hamsterbackentasche (Raud et al., 1989) diese Anforderung und eignen sich so potentiell zur Untersuchung dynamischer Prozesse innerhalb des extravaskulären Kompartiments. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Präparation des murinen *M. cremaster* gewählt. Als inflammatorischer Stimulus dienten KC, ein murines Analog zum humanen IL-8, und PAF. Diese Stimuli kamen bereits in vorhergehenden Studien zum Einsatz (Woodman et al., 1993; Young et al., 1994). Die biologischen Effekte von PAF auf das ungefensterte Endothel im *M. cremaster* sind in der Literatur beschrieben. Folge einer Stimulation sind die Öffnung der interzellulären Verbindungen zwischen den Endothelzellen, eine erhöhte Gefäßpermeabilität, und die rasche Fenestrierung der Kapillaren und postkapillären Venolen (Predescu et al., 1996).

In den Mikrogefäßen des großen Kreislaufs wurden rollende Leukozyten bereits 1889 von Cohnheim beobachtet (Cohnheim, 1889) und 1972 von Atherton und Born quantifiziert (Atherton und Born, 1972). Die feste Adhärenz von Leukozyten am Gefäßendothel wurde erstmals 1824 von Dutrochet beschrieben (Dutrochet, 1824) und wird als Vorstufe der Diapedese von Leukozyten in das extravaskuläre, interstitielle Gewebe angesehen (Hogg und Berlin, 1995; Springer, 1994; von Andrian et al., 1991). Rollen und Adhärenz von Leukozyten am Endothel sind in zahlreichen Mikrogefäßen des großen Kreislaufs beschrieben, u. a. in Mesenterialgefäßen von Ratten (Asako et al., 1994; Ley et al., 1988) und Kaninchen (Fiebig et al., 1991; von Andrian et al., 1992), in Pankreas- (Hoffmann et al., 1995; Hoffmann et al., 1996) und Uveagefäßen (Baatz et al., 1995) von Ratten, in der Hamsterbackentasche (Atherton und Born, 1972), in Hautgefäßen von Mäusen (Mayrovitz, 1992), im *M. cremaster* von Mäusen (Hickey et al., 2000) und im Skelettmuskel der Ratte (Ferguson et al., 1982; Mayrovitz et al., 1987), des Hamsters (Lehr et al., 1991; Menger et al., 1992; Nolte et al., 1992) und der Maus (Nolte et al., 1994; Nolte et al., 1994²).

Für die Präparation des *M. cremaster* konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass es durch die chirurgisch Präparation des Muskels zu einer Aktivierung des Endothels und daraus folgend zu einem Anstieg des Leukozyten-Rollings kommt. Das Leukozyten-Rolling nimmt in der unstimulierten Kontrollgruppe nach einem Höchstwert zu Baseline-Bedingungen über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich ab. In der Folge zeigt sich ein geringer Anstieg der Anzahl adhärenter und transendothelial migrierter Leukozyten. Diese Phänomene sind in der Literatur bereits beschrieben (Kunkel et al., 1987). Durch die topische Applikation der chemotaktischen Substanzen PAF oder KC können akute inflammatorische Ereignisse simuliert werden. RLOT-Mikroskopie ermöglicht die *in vivo* Visualisierung und Quantifizierung rollender, adhärenter und interstitiell verweilender Leukozyten in der Präparation des *M. cremaster* der Maus. Die Wahl der Maus als Versuchstier birgt mehrere Vorteile. Sie ist das immunologisch am besten charakterisierte Versuchstier, ferner stehen

genmodifizierte Versuchstiere zur Verfügung, und schließlich ist eine Vielzahl von Antikörpern verfügbar.

Um zu prüfen ob Interventionen im Rekrutierungsprozess, wie zum Beispiel das Fehlen von Adhäsionsmolekülen in der Kombination von RLOT-Mikroskopie und Präparation des *M. cremaster* detektierbar seien, wurden P-Selektin- (CD62P^{-/-}) bzw. ICAM-1- (CD54^{-/-}) defiziente Mäuse untersucht. Sulfatierte Glykane inhibieren selektiv das Rollen von Leukozyten am Endothel der Mikrogefäße verschiedener Organe. Ley und Kollegen beobachteten 1989 erstmals diesen Effekt für das sulfatierte Polysaccharid Dextransulfat an kultivierten Endothelzellen (Ley et al., 1989). Diese Untersuchungen lieferten erste Hinweise auf ein Integrin-unabhängiges Rezeptor-Liganden-System, das das Rollen der Leukozyten über Glykoproteine oder Glykolipide mit sulfatierten Seitenketten mediiert. Die Identifikation der Selektine als die das Rollen der Leukozyten mediierenden Adhäsionsmoleküle (Abbassi et al., 1991; Bevilacqua et al., 1994; Geng et al., 1990; Hallman et al., 1991; Hogg und Berlin; 1995; Kishimoto et al., 1991; Spertini et al., 1991) führte zum Konzept der endothelialen und leukozytären Adhäsionsmoleküle des Leukozytenrollens. P-Selektin wird insbesondere vom venulären, weniger vom arteriellen Endothel exprimiert (McEver et al., 1989). In der Endothelzelle wird es gemeinsam mit dem von Willebrand Faktor in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert (McEver et al., 1989) und nach Stimulation der Zellen mit Histamin, Thrombin oder Superoxid rasch an die Plasmamembran transloziert (Patel et al., 1991; Toothill et al., 1990). Hattori und Kollegen zeigten, dass die Sekretion des von Willebrand Faktors aus den Weibel-Palade-Körperchen mit der Expression von P-Selektin einhergeht (Hattori et al., 1989). Seine Liganden sind sialylierte, fucosylierte und sulfatierte Kohlenhydrate wie Sialyl Lewis^x und verwandte Strukturen (Foxall et al., 1992; Gaboury et al., 1996; Handa et al.; 1991; Lenter et al., 1994), die über Glykoproteine und Glykolipide von unstimulierten und aktivierten Leukozyten (Ito et al., 1994; Lawrence und Springer, 1991; Simon et al., 1992) und vermutlich auch auf der endothelialen Plasmamembran

exprimiert werden (Springer, 1994). Auf neutrophilen Granulozyten konnten das auf den Mikrovilli lokalisierte (Patel et al., 1995) sialylierte, fucosylierte (Moore et al., 1994) und Tyrosin-sulfatierte (Pouyani und Seed, 1995) Glykoprotein PSGL-1 als Ligand des endothelialen P-Selektins identifiziert werden (Asa et al., 1995; Furie und Furie, 1995; McEver, 1995).

P-Selektin-Defizienz führt zur drastischen Reduktion der Anzahl an am Endothel rollender Leukozyten. So fanden sich auch in den hier präsentierten Versuchen mit CD62^{-/-} Mäusen sowohl nach der chirurgischen Präparation als auch nach Stimulation mit 100nM PAF nahezu keine rollenden Leukozyten. ICAM-1, das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört und konstitutiv auf Endothelzellen exprimiert wird, führt nach seiner Bindung an seine Interaktionspartner, die leukozytären β 2-Integrine, wie zum Beispiel MAC-1 oder LFA-1, zur festen Adhärenz des Leukozyten am Endothel. ICAM-1-Defizienz hatte keinen Einfluss auf die Anzahl rollender Leukozyten. Allerdings kam es zu keinem Anstieg der Anzahl adhärenter Leukozyten in den mit 100 nM PAF topisch stimulierten Versuchstieren während der ersten 60 Minuten. Erst in den zweiten 60 Minuten kam es zu einem geringen Anstieg der Anzahl an adhärenen Leukozyten, was durch die Aktivierung alternativer leukozytärer Adhäsionsmoleküle, wie z. B. ICAM-2 (de Fougères et al., 1994) oder ICAM-3 (de Fougères et al., 1994²; de Fougères und Springer, 1992; Fawcett et al., 1992), zu erklären ist. Auch wenn diese Ergebnisse aus der Vielzahl der Vorarbeiten zu erwarten waren, zeigen sie doch den Zusammenhang, der zwischen den konsekutiven Schritten des Rekrutierungsprozesses von Leukozyten *in vivo* besteht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass RLOT-Mikroskopie nicht nur einen verbesserten Bildkontrast schafft, der morphologische Details der Leukozytenmigration *in vivo* sichtbar macht, sondern auch quantitative Untersuchungen zum Rolling, der Adhärenz und transendothelialen Migration von Leukozyten ermöglicht. Daraus folgt, dass sich RLOT in Kombination mit der Präparation des *M. cremaster* zur Analyse dynamischer Prozesse, wie

der Leukozytenrekrutierung an Orte inflammatorischer Geschehnisse, eignet. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist es nicht nur möglich, eine akute Inflammation im Muskel zu simulieren und alle konsekutiven Schritte der Rekrutierungskaskade zu visualisieren und zu quantifizieren, vielmehr sind auch Interventionen in diesen Rekrutierungsprozess möglich und detektierbar. Diese Optionen wurden im Folgenden genutzt, um die Rolle der Serinproteasen Elastase-2 und Proteinase-3 während der Rekrutierung von Leukozyten zu analysieren.

4.2. Die Serinproteasen Elastase-2 und Proteinase-3

Während des letzten Jahrzehnts wurden neue Einsichten auf dem Gebiet der Leukozytenrekrutierung errungen, die Einblicke in die Regulierung dieser komplexen Immunantwort erlaubten (Pfister et al., 2004). Nichtsdestotrotz herrscht über die Funktion proteolytischer Enzyme während der Migration von Leukozyten *in vivo* noch weitgehende Unklarheit. Die Emigration von Leukozyten wurde *in vivo* in unterschiedlichen experimentellen Systemen auf diverse inflammatorische Mediatoren untersucht. Für die hier vorgestellten Versuche wurde die Präparation des *M cremaster* der Maus gewählt. Als inflammatorischer Stimulus diente 100 nM PAF. Neben den Endothelzellen stellt die Basalmembran eine zentrale Barriere während der Transmigration von PMN dar. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag in der Frage nach der Rolle der Serinproteasen ELA-2 und PRNT3 während der Rekrutierung von Leukozyten.

In der Vergangenheit, wie in der Einleitung ausführlich erörtert, wurden widersprüchliche Ergebnisse zur Bedeutung einzelner Proteasen publiziert. Eine Erklärung hierfür kann in den teils synergistisch und überlappend wirkenden Funktionen der Serinproteasen ELA2 und PRNT3 liegen (vgl. Tab. 7).

Tab. 7: Substrate und endogene Inhibitoren der neutrophilen Serinproteinasen.

Enzyme	Potentielle Substrate	Endogene Inhibitoren
Elastase-2	Elastin, Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Zytokine, -Rezeptoren, BM-Komponenten	α_1 -PI, SLPI, Elafin, α_2 -MG
Proteinase-3	Elastin, Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine, BM-Komponenten	α_1 -PI, Elafin, α_2 -MG
Cathepsin G	Elastin, Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Zytokine, BM-Komponenten	α_1 -antiCT, SLPI, α_1 -PI
Erläuterungen:	α_1 -PI = α_1 -Proteinaseinhibitor α_2 -MG = α_2 -Makroglobulin α_1 -antiCT = α_1 -anti SLPI = serpin-like proteinase inhibitor	

Aus diesem Grund kamen im ersten Teil der hier vorgelegten Untersuchung genmodifizierte Versuchstiere zum Einsatz, in denen beide betreffende Gene aus dem Genom deletiert wurden. In einem zweiten Versuchsansatz fand der Wirkstoff ONO-5046 Anwendung, um die beiden Proteasen ELA2 und PRNT3 *in vivo* zu inhibieren. ONO-5046 ist ein niedermolekularer synthetischer ELA2 und PRTN3 Inhibitor (Suzuki et al., 2003). Für ONO-5046 konnte gezeigt werden, dass er den Endotoxin-induzierten Lungenschaden durch eine Reduktion der Anzahl die Lunge infiltrierenden Leukozyten vermindert (Guo et al., 1995; Uchida et al., 1995). Er verkleinert signifikant die Größe artifizieller Hirnschäden nach Okklusion der Arteria cerebri media in Ratten und verbessert deren neurologisches „outcome“ (Shimakura et al., 2000).

Diese zwei sich ergänzenden Ansätze förderten die gleichen Ergebnisse zu Tage. Die ELA2- und PRNT3-Defizienz, respektive die pharmakologische Inhibition der beiden Serinproteasen führten zur quantitativen Reduktion der Emigration und zur Einschränkung der Mobilität von PNM im interstitiellen Gewebe. Das heißt eine kontrollierte, limitierte perizelluläre Proteolyse durch Serinproteasen verbessert die transendotheliale und interstitielle Migration von PMN.

In vitro Studien zeigen, dass ELA2 ICAM-1 spalten (Champagne et al., 1998) und an Mac-1 (Cai und Wright, 1996) binden soll, und somit die Adhärenz von Leukozyten via Mac-1/ICAM-1 Bindung beeinflussen könnte. Taekema-Roelvink et al. demonstrierten *in vitro*, dass PRTN3 die Anzahl adhärenter PMN durch die Steigerung der endothelialen MCP-1 Produktion erhöht (Taekema-Roelvink et al., 2001). In den vorgestellten Versuchen hatten weder die Defizienz von ELA2 und PRNT3 noch die pharmakologische Inhibition der beiden Serinproteasen Einfluss auf die Anzahl rollender und adhärenter Leukozyten. Durch die Superfusion mit PAF kam es zu einer Reduktion der Rolling fraction und einem Anstieg der Anzahl an adhärenenten Leukozyten über den Versuchszeitraum in allen Versuchsgruppen. Dies steht zwar im Widerspruch zu publizierten *in vitro* Daten, ist aber vergleichbar mit einer kürzlich veröffentlichten Studie, die nach vier Stunden Stimulation des murinen *M. cremaster* mit den Zytokinen IL-1 β und TNF- α keine Unterschiede in Bezug auf das Rolling und die Adhärenz von Leukozyten zeigten (Young et al., 2004). Hieraus lässt sich ableiten, dass ELA2 und PRTN3 keine Bedeutung für die initialen, respektive intravaskulären Schritte der Leukozytenrekrutierung *in vivo* haben.

Signifikante Unterschiede fanden sich allerdings in der Anzahl und Lokalisation emigrierter Leukozyten im perivaskulären Gewebe zwischen Wildtyp und ELA2/PRTN3-defizienten Versuchstieren. Nach 120 Minuten Stimulation mit PAF in einer Konzentration von 100 nM fanden sich 40 % aller emigrierter Leukozyten in Wildtyp Mäusen in direkter Nachbarschaft zu der postkapillären Venole, aus welcher sie emigriert waren. 60 % der emigrierten Leukozyten waren in ein mindestens 25 μ m entferntes Areal migriert. Im Gegensatz dazu verblieben 70 % der emigrierten Leukozyten in ELA2/PRTN3-defizienten Versuchstieren im direkten Bereich der postkapillären Venole und nur ein geringer Anteil von 30 % migrierten in das entfernte Areal. Immunhistologische Analysen zeigten darüber hinaus, dass vor allem neutrophile Granulozyten durch die pharmakologische Inhibition oder genetische Deletion von ELA2 und PRTN3 betroffen sind. Diese Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung

der kontrollierten Proteolyse von ELA2 und PRTN3 während der Migration von neutrophilen Granulozyten. Die Hypothese der durch Proteasen unterstützten Migration von PMN durch Membran-gebundene ELA2 und PRTN3 steht in völliger Übereinstimmung sowohl mit *in vitro* Ergebnissen (Owen und Campbell, 1999) wie auch mit einer Reihe von *in vivo* Untersuchungen, die eine verzögerte Akkumulation von PMN an Entzündungsorten unter der teilweise eingeschränkten Funktion von Serinproteasen berichteten. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit einem *in vivo* Modell des wiederholten Lungenschadens, in dem Honore und Kollegen eine Akkumulation emigrierter Leukozyten um entzündete Venolen nach zwei Stunden Stimulation zeigen konnten (Honore et al., 2004). Nach der Aktivierung, dem “Priming” von neutrophilen Granulozyten, werden ELA2 und PRTN3 zügig an die Zelloberfläche transloziert (Campbell et al., 2000; Owen et al., 1995) und können eine Vielzahl von Basalmembran- und Matrixkomponenten degradieren (Jenne, 1994). Diese Degradation extrazellulärer Matrixkomponenten durch ELA2 und PRTN3 wird streng durch α_1 -Antitrypsin kontrolliert und ist MMP-9 abhängig. MMP-9 inaktiviert seinerseits α_1 -Antitrypsin im perizellulären Umfeld (Liu et al., 2000). Ebenso ist die dermale Blasenbildung durch Immunkomplex-vermittelte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in MMP9-defizienten Mäusen reduziert (Liu et al., 1998). In einem experimentellen Modell des Bleomycin-induzierten Lungenschadens konnte die Anzahl an in die Lunge einwandernden PMN durch einen wirksamen Kunitz-type Inhibitor mit einer hohen Spezifität für ELA2 signifikant reduziert werden (Honore et al., 2004).

Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Beobachtung in ELA2-defizienten Mäusen, wobei eine geringere Gewebeeinfiltration von ELA2-defizienten Leukozyten auf einen Stimulus mit Zymosan gefunden wurden (Young et al., 2004). Vergleichbar mit den in dieser Arbeit demonstrierten Ergebnissen wurde die Rekrutierung von PMN aus postkapillären Venolen des *M. cremaster* in Wildtyp-Mäusen inhibiert, wenn Zymosan mit 100 μ m ONO-5046 appliziert wurde. Allerdings wurde die verminderte Anzahl an transmigrierten PMN als sekundärer

Effekt auf eine quantitativ verminderte Anzahl an adhärenenten Leukozyten gewertet. Die verminderte Adhärenz von Leukozyten wurde auf die Blockierung der endothelialen Adhäsionsmoleküle durch die lokale Ablagerung von Zymosan zurückgeführt. Da die lokale Injektion von IL-1 β und TNF- α in ELA2-defizienten Versuchstieren vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die Anzahl an adhärenenten und transmigrierten Leukozyten wie in Wildtyp-Kontrollen erbrachte, sprachen die Autoren ELA2 eine Bedeutung für die Rekrutierung von PMN ab (Young et al., 2004). Die widersprüchlichen Ergebnisse von ähnlichen Studien ist am ehesten auf signifikante Unterschiede im experimentellen Design des jeweiligen *in vivo* Modells zu sehen. So wurde die Anzahl emigrierter Leukozyten nach 4 Stunden Stimulation mit den Zytokinen IL-1 β und TNF- α in ELA2-defizienten Mäusen analysiert (Young et al., 2004). In der vorliegenden Studie dagegen wurde die Emigration von PMN bereits während der ersten zwei Stunden Stimulation mit PAF in ELA2/PRTN3-defizienten und Wildtyp-Mäusen quantifiziert. Die frühe, zeitnahe Rekrutierung von PMN an Orte akuter Entzündungen war in ELA2/PRTN3-defizienten Versuchstieren signifikant vermindert. Vergleichbare Ergebnisse finden sich, wenn in Wildtyptieren diese Serinproteasen mittels des pharmakologischen Inhibitors ONO-5046 blockiert werden.

In ELA-2-defizienten Mäusen fand sich keine Beeinträchtigung der Rekrutierung von PMN, insbesondere nach längeren Stimulationszeiträumen mit IL-1 β und TNF- α (Young et al., 2004). Eine mögliche Erklärung ist die Aktivität von PRTN3, die als Ersatz für ELA2 extrazelluläre Matrixkomponenten degradieren kann. Der ergänzende Effekt von ELA2 und PRTN3 für die Migration von PMN wurde nicht diskutiert und Experimente mit einer Kombination aus IL-1 β oder TNF- α und ONO-5046 wurden unterlassen. Ferner ist die Rekrutierung von PMN auf die Stimulation mit Zymosan *in vivo* ein höchst regulierter Prozess, der von zusätzlichen proteolytischen Schritten abhängig ist, an denen auch ELA2 mitwirkt (Young et al., 2004).

Zusammenfassend kann die vorliegende Untersuchung die Bedeutung der beiden neutrophilen Serinproteasen ELA2 und PRTN3 für die Migration von PMN durch interstitielles Gewebe nachweisen. Ein evolutionärer Vorteil dieser phylogenetisch jungen Proteasen liegt in der Beschleunigung der Migration neutrophiler Granulozyten über die subendotheliale Basalmembran und durch die extrazelluläre Matrix des interstitiellen Gewebes. Damit wird eine schnellere, zeitnahe inflammatorische Reaktion der angeborenen Immunität auf eingedrungene Fremdorganismen ermöglicht. Diese positiven Effekte von ELA2 und PRTN3 blieben bisher weitgehend unberücksichtigt. Vielmehr standen die destruktiven, pathologischen Aktivitäten eben jener Enzyme in chronischen Erkrankungen im Vordergrund. Der therapeutische Nutzen von ELA2 und PRTN3 Inhibitoren in Erkrankungen wie des akuten Lungenschadens (Zeiger et al., 2004) und dem „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) (Kadoi et al., 2004) werden zunehmend angezweifelt, nachdem Studien nicht den erwarteten Vorteil nachweisen konnten. Die Gründe für das Versagen dieses innovativen Ansatzes sind sicherlich vielfältig. Ein Grund wird allerdings in Zusammenschau mit den hier präsentierten *in vivo* Daten wahrscheinlicher. Die Emigration von PMN wird nicht nur durch die Inhibition der Serinproteasen auf PAF oder andere inflammatorische Stimuli verlangsamt, vielmehr kommt es auch zur Akkumulation dieser emigrierten neutrophilen Granulozyten in Nachbarschaft der postkapillären Gefäße. Wenn nun diese aktivierten neutrophilen Granulozyten zusätzliche aktivierende Signale durch lokale Chemokine und/oder Zytokine erhalten, werden diese ihr aggressives Armamentarium (freie O₂-Radikale, hydrolysierende Enzyme) zu früh und an falschem Ort nahe der Gefäßwand nutzen und zu einer Schädigung der Gefäße führen. Diese ernst zu nehmenden Risiken könnten durch die Inhibition aller drei neutrophiler Serinproteasen gegebenenfalls verringert werden. So konnte kürzlich für die Serinprotease Cathepsin G gezeigt werden, dass diese die Immunkomplex-vermittelte Aktivierung von PMN verstärken kann (Raptis et al., 2005). Somit könnten die Entzündungsreaktionen neutrophiler Granulozyten auf mehreren Ebenen unterdrückt werden.

Die Blockierung aller drei neutrophilen Serinproteasen könnte somit zur Reduktion nicht nur der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führen, sondern auch der Produktion proinflammatorischer Chemokine und/oder Zytokine durch aktivierte neutrophile Granulozyten reduzieren (Young et al., 2004; Raptiz et al., 2005).

Nach den hier präsentierten Daten kann resümiert werden, dass ein evolutionärer Vorteil der Serinproteasen ELA2 und PRTN3 in der Beschleunigung der Bewegung neutrophiler Granulozyten durch die Endothelzell-Basalmembran-Barriere und durch die extrazelluläre Matrix des interstitiellen Gewebes liegt. Dadurch wird eine schnellere Abwehr gegen eindringende Fremdorganismen ermöglicht.

4.2.1. Physiologische – Pathophysiologische Relevanz

Aus den vorgestellten Untersuchungen zur Rolle der Serinproteasen ELA2 und PRNT3 ergeben sich Hinweise auf ihre potentiellen physiologischen Aufgaben. Neben der proteolytischen Zerlegung endozytotisch aufgenommener Mikroorganismen oder Zelldebridments (Reeves et al., 2002), beschleunigen ELA2 und PRNT3 die interstitielle Migration von PMN an Orte akuter Entzündungen. Dies erreichen die Proteasen vermutlich durch die Degradation von Basalmembran- und Matrixkomponenten (Si-Tahar et al., 1997; Rao et al., 1994). Somit ermöglichen diese evolutionär noch recht jungen Proteasen eine schnellere Immunantwort auf eindringende Fremdorganismen.

Allerdings ergeben sich auch eine Reihe von Bedingungen, unter denen das extensive Armamentarium proteolytischer Enzyme (Serinproteasen, Lysozym, Neuraminidase etc.) und reaktiver Sauerstoffmetabolite (z. B. Superoxidanionen, Hydroxylradikale, Wasserstoffperoxid, etc.) der PMN zu akuten und chronischen Schädigungen körpereigenen Gewebes führen können (Weiss, 1989). So wurden lange Zeit in der Inhibition der Serinproteasen protektive Vorteile für den Patienten vermutete. Der therapeutische Nutzen von ELA2- und PRTN3-Inhibitoren muss allerdings zunehmend angezweifelt werden, nachdem Studien den erwarteten Vorteil in Erkrankungen wie dem akuten Lungenschaden (Zeiber et al., 2004) und dem „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) (Kadoi et al., 2004) nicht nachweisen konnten. Wie die vorgestellten Daten zeigen, ist die Emigration von PMN durch die Inhibition der Serinproteasen auf PAF nicht nur verlangsamt, sondern es kommt auch zur Akkumulation dieser emigrierten PMN in der Umgebung der postkapillären Venolen. Wenn diese aktivierten PMN zusätzliche aktivierende Signale durch lokale Chemokine und/oder Zytokine erhalten, können diese ihr extensives Armamentarium zu früh und an falschem Ort nahe der Gefäßwand ausspielen und zur Schädigung der Gefäße führen.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer mikroskopischen Methode zur Analyse aller konsekutiven Schritte der Leukozytenkinetik *in vivo*, die eine detailgetreue Visualisierung nicht nur der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen, sondern darüber hinaus der Migration über die Endothelzell-Basalmembran-Barriere sowie der Migration im interstitiellen Gewebe erlaubt. Intravitale Reflected Light Oblique Transillumination-(RLOT) Mikroskopie schafft die nötigen Voraussetzungen, um optische Gradienten in einem lebenden Objekt in Intensitätsunterschiede im mikroskopischen Abbild umzuwandeln. Dies ermöglicht die Darstellung morphologischer Details in ungleichmäßigen Strukturen, wie im interstitiellen Gewebe des murinen *M. cremaster*. Durch den verbesserten Bildkontrast wird die Visualisierung endothelialer Strukturen, extravasierter Leukozyten und mittels time-lapse Aufnahmen die Beobachtung morphologischer Details während der interstitiellen Migration möglich (Abb. 18). Mittels topischer Applikation der chemotaktischen Substanzen PAF bzw. KC lässt sich eine akute Entzündung simulieren. Somit wird die Visualisierung und Quantifizierung aller Schritte der Rekrutierungskaskade endogener Leukozyten auf einen definierten chemotaktischen Stimulus hin möglich. Bei der Analyse der Leukozytenrekrutierung in $CD62P^{-/-}$ bzw. $CD54^{-/-}$ Versuchstieren fanden sich keine rollenden Leukozyten ($CD62P^{-/-}$), respektive keine adhärenenten Leukozyten ($CD54^{-/-}$). Für die Serinproteasen ELA2 und PRTN3 konnte gezeigt werden, dass sie sowohl für die transendotheliale wie auch die interstitielle Migration insbesondere von PMN von essentieller Bedeutung sind. Es lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der evolutionäre Vorteil von ELA2 und PRTN3 in einer kontrollierten, limitierten Proteolyse liegt, welche dazu beiträgt, dass PMN die Endothelzell-Basalmembran-Barriere schneller überwinden und beschleunigt durch die extrazelluläre Matrix des interstitiellen Gewebes migrieren können.

6. Literatur

Abbassi, O., T. K. Kishimoto, L. V. McIntire, D. C. Anderson, und C. W. Smith. E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J. Clin. Invest.* 92: 2719-2730, 1993.

Abbassi, O., C. L. Lane, S. Krater, T. K. Kishimoto, D. C. Anderson, L. V. McIntire und C. W. Smith. Canine neutrophil margination is mediated by lectin adhesion molecule-1 in vitro. *J. Immunol.* 147: 2107-2115, 1991.

Alon, R., D. A. Hammer, und T. A. Springer. Lifetime of P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature* 374: 539-542, 1995.

Alon, R., H. Rossiter, X. Wang, T. A. Springer, und T. S. Kupper. Distinct cell surface ligands mediate T-lymphocyte attachment and rolling on P- and E-selectin under physiological flow. *J. Cell Biol.* 127: 1485-1495, 1994.

Alon, R., T. Feizi, C. T. Yuen, R. C. Fuhlbrigge, und T. A. Springer. Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions. *J. Immunol.* 154: 5356-5366, 1995.

von Andrian, U. H., J. D. Chambers, L. M. McEvoy, R. F. Bargatze, K.-E. Arfors, und E. C. Butcher. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte β_2 integrins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7538-7542, 1991.

von Andrian, U. H., P. Hansell, J. D. Chambers, E. M. Berger, I. Torres Filho, E. C. Butcher, und K. E. Arfors. L-selectin function is required for beta 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. *Am. J. Physiol.* 263: H1034-H1044, 1992.

von Andrian, U.H., und C. R. Mackay. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* 343 :1020-34, 2000.

Arbones, M. L., D. C. Ord, K. Ley, H. Ratech, C. Maynard Curry, G. Otten, D. J. Capon, und T. F. Tedder. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* 1: 247-260, 1994.

Argenbright, L. W., L. G. Letts, und R. Rothlein. Monoclonal antibodies to the leukocyte membrane CD18 glycoprotein complex and to intercellular adhesion molecule-1 inhibit leukocyte-endothelial adhesion in rabbits. *J. Leukoc. Biol.* 49: 253-257, 1991.

Asa, D., L. Raycroft, L. Ma, P. A. Aeed, P. S. Kaytes, A. P. Elhammer, und J. G. Geng. The P-selectin glycoprotein ligand function as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins. *J. Biol. Chem.* 270: 11662-11670, 1995.

Asako, H., I. Kurose, R. Wolf, S. DeFrees, Z. L. Zhen , M. L. Phillips, J. C. Paulson, und D. N. Granger. Role of H1 receptors and P-selectin in histamine-induced leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules. *J. Clin. Invest.* 93: 1508-1515, 1994.

Atherton, A. und G. V. Born. Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leukocytes to blood vessel walls. *J. Physiol.* 222: 447-474, 1972

Atheron, A. und G. V. Born. Relationship between the velocity of rolling granulocytes and that of the blood flow in venules. *J. Physiol.* 233: 157-165, 1973.

Baatz, H. M., U. Pleyer, H. J. Thiel, und C. Hammer. In vivo study of leukocyte-endothelium interaction in endotoxin-induced uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36: 1960-1967, 1995.

Baatz, H., A. M. Steinbauer, A. G. Harris, und F. Krombach. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 15: 85-91, 1995.

Baez, S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc. Res.* 5: 384-394, 1973.

Bagge, U. und R. Karlsson. Maintenance of white blood cell margination at the passage through small venular junction. *Mic. Rec.* 20: 92-95, 1980.

Bagge, U., A. Blixt, und K. G. Strid. The initiation of post-capillary margination of leukocytes: studies in vitro on the influence of erythrocyte concentration and flow velocity. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 2: 215-227, 1983.

Bank, U. und S. Ansorge. More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J. Leukoc. Biol.* 69: 197-206, 2001.

Bevilacqua, M. P., R. M. Nelson, G. Mannori, und O. Cecconi. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annul. Rev. Med.* 45: 361-378, 1994.

Bevilacqua, M. P., J. S. Pober, D. L. Mendrick, R. S. Cotran, und M. A. Gimbrone, Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9238-9242, 1987.

Bevilacqua, M. P., S. Stengelin, M. A. Gimbrone, Jr., und B. Seed. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243: 1160-1165, 1989.

Bhathal, P. S. und G. S. Christie. Intravital fluorescence microscopy of the terminal and subterminal portions of the biliary tree of normal guinea pigs and rats. *Lab. Invest.* 20: 472-479, 1969.

Blixt, A., P. Jonsson, M. Braide, und U. Bagge. Microscopic studies on the influence of erythrocyte concentration on the post-junctional radial distribution of leukocytes at small venular junctions. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp* 4: 141-156, 1985.

Bode, W., E. Meyer Jr., und J. C. Powers. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* 28: 1951-1963, 1989.

Braun, M. G., E. Csernok, W. L. Gross, und H. K. Muller-Hermelink. Proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmatic antibodies circulation in Wegener's granulomatosis. Immunolocalization in normal and pathologic tissues. *Am. J. Pathol.* 139: 831-8, 1991.

Burns, A. R., C. W. Smith, und D. C. Walker. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol Rev.* 83:309-336, 2003.

Butcher, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and deversity. *Cell* 67: 1033-1036, 1991.

Cai, T.Q. und S. D. Wright. Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha M beta 2) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. *J. Exp. Med.* 184: 1213-1223, 1996.

Campanelli, D., P. A. Detmers, C. F. Nathan, und J. E. Gabay. Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *J Clin Invest.* 85: 904-915, 1990.

Campbell, E.J., M. A. Campbell, und C. A. Owen. Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: quantification, catalytic activity, and susceptibility to inhibition. *J. Immunol.* 165: 3366-3374, 2000.

Carden, D., F. Xiao, C. Moak, B. H. Willi, S. Robinson-Jackson, und S. Alexander. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am. J. Physiol.* 275: H385-392, 1998.

Carman, C. V. und T. A. Springer. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol.* 167: 377-388, 2004.

Caro, C. G., T. J. Pedley, R.C. Schroter, und W. A. Seed. *The mechanics of the circulation.* New York – Toronto: Oxford University Press, 1978.

Casimir, C. M. und C. G. Teahan. The respiratory burst of neutrophils and its deficiency. In: *Immunopharmacology of neutrophils*, edited by P. G. Hellewell und T. J. Williams. London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, Harcourt Brace and Company, 1994, p. 27-54.

Cera, M. R., A. Del Prete, A. Vecchi, M. Corada, I. Martin-Padura, T. Motoike, P. Tonetti, G. Bazzoni, W. Vermi, F. Gentili, S. Bernasconi, T. N. Sato, A. Mantovani, und E. Dejana. Increased DC trafficking to lymph nodes and contact hypersensitivity in junctional adhesion molecule-A-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 114: 729-738, 2004.

Champagne, B., P. Tremblay, A. Cantin, und Y. St. Pierre. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J. Immunol.* 161: 6398-6405, 1998.

Chien, S., G. W. Schmid-Schönbein, K. L. P. Sung, E. A. Schmalzer, und R. Skalak. Viscoelastic properties of leukocytes. In: *White cell mechanics: Basic science and clinical aspects*, edited by H. I. Meiselman, M. A. Lichtman, und P. L. LaCelle. New York: Alan R. Liss, 1984, p. 19-51.

Clark E. R. und E. L. Clark. Observations on changes in blood vascular endothelium in the living animal. *Am. J. Anat.* 57: 385-438, 1935.

Cochrane, C. G., E. R. Unanue, und F. J. Dixon. A role of polymorphonuclear leukocytes and complement in nephrotoxic nephritis. *J. Exp. Med.* 122: 99-116, 1965.

Cohnheim, J. Über Entzündung und Eiterung. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.* 40: 1-79, 1867.

Cohnheim, J. Inflammation. In: *Lectures in general pathology, Vol. 1*. London: New Sydenham Society, 1889, p. 242-382.

Csernok, E., M. Ernst, W. Schmitt, D. F. Bainton, and W. L. Gross. Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* 95: 244-250, 1994.

David A., Y. Kacher, U. Specks, and I. Aviram. Interaction of proteinase 3 with CD11b/CD18 (beta2 integrin) on the cell membrane of human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 74: 551-557, 2003.

De Fougères, A. R. and T. A. Springer. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175: 185-190, 1992.

De Fougères, A. R., S. A. Stacker, R. Schwarting, and T. A. Springer. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med.* 174: 253-267, 1994.

De Fougères, A. R., X. Qin, and T. A. Springer. Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J. Exp. Med.* 179: 619-629, 1994².

Delclaux, C., C. Delacourt, M. P. D'Ortho, V. Boyer, C. Lafuma, and A. Harf. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14: 288-295, 1996.

DeLisser, H. M., H. C. Yan, P. J. Newman, W. A. Muller, C. A. Buck, und S. M. Albelda. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)-mediated cellular aggregation involves cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 268: 16037-16046, 1993.

Del Maschio, A., A. De Luigi, I. Martin-Padura, M. Brockhaus, T. Bartfai, P. Fruscella, L. Adorini, G. Martino, R. Furlan, M. G. De Simoni, und E. Dejana. Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J. Exp. Med.* 190: 1351-1356, 1999.

Denk, W., J. H. Strickler und W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248: 73-76, 1990.

Diamond, M. S., D. E. Staunton, S. D. Marlin, und T. A. Springer. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 65: 961-971, 1991.

von Dobschuetz, E., T. Hoffmann, und K. Messmer. Inhibition of neutrophil proteinases by recombinant serpin LEX032 reduces capillary no-reflow in ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290: 782-788, 1999.

Doherty, N. S. und M. J. Janusz. Neutrophil proteases: their physiological and pathophysiological roles. In: *Immunopharmacology of neutrophils*, edited by P. G. Hellewell und T. J. Williams. London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, Harcourt Brace and Company, 1994, p. 55-94.

Duncan, G. S., D. P. Andrew, H. Takimoto, S. A. Kaufman, H. Yoshida, J. Spellberg, J. Luis de la Pompa, A. Elia, A. Wakeham, B. Karan-Tamir, W. A. Muller, G. Senaldi, M. M. Zukowski, und T. W. Mak. Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J. Immunol.* 162: 3022-3030, 1999.

Dutrochet, M. H. Recherches anatomiques et physiologiques sur la structure intime des animaux et des végétaux, et sur leur motilité. Paris : Bailliere et Fils, 1824.

Eisbach, P. und J. Weiss. Oxygen-independent antimicrobial systems of phagocytes. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* (J. I. Gallin, I. M. Goldstein, and R. Snyderman, eds.) New York: Raven Press, 211-232, 1992.

Ellis, G. W.: Advances in visualization of mitosis in vivo; in Dirksen, E., D. M. Prescott, und C. E. Fox (eds), Cell reproduction; Academic press, 1978, pp 465-476

Faurschou M. und N. Borregaard. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 5:1317-1327, 2003.

Feng, D., J. A. Nagy, K. Pyne, H. F. Dvorak, und A. M. Dvorak. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J. Exp. Med.* 187: 903-915, 1998.

Ferguson, M. K., F. C. Seifert, und R. L. Replegle. Leukocyte adherence in venules of rat skeletal muscle following thermal injury. *Microvasc. Res.* 24: 34-41, 1982.

Fiebig, E., K. Ley, und K. E. Arfors. Rapid leukocyte accumulation by „spontaneous“ rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 10 : 127-144, 1991.

Firrell, J. C. und H. H. Lipowsky. Leukocyte margination and deformation in mesenteric venules of rat. *Am. J. Physiol.* 256: H1667-H1674, 1989.

Flick, M. R., A. Perel, und N. C. Staub. Leukocytes are required for increased lung microvascular permeability after microembolization in sheep. *Circ. Res.* 48: 344-351, 1981.

Foxall, C., S. R. Watson, D. Dowbenko, C. Fennie, L. A. Lasky, M. Kiso, A. Hasegawa, D. Asa, und B. K. Brandley. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis (x) oligosaccharide. *J. Cell Biol.* 117: 895-902, 1992.

Furie, B. und B. C. Furie. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb. Haemost.* 74: 224-227, 1995.

Furie, M. B., B. L. Naprstek, und S. C. Silverstein. Migration of neutrophils across monolayers of cultured microvascular endothelial cells. An in vitro model of leucocyte extravasation. *J. Cell Sci.* 88: 161-75, 1987.

Gaboury, J. P., R. D. Larsen, und P. Kubes. Sialyl Lewis^x binding to leukocytes and endothelium regulates several features of acute inflammation following ischemia/reperfusion (I/R). *Int. j. Microcirc.: Clin. Exp.* 16, Suppl. 1 : 159, 1996 [Abstract]

Gaehtgens, P., K. Ley, A. R. Pries, und R. Mueller. Mutual interaction between leukocytes and microvascular blood flow. *Prog. Appl. Microcirc.* 7: 15-28, 1985.

Geng, J. G., M. P. Bevilacqua, K. L. Moore, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, J. M. Kim, G. A. Bliss, G. A. Zimmerman, und R. P. McEver. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 343: 757-760, 1990.

Ginzberg, H. H., V. Cherapanov, Q. Dong, A. Cantin, C. A. McCulloch, P. T. Shannon, und G. P. Downey. Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *Am. J. Physiol.* 281: G705-717, 2001.

Goldsmith, H. L. und S. Spain. Margination of leukocytes in blood flow through small tubes. *Microvasc. Res.* 27: 204-222, 1984.

Gotsch, U., E. Borges, R. Bosse, E. Boggemeyer, M. Simon, H. Mossmann, und D. Vestweber. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J. Cell Sci.* 110: 583-588, 1997.

Graves, B. J., R. L. Crowther, C. Chandran, J. M. Rumberger, S. Li, K. S. Huang, D. H. Presky, P. C. Familletti, B. A. Wolitzky, und D. K. Burns. Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains. *Nature* 367: 532-538, 1994.

Guo, L., Y. Yamaguchi, S. Ikei, H. Sugita, und M. Ogawa. Neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) prevents lung hemorrhage induced by lipopolysaccharide in rat model of cerulein pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* 40: 2177-2183, 1995.

Habazettl H., B. Vollmar, M. Christ, H. Baier, P. F. Conzen und K. Peter. Heterogeneous microvascular coronary vasodilation by adenosine and nitroglycerin in dogs. *J. Appl. Physiol.* 76: 1951-1960, 1994.

Hallmann, R., M. A. Jutila, C. W. Smith, D. C. Anderson, T. K. Kishimoto, und E. C. Butcher. The peripheral lymph node homing receptor, LECAM-1, is involved in CD18-independent adhesion of human neutrophils to endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 236-243, 1991.

Harell, G. S., A. B. Corbet, W. H. Dickhoner, und B. R. Bradley. The intraluminal distribution of 15-micrometer-diameter carbonized microspheres within arterial microvessels as determined by vital microscopy of the golden hamster cheek pouch. *Microvasc. Res.* 18: 384-402, 1979.

Heck, L. W., W. D. Blackburn, M. H. Irwin, und D. R. Abrahamson. Degradation of basement membrane laminin by human neutrophil elastase and cathepsin G. *Am. J. Pathol.* 136: 1267-1274, 1990.

Heymer, B. Causative agents, mediators and histomorphology of inflammation. *Pathol. Res. Pract.* 180: 143-150, 1985.

Hoffman, R. und L. Gross. The modulation contrast microscope. *Nature* 254: 586-588, 1975.

Hoffmann, T. F., R. Leiderer, A. G. Harris, und K. Messmer. Ischemia and reperfusion in pancreas. *Microsc. Res. Tech.* 37: 557-571, 1997.

Hoffmann, T. F., R. Leiderer, H. Waldner, S. Arbogast, und K. Messmer. Ischemia reperfusion of the pancreas: a new in vivo model for acute pancreatitis in rats. *Res. Exp. Med.* 195: 125-144, 1995.

Hoffmann, T. F., R. Leiderer, H. Waldner, und K. Messmer. Bradykinin antagonists HOE-140 and CP-0597 diminish microcirculatory injury after ischemia-reperfusion of the pancreas in rats. *Br. J. Surg.* 83 : 189-195, 1996.

Hogg, N. und C. Berlin. Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunol. Today* 16: 327-330, 1995.

Honore, S., H. L. Attalah, E. Azoulay, C. J. Soussy, F. Saudubray, A. Harf, L. Brochard, und C. Delclaux. Beneficial effect of an inhibitor of leukocyte elastase (EPI-hNE-4) in presence of repeated lung injuries. *Shock* 22:131-136; 2004.

House, S. D. und H. H. Lipowsky. Leukocyte-endothelium adhesion: microhemodynamics in the mesentery of the cat. *Microvasc. Res.* 5: 363-379, 1987.

Huber, A. R. und S. J. Weiss. Disruption of the subendothelial basement membrane during neutrophil diapedesis in an in vitro construct of a blood vessel wall. *J. Clin. Invest.* 83: 1122-1136, 1989.

Imai, Y., L. A. Lasky, und S. D. Rosen. Further characterization of the interaction between L-selectin and its endothelial ligands. *Glycobiology* 2: 373-381, 1992.

Ishii, K., Y. Ito, H. Katagiri, Y. Matsumoto, A. Kakita, und M. Majima. Neutrophil elastase inhibitor attenuates lipopolysaccharide-induced hepatic microvascular dysfunction in mice. *Shock* 18: 163-168, 2002.

Ishikawa, N., M. Oda, M. Kawaguchi, Y. Tsunozuka, und G. Watanabe. The effects of a specific neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) in pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Transpl. Int.* 16: 341-346, 2003.

Ito, K., K. Handa, und S. Hakomori. Species-specific expression of sialosyl-Le(x) on polymorphonuclear leukocytes (PMN), in relation to selectin-dependent PMN response. *Glycoconj. J.* 11: 232-237, 1994.

Janssen, B., G. J. Tangelder, M. G. A. oude Egbrink, und R. S. Reneman. Leukocyte rolling is present in venules of the unstimulated skin of anesthetized mice and rats. *Int. J. Microcirc.: Clin. Exp.* 11, Suppl. 1: 98, 1992 [Abstract]

Jenne, D.E. Structure of the azurocidin, proteinase 3, and neutrophil elastase genes. Implications for inflammation and vasculitis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 150: S147-S154, 1994.

Jennette, J. C., J. R. Hoidal, und R. J. Falk. Specificity of anti-neutrophil cytoplasmatic autoantibodies for proteinase 3. *Blood* 75: 2263-2264, 1990.

Johnson, A. und A. B. Malik. Effect of granulocytopenia on extravascular lung water content after microembolization. *Am. Rev. Respir. Dis.* 122: 561-566, 1980.

Kadoi, Y., H. Hinohara, F. Kunimoto, S. Saito, F. Goto, T. Kosaka, und K. Ieta. Pilot study of the effects of ONO-5046 in patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesth. Analg.* 99: 872-877, table, 2004.

Kakimoto, K., A. Matsukawa, M. Yoshinaga, und H. Nakamura. Suppressive effect of a neutrophil elastase inhibitor on the development of collagen-induced arthritis. *Cell. Immunol.* 165: 26-32, 1995.

Kawamura S., L. Schürer, A. Goetz, O. Kempfski, B. Schmucker, und A. Baethmann. An improved closed cranial window technique for investigation of blood-brain barrier function and cerebral vasomotor control in the rat. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 9: 369-383, 1990.

Kim, M. B. und I. H. Sarelius. Regulation of leukocyte recruitment by local wall shear rate and leukocyte delivery. *Microcirculation* 11: 55-67, 2004.

Kishimoto, T. K., R. A. Warnock, M. A. Jutila, E. C. Butcher, C. Lane, D. C. Anderson, und C. W. Smith. Antibodies against human neutrophil LECAM-1 (LAM-1/Leu-8/DREG-56 antigen) and endothelial cell ELAM-1 inhibit a common CD18-independent adhesion pathway in vitro. *Blood* 78: 805-811, 1991.

Knol, E. F., F. Tackey, T. F. Tedder, D. A. Klunk, C. A. Bickel, S. A. Sterbinsky, und B. S. Bochner. Comparison of human eosinophil and neutrophil adhesion to endothelial cells under nonstatic conditions. Role of L-selectin. *J. Immunol.* 153: 2161-2167, 1994.

Kuhnle G. E., J. Groh, F. H. Leipfinger, W. M. Kuebler, und A. E. Goetz. Quantitative analysis of network architecture, and microhemodynamics in arteriolar vessel trees of the ventilated rabbit lung. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 12: 313-324, 1993.

Kunkel E. J., U. Jung, D. C. Bullard, K. E. Norman, B. A. Wolitzky, D. Vestweber, A. L. Beaudet, und K. Ley. Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and intercellular adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* 183: 57-65, 1996.

Larson, R. S. und T. A. Springer. Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol. Rev.* 114: 181-217, 1990.

Lasky, L. A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258: 964-969, 1992.

Lawrence, M. B. und T. A. Springer. Neutrophils roll on E-selectin. *J. Immunol.* 151: 6338-6346, 1993.

Lee, W. L. und G. P. Downey. Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 896-904, 2001.

Lehr, H. A., A. Guhlmann, D. Nolte, D. Keppler, und K. Messmer. Leukotrienes as mediators in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J. Clin. Invest.* 87: 2036-2041, 1991.

Lenter, M., A. Levinovitz, S. Isenmann, und D. Vestweber. Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells. *J. Cell Biol.* 125: 471-481, 1994.

Ley, K. Inhibition of leukocyte adhesion to cultured endothelial cells in vitro and to venular endothelium in vivo by sulphated polysaccharides. *Eur. Surg. Res.* 22 : 187-187, 1990.

[Abstract]

Ley, K., E. Lundgren, E. Berger, und K. E. Arfors. Shear-dependent inhibition of granulocyte adhesion to cultured endothelium by dextran sulfate. *Blood* 73: 1324-1330, 1989.

Ley, K. und P. Gaehtgens. Endothelial, not hemodynamic, differences are responsible for preferential leukocyte rolling in rat mesenteric venules. *Circ. Res.* 69: 1034-1041, 1991.

Ley, K., D. C. Bullard, M. L. Arbones, R. Bosse, D. Vestweber, T. F. Tedder, und A. L. Beaudet. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J. Exp. Med.* 181: 669-675, 1995.

Ley, K., A. Zakrzewicz, C. Hanski, L. M. Stoolman, und G. S. Kansas. Sialylated O-glycans and L-selectin sequentially mediate myeloid cell rolling in vivo. *Blood* 85: 3727-3735, 1995².

Liao, F., J. Ali, T. Greene, und W. A. Muller. Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 185: 1349-1357, 1997.

Lipowsky, H. H., S. Kovalcheck, und B. W. Zweifach. The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. *Circ. Res.* 43:738-749, 1978.

Liu, Z., J. M. Shipley, T. H. Vu, X. Zhou, L. A. Diaz, Z. Werb, und R. M. Senior .Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. *J. Exp. Med.* 188: 475-482; 1998.

Liu, Z., X. Zhou, S. D. Shapiro, J. M. Shipley, S. S. Twining, L. A. Diaz, R. M. Senior, und Z. Werb. The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell* 102: 647-655, 2000.

Luscinskas, F. W., G. S. Kansas, H. Ding, P. Pizcueta, B. E. Schleiffenbaum, T. F. Tedder, und M. A. Gimbrone, Jr. Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins. *J. Cell Biol.* 125: 1417-1427, 1994.

Mackarel A. J., D. C. Cottell, K. J. Russell, M. X. FitzGerald, und C. M. O'Connor. Migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells is not blocked by matrix metalloproteinase or serine protease inhibitors. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 20: 1209-1219, 1999.

MacVicar, B. A.: Infrared video microscopy to visualize neurons in the in vitro brain slice preparation. *J. Neurosci. Methods* 12:133-9, 1984.

Martin-Padura, I., S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, C. Panzeri, A. Stoppacciaro, L. Ruco, A. Villa, D. Simmons, und E. Dejana. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* 142: 117-127, 1998.

Matzner, Y., I. Vlodayky, R. I. Michaeli, and A. Eldor. Selective inhibition of neutrophil activation by the subendothelial extracellular matrix: possible role in protection of the vessel wall during diapedesis. *Exp. Cell Res.* 189: 233-240, 1990.

Mayadas, T. N., R. C. Johnson, H. Rayburn, R. O Hynes, and D. D. Wagner. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin deficient mice. *Cell* 74: 541-554, 1993.

Mayrovitz, H. N. Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized mice. *Am. J. Physiol.* 262: H157-H161, 1992.

Mayrovitz, H. N., S. J. Kang, B. Herscovici, and R. N. Sampsel. Leukocyte adherence initiation in skeletal muscle capillaries and venules. *Microvasc. Res.* 33: 22-34, 1987.

McDonald, D. A. Blood flow in arteries. London: Arnold, 1974.

MacDonald, I. C., D. M. Ragan, E. E. Schmidt, and A. C. Groom. Kinetics of red blood cell passage through interendothelial slits into venous sinuses in rat spleen, analyzed by in vivo microscopy. *Microvasc. Res.* 33: 118-134, 1987.

Lawrence, M. B., and T. A. Springer. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65: 859-873, 1991.

McEver, R. P. Regulation of function and expression of P-selectin. *Agents Actions Suppl.* 47: 117-119, 1995.

Menger, M. D., S. Pelikan, D. Steiner, und K. Messmer. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of „reflow paradox“. *Am. J. Physiol.* 263: H1901-H1906, 1992.

Messmer K. und F. Krombach. Mikrozirkulationsforschung in der experimentellen Chirurgie. *Chirurg.* 69: 333-338, 1998.

Monboisse, J. C., R. Garnotel, G. Bellon, N. Ohno, C. Perreau, J. P. Borel, und N. A. Kefalides. The alpha 3 chain of type IV collagen prevents activation of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 25475-25482, 1994.

Moore, K. L., S. F. Eaton, D. E. Lyons, H. S. Lichtenstein, R. D. Cummings, und R. P. McEver. The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine. *J. Biol. Chem.* 269: 23318-23327, 1994.

Muller, W. A. The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 57: 523-528, 1995.

Muller, W. A. The use of anti-PECAM reagents in the control of inflammation. *Agents Actions Suppl.* 46: 147-157, 1995².

Muller, W. A., S. A. Weigl, X. Deng, und D. M. Phillips. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178: 449-460, 1993.

Muller, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24: 327-334, 2003.

Nazziola, E. und S. D. House. Effects of hydrodynamics and leukocyte-endothelium specificity on leukocyte-endothelium interactions. *Microvasc. Res.* 44: 127-142, 1992.

Nicoll P. A. und R. L. Webb. Blood circulation in the subcutaneous tissue of the living bat's wing. *Ann. New York Acad. Scien.* 4: 697-711, 1946.

Nobis, U., A. R. Pries, G. R. Cokelet, und P. Gaehtgens. Radial distribution of white cells during blood flow in small tubes. *Microvasc. Res.* 29: 295-304, 1985.

Nolte, D., M. Bayer, H. A. Lehr, M. Becker, F. Krombach, U. Kreimeier, und K. Messmer. Attenuation of postischemic microvascular disturbances in striated muscle by hyperosmolar saline dextran. *Am. J. Physiol.* 263: H1411-H1416; 1992.

Nolte, D., D. Vestweber, R. Hecht, und K. Messmer. Monoclonal antibodies to L- and P-selectin reduce postischemic reperfusion injury in striated muscle. *Langenbecks Arch. Chir.* Forumband: 399-403, 1995.

Nolte, D., R. Hecht, P. Schmid, A. Botzlar, M. D. Menger, C. Neumueller, F. Sinowatz, D. Vestweber, und K. Messmer. Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice. *Am. J. Physiol.* 267: H1320-H1328, 1994.

Nolte, D., P. Schmid, U. Jager, A. Botzlar, F. Roesken, R. Hecht, E. Uhl, K. Messmer, und D. Vestweber. Leukocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. *Am. J. Physiol.* 267: H1637-H1642, 1994².

Nomarski G: Microinterférométrie différentiel à ondes polarisées. *J. Phys. Radium*. 1955;16:S9

Olsson, Y., E. Svensjo, K. E. Arfors, und D. Hultstrom. Fluorecein labelled dextrans as tracers for vascular permeability studies in the nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl)* 33: 45-50, 1975.

Owen, C. A. und E. J. Campbell. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J. Leukoc. Biol.* 65: 137-150, 1999.

Owen, C. A., M. A. Campbell, S. S. Boukedes, und E. J. Campbell. Cytokines regulate membrane-bound leukocyte elastase on neutrophils: a novel mechanism for effector activity. *Am. J. Physiol.* 272: L385-L393, 1997.

Owen, C. A., M. A. Campbell, S. S. Boukedes, und E. J. Campbell. Inducible binding of cathepsin G to the cell surface of neutrophils. A mechanism for mediating extracellular bioactive catalytic activity of cathepsin G. *J. Immunol.* 155: 5803-5810, 1995.

Owen, C. A., M. A. Campbell, P. L. Sannes, S. S. Boukedes, und E. J. Campbell. Cell-surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinase. *J. Cell Biol.* 131: 775-789, 1995².

Patel, K. D., G. A. Zimmerman, S. M. Prescott, R. P. McEver, und T. M. McIntyre. Oxygen radicals induce human endothelial cell to express GMP-140 and bind neutrophils. *J. Cell Biol.* 112: 749-756, 1991.

Patel, K. D., K. L. Moore, M. U. Nollert, und R. P. McEver. Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow conditions. *J. Clin. Invest.* 96: 1887-1896, 1995.

Perry, M. A. und D. N. Granger. Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. *J. Clin. Invest.* 87: 1798-1804, 1991.

Pfister, H., M. Ollert, L. F. Frohlich, L. Quintanilla-Martinez, T. V. Colby, U. Specks, und D. E. Jenne. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo. *Blood* 104: 1411-1418, 2004.

Phibbs, R. H. und L. Dong. Nonuniform distribution of microspheres in blood flowing through a medium-sized artery. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 48: 415-421, 1970.

Pouyani, T. und B. Seed. PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell* 83: 333-343; 1995.

Povlishock, J. T., W. I. Rosenblum, M. M. Sholley, und E. P. Wei. An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am. J. Pathol.* 110: 148-160, 1983.

Predescu, D., K. Ihida, S. Predescu, und G. E. Palade. The vascular distribution of the platelet-activating factor receptor. *Eur. J. Cell. Biol.* 69: 86-98, 1996.

Pries, A. R., T. W. Secomb, P. Gaehtgens, und J. F. Gross. Blood flow in microvascular networks. Experiments and simulation. *Circ. Res.* 67: 826-834, 1990.

Randi, A. M. und N. Hogg. I domain of beta 2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1 contains a binding site for ligand intercellular adhesion molecule-1. *J. Biol. Chem.* 269: 12395-12398, 1994.

Rao, N. V., G. V. Rao, B. C. Marshall, und J. R. Hoidal. Biosynthesis and processing of proteinase 3 in U937 cells. Processing pathways are distinct from those of cathepsin G. *J. Biol. Chem.* 271: 2972-2978, 1996.

Rao, N. V., N. G. Wehner, B. C. Marshall, W. R. Gray, B. H. Gray, und J. R. Hoidal. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. *J. Biol. Chem.* 266: 9540-9548, 1991.

Raptis, S. Z., S. D. Shapiro, P. M. Simmons, A. M. Cheng, und C. T. Pham. Serine protease cathepsin G regulates adhesion-dependent neutrophil effector functions by modulating integrin clustering. *Immunity* 22: 679-691, 2005.

Renesto, P., L. Halbwachs-Mecarelli, P. Nusbaum, P. Lesavre, und M. Chignard. Proteinase 3. A neutrophil proteinase with activity on platelets. *J. Immunol.* 152: 4612-4617, 1994.

Reeves, E. P., H. Lu, H. L. Jacobs, C. G. Messina, S. Bolsover, G. Gabella, E. O. Potma, A. Warley, J. Roes, und A. W. Segal. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* 416: 291-297, 2002.

Rosengren, S. und K. E. Arfors. Neutrophil-mediated vascular leakage is not suppressed by leukocyte elastase inhibitors. *Am. J. Physiol.* 259: H1288-1294, 1990.

Rost, F. W. D. Fluorescence microscopy. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 1-352, 1992.

Ruoslahti, E. Integrins. *J. Clin. Invest.* 87: 1-5, 1991.

Sako, D., X. J. Chang, K. M. Barone, G. Vachino, H. M. White, G. Shaw, G. M. Veldman, K. M. Bean, T. J. Ahern, und B. Furie. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 75: 1179-1186, 1993.

Saraf P. G. und A. T. Cockett. Marcello Mapighi – a tribute. *Urology* 23: 619-623, 1984.

Scarani, P., G. P. Salvioli, und V. Eusebi. Marcello Malpighi (1628 – 1694) A founding father of modern anatomic pathology. *Am. J. Surg. Pathol.* 18: 741-746, 1994.

Schenkel A. R., Z. Mamdouh, X. Chen, R. M. Liebman, und W. A. Muller. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat. Immunol.* 3: 143-150, 2002.

Schenkel, A. R., T. W. Chew, und W. A. Muller. Platelet endothelial cell adhesion molecule deficiency or blockade significantly reduces leukocyte emigration in a majority of mouse strains. *J. Immunol.* 173: 6403-6408, 2004.

Schmid-Schonbein, G. W., S. Usami, R. Skalak, und S. Chien. The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. *Microvasc. Res.* 19: 45-75, 1980.

Schmid-Schonbein, G. W. Leukocyte kinetics in the microcirculation. *Biorheology* 24: 139-151, 1987.

Schmid-Schonbein, G. W., K. L. Sung, H. Tozeren, R. Skalak, und S. Chien. Passive mechanical properties of human leukocytes. *Biophys. J.* 36: 243-256, 1981.

Schmid-Schonbein, G. W., Y. C. Fung, und B. W. Zweifach. Vascular endothelium-leukocyte interaction: sticking shear force in venules. *Circ. Res.* 36: 173-184, 1975.

Shimakura, A., Y. Kamanaka, Y. Ikeda, K. Kondo, Y. Suzuki, und K. Umemura. Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 858: 55-60, 2000.

Simon, S. I., J. D. Chambers, E. Butcher, und L. A. Sklar. Neutrophil aggregation in $\beta 2$ integrin and L-selectin dependent in blood and isolated cells. *J. Immunol.* 149: 2765-2771, 1992.

Si-Tahar, M., D. Pidard, V. Balloy, M. Moniatte, N. Kieffer, A. van Dorsselaer, und M. Chignard. Human neutrophil elastase proteolytically activates the platelet integrin α IIb β 3 through cleavage of the carboxyl terminus of the α IIb subunit heavy chain. Involvement in the potentiation of platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* 272: 11636-11647, 1997.

Spertini, O., F. W. Luscinskas, G. S. Kansas, J. M. Munro, J. D. Griffin, M. A. Gimbrone, Jr., und T. F. Tedder. Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *J. Immunol.* 147: 2565-2573, 1991.

Springer, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314, 1994.

Stanley, P., P. A. Bates, J. Harvey, R. I. Bennett, and N. Hogg. Integrin LFA-1 alpha subunit contains an ICAM-1 binding site in domains V and VI. *EMBO J.* 13: 1790-1798, 1994.

Stockley R. A. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160: S49-S52, 1999.

Suzuki, K., H. Nakajima, K. Ikeda, T. Tamachi, T. Hiwasa, Y. Saito, and I. Iwamoto. Stat6-protease but not Stat5-protease is inhibited by an elastase inhibitor ONO-5046. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309: 768-773, 2003.

Taekema-Roelvink, M. E., C. Kooten, S. V. Kooij, E. Heemskerk, and M. R. Daha. Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 932-940, 2001.

Thomas, C., P. DeVries, J. Hardin, and J. White. Four-dimensional imaging: computer visualization of 3D movements in living specimens. *Science* 273: 603-607, 1996.

Toothill, V. J., J. A. VanMourik, H. K. Niewenhuis, M. J. Metzelaar, and J. D. Pearson. Characterization of the enhanced adhesion of neutrophil leukocytes to thrombin-stimulated endothelium cells. *J. Immunol.* 145: 283-291, 1990.

Uchiba, M., K. Okajima, K. Murakami, H. Okabe, und K. Takatsuki. Endotoxin-induced pulmonary vascular injury is mainly mediated by activated neutrophils in rats. *Thromb. Res.* 78: 117-125, 1995.

Vaporciyan, A. A., H. M. DeLisser, H.-C. Yan, I. I. Mendiguren, S. R. Thom, M. L. Jones, P. A. Ward, und S. M. Albelda. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* 262: 1580-1582, 1993.

Vejlens, G. The distribution of leukocytes in the vascular system. *Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl.* 33: 11-33, 1938.

Weber, C. 2003. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J. Mol. Med.* 81: 4-19

Weiss, S. J. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320: 365-376. 1989

Winn, H. J., C. A. Baldamus, S. V. Jooste, und P. S. Russell. Acute destruction by humoral antibody of rat skin grafted to mice. *J. Exp. Med.* 137: 893-910, 1973.

Woodman, R. C., P. H. Reinhardt, S. Kanwar, F. L. Johnston, und P. Kubes. Effects of human neutrophil elastase (HNE) on neutrophil function in vitro and in inflamed microvessels. *Blood* 82: 2188-2195, 1993.

Xie, Y. und W. A. Muller. Molecular cloning and adhesive properties of murine platelet/endothelial cell adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 5569-5573, 1993.

Young, R. E., R. D. Thompson, K. Y. Larbi, M. La, C. E. Roberts, S. D. Shapiro, M. Perretti, und S. Nourshargh. Neutrophil elastase (NE)-deficient mice demonstrate a nonredundant role for NE in neutrophil migration, generation of proinflammatory mediators, and phagocytosis in response to zymosan particles in vivo. *J. Immunol.* 172: 4493-4502, 2004.

Zeihner, B. G., S. Matsuoka, K. Kawabata, und J. E. Repine. Neutrophil elastase and acute lung injury: prospects for sivelestat and other neutrophil elastase inhibitors as therapeutics. *Crit. Care Med.* 30: S281-S287, 2002.

Zeihner, B. G., A. Artigas, J. L. Vincent, A. Dmitrienko, K. Jackson, B. T. Thompson, und G. Bernard; STRIVE Study Group. Neutrophil elastase inhibition in acute lung injury: results of the STRIVE study. *Crit. Care Med.* 32: 1695-1702, 2004.

Zeintl, H., F. U. Sack, M. Intaglietta, und K. Messmer. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 8: 293-302, 1989.

Zernike, F. Phase contrast: a new method for the observation of transparent objects. *Physica* 9: 686-693, 1942.

Zweifach B. W. und C. E. Kossmann. Micromanipulation of small, blood vessels in the mouse. *Am. J. Physiol.* 120: 23-35, 1937.

7. Eigene Publikationen

Originalia

1. Mempel, T.R., C. Moser, J. Hutter, W. M. Kuebler, und F. Krombach. Visualization of leukocyte transendothelial and interstitial migration using reflected light oblique transillumination in intravital video-microscopy. *J. Vasc. Res.* 40: 435–441, 2003.
2. Mossmann, S., J. Hutter, C. Moser, F. Krombach, and R. Huss. Milieu-adopted in vitro and in vivo differentiation of mesenchymal tissues derived from different adult human CD34-negative progenitor cell clones. *Cells Tissues Organs* 179:91-101, 2005.
3. Wegmann, F., Petri, B., Khandoga, A. G., Moser, C., Khandoga, A., Volkery, S., Li, H., Nasdala, I., Brandau, O., Fassler, R., Butz, S., Krombach, F., und D. Vestweber. ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. *J. Exp. Med.* 10: 1671-1677, 2006.
4. Moser, C., M. Ollert, F. Krombach, und D. E. Jenne. Elastase-2 and proteinase-3 are crucial for the early recruitment of neutrophils to inflammatory sites. (submitted)

Buchbeiträge

1. Moser, C.M., T.R. Mempel, J. Hutter, und F. Krombach. A novel method for the intravital microscopic analysis of leukocyte transendothelial migration *in vivo*. Chirurgisches Forum 2003, Editor: Hass N. Springer Verlag, Berlin – New York Forumband.

Abstracts

1. Moser, C.M., T. R. Mempel, J. Hutter, W. M. Kuebler, und F. Krombach. A novel method for the intravital microscopic analysis of leukocyte transendothelial migration. *J. Vasc. Res.* 39 (suppl. 1): 42, 2002.
2. Moser, C.M., T. R. Mempel, J. Hutter, W. M. Kuebler, und F. Krombach. A novel method for the quantitative microscopic analysis of leukocyte migration *in vivo*. *J. Vasc. Res.* 40: 194, 2002.
3. Moser, C. M., D. E. Jenne, H. Pfister, M. Ollert, und F. Krombach. Leukocyte migration in proteinase-3/elastase-2 double mutant mice *in vivo*. *J. Vasc. Res.* 41: 94-95, 2004.

8. Abschließende Bemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians- Universität München (Komm. Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl) in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. vet. F. Krombach durchgeführt.

Nach Beendigung der Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer für die freundliche Aufnahme in das Institut für Chirurgische Forschung und die fortwährende Unterstützung während der Erstellung dieser Doktorarbeit. Seine konstruktive und hilfreiche Kritik waren mir stets Ansporn, sein wissenschaftlicher Anspruch und seine Exaktheit Vorbild.

Herrn Prof. Dr. med. vet. F. Krombach für die Aufnahme in sein Team sowie die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit. Seine fachliche Kompetenz, sein Ideenreichtum sowie seine enorme Erfahrung waren mir stets eine große Hilfe. Er machte mich nicht nur mit dem wissenschaftlichen Arbeiten vertraut, sondern vermittelte mir durch seine Begeisterungsfähigkeit und internationalen Kooperationen auch die Freude an der Forschung. Insbesondere weiß ich das durch die Empfehlung und Aufnahme in das Graduiertenkolleg 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ in mich gesetzte Vertrauen zu würdigen. Die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe wird mir stets in guter Erinnerung bleiben.

Herrn Prof. Dr. med. W. Kübler für die Einführung in wissenschaftliches Arbeiten und seine fortwährende Unterstützung.

Abschließende Bemerkung

Herrn Prof. Dr. med. W. Siess für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ und die stetige Förderung.

Herrn Dr. med. T. Mempel für die anfängliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. J. Hutter für seine unermüdliche Unterstützung bei technischen Fragen, seine aktive Mithilfe, seinen Rat und seine Unterstützung. Seine Geduld und Zusprache haben mir stets geholfen.

Frau C. Brückl, Herrn C. Reichel und meinen restlichen Mitdoktoranden für ihre stete fachliche und persönliche Unterstützung.

Frau A. Schropp für ihre Hilfe bei der Anfertigung und Anfärbung der histologischen Schnittpräparate.

Herrn Dr. hum. biol. J. Peters für seine Unterstützung bei allen computer-technischen Fragen.

Frau Heigl für die Unterstützung in allen administrativen Fragen.

Den Tierpflegern des Instituts für Chirurgische Forschung, insbesondere Frau Blount, die sich in vorbildlicher Weise um die Versorgung und Pflege der Versuchstiere kümmerte.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Chirurgische Forschung für ihre kontinuierliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

9. Lebenslauf

Christian Martin Moser

Geburtsdatum/-ort 30. März 1979 in Dachau

Eltern Gisela Moser, geb. Eger
Ernst Moser

Schulausbildung 1985 – 1989 Grundschule Hochzoll-Süd, Augsburg
1989 – 1998 Rudolf-Diesel-Gymnasium Augsburg

Schulabschluß Abitur am 26. Juni 1998

Studium WS 1998/99 – WS 2004/05 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians Universität, München

Studienabschluss 12. April 2005

Berufliche Tätigkeit seit 01.06.2005 Assistenzarzt an der Universitäts-Hautklinik
Heidelberg