

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Angefertigt am Deutschen Herzzentrum München
(Prof. Dr. Steffen Massberg)

Die Rolle der Perizyten bei steriler Inflammation

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

Von **Annekathrin Eckart**

aus Memmingen

München, 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wanke

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Knubben-Schweizer
Univ.-Prof. Dr. Kaspers
Univ.-Prof. Dr. Köstlin
Univ.-Prof. Dr. Hirschberger

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

**Meinen Eltern
und
Großeltern**

I Einleitung	8
II Literaturübersicht	9
1 Morphologie und Funktion von Perizyten	9
2 Einfluss von Entzündungsmediatoren auf Perizyten	10
3 Physiologie der sterilen Inflammation	11
4 Ablauf der Entzündungskaskade	13
5 Rolle der neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei steriler Inflammation ...	15
5.1 Morphologie und Funktion myeloider Zellen	15
5.2 Faktoren der Rekrutierung myeloider Zellen in entzündetes Gewebe	18
5.3 Interstitielle Migration	21
6 Modelle der sterilen Inflammation	23
III Zielsetzung der Arbeit	24
IV Material und Methoden	27
1 Tiere	27
1.1 Haltung und Zucht	27
1.2 Tierstämme	28
1.2.1 NG2DsRed	28
1.2.2 LysM-eGFP	29
1.2.3 CX₃CR1-eGFP	29
1.3 Erstellung von Chimären	30
1.3.1 Bestrahlung	30
1.3.2 Präparation von Knochenmark	30
1.3.3 Schwanzveneninjektion	31
2 Zellkultur	32
2.1 Humane plazentare Perizyten	32
2.2 Immunfluoreszenz-Färbung	32
2.2.1 Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung	32
2.2.2 Konfokale Mikroskopie	34
2.2.2.1 Aufbau des konfokalen Mikroskopes	34
2.2.2.2 Färbung für die konfokale Mikroskopie	34
2.2.2.3 Auswertung mittels des konfokalen Mikroskopes	35
2.3 Stimulation von Perizyten	35
2.3.1 Pelletierung stimulierter Perizyten	35

2.3.2 Herstellung konditionierter Medien und Gewinnung von Mediumüberstand für ELISA.....	36
2.3.3 Gewinnung von nekrotischem Zellysat	37
2.4 Analyse mittels real-time PCR.....	37
2.4.1 Isolation von RNA aus Zellpellets.....	37
2.4.2 cDNA Synthese	38
2.4.3 real-time PCR	39
2.5 Chemotaxis Assay.....	40
2.5.1 Isolation von neutrophilen Granulozyten	40
2.5.2 Isolation von Monozyten.....	41
2.5.3 <i>In vitro</i> Chemotaxis Assays.....	42
2.5.3.1 Neutrophile Granulozyten.....	42
2.5.3.2 Monozyten.....	42
2.5.4 Inhibitorischer Chemotaxis Assay	43
2.6. Apoptose Assay und Aktivierungs Assay	43
2.6.1 Prinzip der Durchflußzytometrie	43
2.6.2 Durchführung des Apoptose Assays.....	44
2.6.3 Durchführung des Aktivierungs Assays.....	45
2.7 ELISA.....	46
2.7.1 Prinzip des ELISA.....	46
2.7.2 Durchführung des ELISA	46
3 Histologische Verfahren.....	47
3.1 Immunhistologie	47
3.1.1 Gefrierschnitte.....	47
3.1.1.1 Organ-Entnahme für Immunhistologie	47
3.1.1.2 Anfertigung der Gefrierschnitte	47
3.1.2 Immunfluoreszenz.....	47
3.1.2.1 Prinzip der immunhistologischen Färbungen	47
3.1.2.2 Durchführung der Immunhistologie	48
3.2 Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	49
4 <i>In vivo</i> 2-Photonen Mikroskopie	49
4.1 Aufbau des 2-Photonen Mikroskops	49
4.2 Auswertung mittels des 2-Photonen Mikroskopes	51
4.3 Anästhesie	53

4.3.1 Durchführung der Narkose	53
4.3.2 Narkosemanagement und –überwachung.....	54
4.4 Femoraliskatheter und Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen.....	54
4.5 Ohrmodell	57
4.5.1 Injektion chemotaktisch wirkender Substanzen	58
4.5.2 Laser Verletzung	59
5 Whole Mount Staining	59
5.1 Durchführung des Whole Mount Stainings	60
5.2 Auswertung mittels 2-Photonen Mikroskopie	60
6 Versuchsplanung und Durchführung.....	61
7 Statistische Versuchsauswertung.....	62
V Ergebnisse	63
1 Charakterisierung der humanen Perizyten	63
2 Expression von Rzeptoren durch Perizyten.....	64
3 Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen durch Perizyten	65
4 Chemotaktische Wirkung von Perizyten auf myeloide Zellen.....	74
5 Anti-apoptotische und aktivierende Wirkung von Perizyten auf neutrophile Granulozyten <i>in vitro</i>	78
6 Die sterile Inflammation im Mausmodell.....	81
7 Interaktion von Perizyten mit myeloiden Zellen <i>in vivo</i>	84
7.1 Ungerichtete Migration bei Injektion von fMLP bzw. TNF- α	84
7.2 Gerichtete Migration bei Laser-Verletzung.....	88
VI Diskussion	91
1 Wahl der Mauslinien.....	91
2 Wahl des Ohrmodells für die 2-Photonen Mikroskopie	91
3 Wahl der humanen Perizyten für die <i>in vitro</i> Versuche	92
4 Diskussion der Ergebnisse	92
4.1 Perizyten detektieren Reize steriler Inflammation	93
4.2 Perizyten reagieren auf inflammatorische Reize mit Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen	94
4.3 Perizyten sezernieren Faktoren, die chemotaktisch und anti-apoptotisch auf myeloide Zellen wirken	96
4.4 Perizyten interagieren <i>in vivo</i> mit myeloiden Zellen.....	100
5 Ausblick.....	102

VII Zusammenfassung	103
VIII Summary	104
IX Abkürzungsverzeichnis	105
X Abbildungsverzeichnis	108
XI Tabellenverzeichnis	110
XII Literaturverzeichnis.....	111
XIII Danksagung	119

I Einleitung

Sterile Inflammation stellt die pathophysiologische Grundlage häufiger Erkrankungen wie Gewebetrauma, Ischämie/Reperfusionsschaden, Atherosklerose und einiger Autoimmunprozesse dar. Dabei kommt es durch Freisetzung intrazellulärer Moleküle zu einer sterilen Entzündung, die ohne Beteiligung einer Infektion abläuft. Unter physiologischen Bedingungen sind diese Moleküle vor der Erkennung durch das wirtseigene Immunsystem geschützt, nach Freisetzung durch Zellschaden oder Nekrose lösen sie jedoch eine Entzündungsreaktion aus. Die dabei beteiligten Schritte bis zur Transmigration der Leukozyten durch die Endothelschicht wurden bereits ausführlich untersucht^{53,68}, nicht jedoch die darauf folgende interstitielle Migration durch das Gewebe. Ebenso gibt es kaum Untersuchungen, ob neben Endothelzellen auch andere Zelltypen der Gefäßwand auf sterile Inflammation reagieren und ob diese die Migration von Leukozyten beeinflussen.

Perizyten sind essentielle Bestandteile der Mikrozirkulation und umhüllen die Endothelzellen der Blutgefäßwand, zu denen sie auch direkten Kontakt haben. Sie nehmen eine strategische Lage an der Schnittstelle zwischen der Zirkulation und dem Interstitium ein. Dabei ist bisher nicht klar, ob und wie die abluminale Seite der Gefäßwand zu inflammatorischen Prozessen beiträgt. Kürzlich wurde die Rolle der Perizyten in der Entwicklung und Regulation der Blut-Hirn-Schranke aufgeklärt, wobei gezeigt wurde, dass diese wichtige Modulatoren der Gefäßwandpermeabilität darstellen und so zur Inflammation beitragen⁴. Die Kommunikation der Perizyten mit ihrem zellulären Umfeld und vor allem die mögliche Interaktion mit Zellen des angeborenen Immunsystems während interstitieller Migration im peripheren Gewebe sind jedoch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit werden die zellulären und molekularen Mechanismen der Reaktion von Perizyten auf sterile Inflammationsprozesse analysiert und die Ergebnisse anschließend *in vivo* am Mausmodell untersucht. Eine der Hauptfragen ist, inwieweit Perizyten auf sterile Inflammationsprozesse reagieren können und ob sie einen Einfluss auf die Rekrutierung von Entzündungszellen haben. Weiterhin soll geklärt werden, ob Perizyten mit myeloiden Zellen *in vivo* interagieren. Dazu werden am Mausmodell die physiologischen Begebenheiten bei einem sterilen Gewebsuntergang induziert und die Reaktion der Perizyten *in vivo* untersucht.

II Literaturübersicht

1 Morphologie und Funktion von Perizyten

Bei Perizyten handelt es sich um perivaskuläre Zellen, die unmittelbar um das Endothel angeordnet sind und vor allem in den Blutgefäßen der Mikrozirkulation zu finden sind³. Zum ersten Mal beschrieben wurden sie im Jahre 1885 von Rouget⁷. Perizyten sind 150 bis 200 μm lang und 10 bis 25 μm breit. Sie besitzen einen Zellkörper mit prominentem Zellkern, geringem Gehalt an Zytoplasma und bilden mehrere lange Fortsätze aus. Mit diesen formen sie ein diskontinuierliches Netzwerk, das zum einen die Endothelzellen umhüllt^{53,11} und sich zum anderen auf mehr als eine Kapillare ausbreiten kann¹¹.

Perizyten sind mesenchymale Zellen, deren Ursprung nicht vollständig verstanden ist. Die meisten gehen aus mesenchymalen Stammzellen oder interstitiellen Fibroblasten hervor. Eine Umwandlung aus Endothelzellen wird ebenso vermutet^{21,23}. Zudem wird angenommen, dass Perizyten selbst auch zu anderen mesenchymalen Zelltypen differenzieren können, wie Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten und glatten Muskelzellen¹⁹.

Zusammen mit glatten Muskelzellen werden Perizyten als Gefäßwandzellen (mural cells) bezeichnet, auch wenn sie sich von diesen durch ihre Morphologie, die unmittelbare Nähe zum Endothel und die Markerexpression unterscheiden (siehe Abbildung 1)². So sind Perizyten direkt in die vaskuläre Basalmembran eingebettet und über direkte Zellkontakte sowie parakrine Signalwege funktionell eng an die Endothelzellen gekoppelt¹¹.

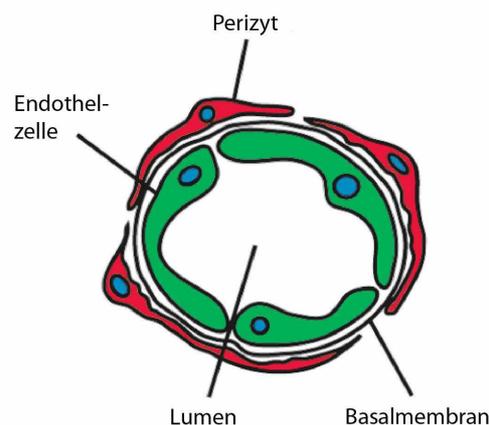


Abbildung 1: Zusammensetzung der Blutkapillaren

Zusammensetzung der Blutkapillaren aus Endothelzellen (grün), Basalmembran (schwarz) und Perizyten (rot); modifiziert nach Bergers et al.¹¹

Für ihre Charakterisierung und Identifikation werden verschiedene Marker herangezogen. Bedeutend sind die intrazellulären Marker Desmin und α -SMA. Beide sind kontraktile Elemente, die auch in für glatten Muskelzellen zu finden sind¹¹. Zur Abgrenzung von glatten Muskelzellen dient Calponin, welches von glatten Muskelzellen, nicht aber von Perizyten exprimiert wird. Das Proteoglycan Neuron-Glial Antigen 2 (NG2) wird von Perizyten entlang der Arteriolen und Kapillaren, nicht aber entlang von Venolen exprimiert. Nur im Zuge der Angiogenese wurde bislang beschrieben, dass auch venöse Perizyten NG2 exprimieren⁶².

Es gibt allerdings keinen perizyten-spezifischen Marker, der von allen Perizyten exprimiert wird¹¹, was auf ihre unterschiedlichen Charakteristika, Funktionen und Lokalisationen zurückzuführen ist. 80 bis 90% der Subpopulationen der Perizyten exprimieren jedoch einen oder mehrere der oben aufgeführten Marker⁶⁰.

In allen vaskularisierten Geweben sind Perizyten zu finden, ihre Funktion ist aber nur sehr unvollständig erforscht. Besonders viele Perizyten befinden sich im zentralen Nervensystem, wo sie für die Bildung und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke unerlässlich sind^{20,4}. Des Weiteren sind sie an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt, was sich in einer Dilatation der Gefäße und Ödembildung bei Verlust der Perizyten äußert¹¹. Darüber hinaus haben sie eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung neu entstandener Blutgefäße im Rahmen der Angiogenese²³. Weitgehend ungeklärt ist, welche Bedeutung Perizyten bei der Entzündungsreaktion spielen, obwohl bekannt ist, dass Veränderungen der Gefäßwand entscheidend für die Entstehung dieser elementaren Gewebereaktion sind. Daher sollen diese Prozesse im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

2 Einfluss von Entzündungsmediatoren auf Perizyten

Die Rolle von Perizyten bei Entzündungsreaktionen ist bislang weitgehend unbekannt. In nur wenigen Arbeiten wurde untersucht welchen Einfluss unterschiedliche Entzündungsmediatoren auf die Perizyten haben und welche Zytokine als Antwort darauf von den Perizyten sezerniert werden.

Balabanov et al. untersuchten den Einfluss verschiedener inflammatorischer Zytokine auf zerebrale Perizyten und fanden heraus, dass Perizyten basal niedrige Level des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und des Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I Moleküls exprimieren, welches als Antwort auf das Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) hochreguliert werden kann^{7,17}. MHC II exprimieren sie nicht basal, die Expression kann durch Stimulation mit Zytokinen, wie IFN γ , allerdings induziert

werden. Dadurch erlangen die ZNS-Perizyten die Fähigkeit Antigene zu präsentieren. Ebenso ist bekannt, dass eine kleine Subpopulation von Perizyten basal ein niedriges Level des vaskulären Adhäsionsmoleküls VCAM-1 exprimieren, welches nach Stimulation mit TNF- α verstärkt exprimiert wird⁷. Da bislang wenig über den Einfluss der Entzündungsmediatoren auf Perizyten bekannt ist, soll in der vorliegenden Arbeit ein Beitrag zur genaueren Charakterisierung der Perizyten und ihrer Reaktion auf proinflammatorische Stimuli geleistet werden.

3 Physiologie der sterilen Inflammation

Unter steriler Inflammation wird eine Entzündungsreaktion verstanden, die aufgrund einer Gewebeschädigung ohne Beteiligung einer Infektion durch pathogene Erreger wie Bakterien oder Viren ausgelöst wird⁵⁸. Die sterile Entzündung läuft auf ähnliche Art und Weise wie die Erreger-induzierte Inflammation ab. Sie wird charakterisiert durch eine Veränderung der Gefäßpermeabilität, der Rekrutierung von Leukozyten und der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Ebenso benutzen beide Entzündungsformen teilweise ähnliche Mechanismen und Rezeptoren¹⁸.

Der auslösende Mechanismus für die sterile Inflammation unterscheidet sich jedoch von dem der Infektion. Nekrotischer Zelluntergang und die dabei freigesetzten intrazellulären Moleküle führen zu einer weitreichenden sterilen Entzündungsreaktion. Diese ist durch die Ansammlung von Zellen des angeborenen Immunsystems in dem betroffenen Gewebe charakterisiert⁵⁸. Die sterile Inflammation stellt die Grundlage vieler Autoimmunerkrankungen wie Gicht, rheumatoide Arthritis und Atherosklerose dar⁷⁵. Solche Reaktionen sind als Teil der Wundheilung zu sehen, bei der neutrophile Granulozyten und Makrophagen aufgrund ihrer phagozytotischen Funktion zur Abräumung der nekrotischen Zellen beitragen⁵⁸. Neutrophile Granulozyten besitzen jedoch ein großes Arsenal an hydrolytischen, oxidativen und porenbildenden Molekülen, die in der Lage sind eine zusätzliche Schädigung des Gewebes hervorzurufen. Daher trägt die überschießende Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten als Antwort auf sterile Entzündungsreize als solche zur Immunpathologie vieler Krankheiten bei⁵⁸.

Reize, die zur sterilen Inflammation führen, sind vor allem die sogenannten damage-associated molecular patterns (DAMPs). Darunter versteht man endogene proinflammatorische Moleküle wie Proteine, Nukleinsäuren, Komponenten der extrazellulären Matrix und Lipidmediatoren⁵⁸. Diese sind unter physiologischen Bedingungen

meist intrazellulär lokalisiert und so vor der Erkennung durch das Immunsystem geschützt. Dadurch wird die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und ungerichteter Entzündungen verhindert. Werden diese intrazellulären Faktoren jedoch in das umliegende Gewebe freigesetzt, wie das bei einer Nekrose der Fall ist, kommt es zu einer Entzündungsreaktion^{80,8}.

Es gibt eine große Bandbreite an unterschiedlichen DAMPs, die zu steriler Inflammation führen. Wichtige, auch in der vorliegenden Arbeit verwendete DAMPs, sind die Moleküle Adenosin-Triphosphat (ATP) und Formyl-Peptide (fMLP), die auch im nekrotischen Zelllysate zu finden sind. Nekrotische Zellen setzen Moleküle frei, die als endogene Signale auf das angeborene Immunsystem wirken. Zelllysate, das aus nekrotischen Zellen gewonnen wurde, enthält ein komplexes Gemisch diverser Signalstoffe wie HMGB-1 und Heat Shock Proteine (HSPs) und wirkt direkt stimulierend auf die proinflammatorische Zytokin- und Chemokin-Produktion der Monozyten und Makrophagen^{24,93,77}.

fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), stellvertretend für die Gruppe der bakteriellen oder mitochondrialen N-Formyl-Peptide, wird bei Nekrose aus den Mitochondrien der Zellen freigesetzt. Es wirkt als starkes Chemoattraktans auf neutrophile Granulozyten und Makrophagen und induziert deren Aktivierung. Über seine Rezeptoren (FPR1, FPR2, FPR3) ist fMLP maßgeblich an der lokalen Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems an den Ort der Entzündungsreaktion beteiligt. Die Expression dieser Rezeptoren wird durch eine Vielzahl an Zytokinen beeinflusst⁹⁶. Auch Adenosin-Triphosphat (ATP) zählt zu den DAMPs. Es wird bei Zellschädigung freigesetzt bzw. von verschiedenen Zellarten aktiv sezerniert²⁸. ATP hat sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine chemotaktische Wirkung⁴², daneben moduliert es ebenso die Zytokinproduktion und Zellaktivierung⁴⁵. Bei Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) handelt es sich um ein Zytokin, welches vor allem von Makrophagen produziert und sezerniert wird. Seine Hauptfunktion liegt in der Stimulation von Immunzellen, was vor allem über die TNF-Rezeptoren 1 und 2 erzielt wird.

DAMPs wirken auf unterschiedliche Rezeptoren auf ihren Zielzellen. Diese Rezeptoren werden Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs) genannt. Wenn sie durch Bindung von DAMPs aktiviert werden, kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen durch Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen. Es gibt verschiedene Klassen der PRRs, dazu zählen Toll-like Rezeptoren (TLRs), bei welchen es sich um transmembranöse Rezeptoren auf der Zelloberfläche handelt und NODlike Rezeptoren (NLRs), die im Zytoplasma lokalisiert sind. Diese spielen eine zentrale Rolle bei der Detektion von Entzündungsreizen (siehe Abbildung 2)⁹¹. Nachfolgend auf diese auslösenden Reize wird

über die Aktivierung der PRRs die Entzündungskaskade in Gang gesetzt, welche zur Rekrutierung von Leukozyten führt. Schematisch wird dieser Mechanismus in der nachfolgenden Abbildung dargestellt:

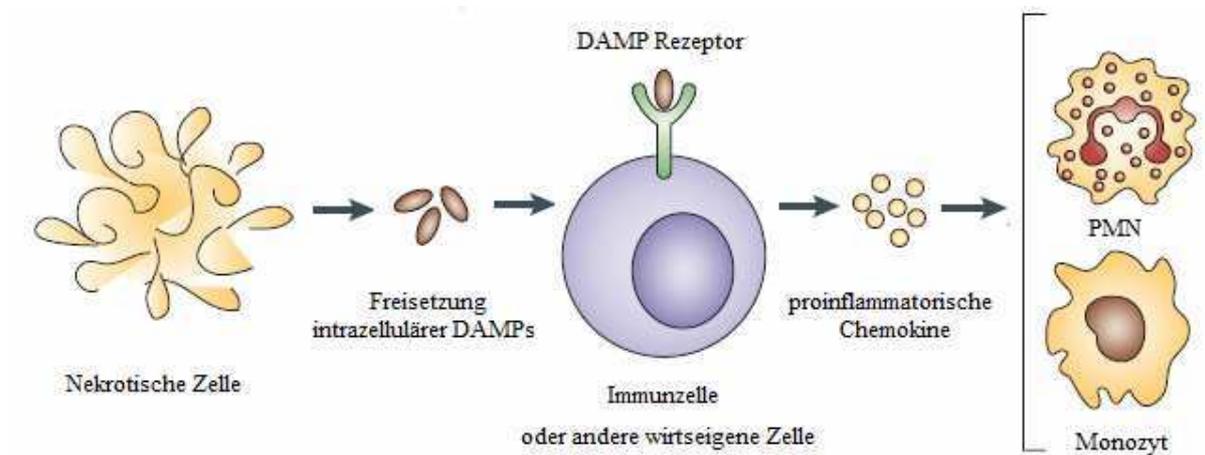


Abbildung 2: Mechanismus der sterilen Inflammation

Mechanismus der sterilen Inflammation; nekrotische Zellen setzen intrazelluläre DAMPs frei, welche durch Rezeptoren auf Immunzellen oder anderen wirtseigenen Zellen erkannt werden. Es kommt zur Sekretion von proinflammatorischen Moleküle, die zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (PMN) und Monozyten führen; modifiziert nach Kono et al.⁵¹

4 Ablauf der Entzündungskaskade

Bei der sterilen Entzündung wird, ebenso wie bei einer klassischen Entzündung, zu Beginn die Entzündungskaskade aktiviert, die zur Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut an den Ort der Inflammation führt. Diese Kaskade (siehe Abbildung 3) beschreibt die an der Extravasation beteiligten Schritte und Interaktionen. Zunächst vermitteln Selektine das Rollen von Immunzellen entlang des Endothels, gefolgt von der chemokinvermittelten Aktivierung und der stabilen Adhäsion an die Gefäßwand, welche durch Integrine ermöglicht wird⁵³. Nach erfolgter Adhäsion von Immunzellen an das Endothel kommt es zum Durchtritt (Transmigration) der Zellen durch die Gefäßwand, was entweder transzellulär oder parazellulär erfolgen kann⁶⁸. Sobald die Zellen ins Interstitium ausgewandert sind, folgt die interstitielle Migration, die in Punkt II 5. 3 dargestellt wird.

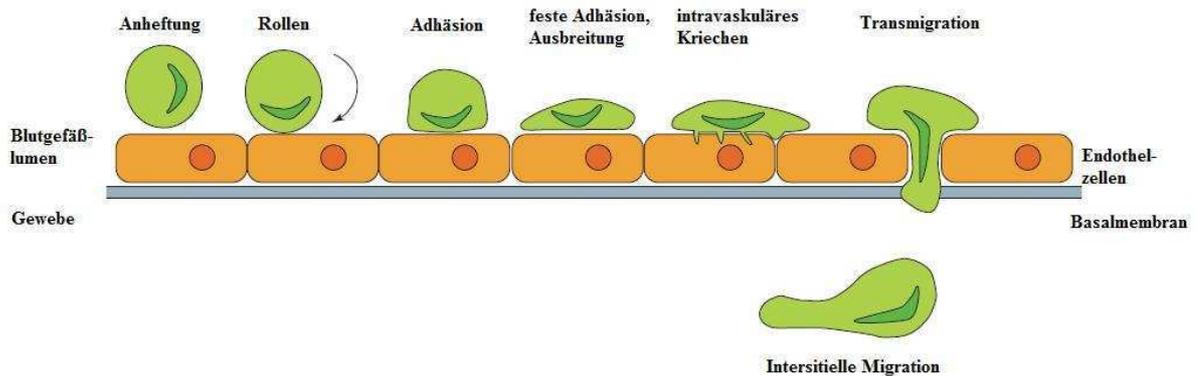


Abbildung 3: Adhäsionskaskade

Ablauf der einzelnen Schritte, die zur Extravasation von Leukozyten führen; modifiziert nach Schymeinsky et al.⁸²

Beim Rollen ist vor allem P-Selektin entscheidend beteiligt, welches bei Stimulation, z.B. mit Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α), von den Endothelzellen vermehrt an der Oberfläche präsentiert wird. Gleichzeitig wird auf der Oberfläche der Leukozyten P-Selektin Glykoprotein Ligand -1 (PSGL-1) exprimiert, was zu einer schwachen Interaktion und im Zusammenspiel mit den Scherkräften des Blutes zum Rollen der Entzündungszellen führt^{47,59}. Für die anschließende Aktivierung sind Chemokine von Bedeutung, welche zur Aktivierung von Adhäsionsmolekülen (Integrinen) führen. Der rollende Leukozyt wird von Chemokinen oder anderen chemotaktischen Molekülen, wie fMLP, stimuliert, woraufhin er mittels seiner Oberflächen-Integrine mit Endothelzellen eine Bindung eingeht. Aus dieser Integrin-Interaktion resultiert die feste Adhäsion von Leukozyten am Endothel bevor sie durch die Blutgefäßwand migrieren. Von Bedeutung in der Adhäsionskaskade sind seitens des Endothels vor allem ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule 1) und VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1), welche über β_2 -Integrine (wie Mac-1 und LFA-1) bzw. β_1 -Integrine (wie VLA-4) Kontakte zu Leukozyten herstellen⁴⁹.

Bei Chemokinen handelt es sich um Zytokine, die eine gerichtete Migration von Leukozyten bewirken können⁵⁶. Produziert werden sie von Endothelzellen, Leukozyten oder Bindegewebszellen⁷⁶. Sie binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf Leukozyten und vermitteln gerichtete Migration, wenn sie in einem Gradienten vorhanden sind. Jeder Leukozyten-Subtyp hat die Fähigkeit auf multiple verschiedene Chemokine zu reagieren, abhängig von seiner Ausstattung mit Rezeptoren²⁹. Ebenso binden viele Chemokine an

mehrere Rezeptoren, so dass dieses System eine hohe Redundanz aufweist. Mehr zur Funktion und den Subtypen der Chemokine wird in Punkt II 5.2 dargestellt wird.

5 Rolle der neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei steriler Inflammation

5.1 Morphologie und Funktion myeloider Zellen

Weißer Blutzellen (Leukozyten) stellen eine vielfältige Zellpopulation dar, die für die Immunreaktionen des Organismus verantwortlich ist. Sie zirkulieren durch das Blut und das lymphatische System und werden zum Ort der Entzündung rekrutiert, wo sie zur Pathogenerkennung und -abtötung beitragen. Leukozytensubpopulationen werden durch funktionelle und morphologische Charakteristika unterschieden. Gemeinsam ist ihnen der Ursprung aus hämatopoietischen Stammzellen, aus denen sie sich entlang spezifischer Differenzierungswege weiter entwickeln (siehe Abbildung 4)³⁵.

Aus den myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich sowohl Granulozyten, welche dann in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten unterteilt werden, als auch Monozyten. Aus Letzteren entstehen bei Auswanderung in das Gewebe Makrophagen und dendritische Zellen⁴⁴.

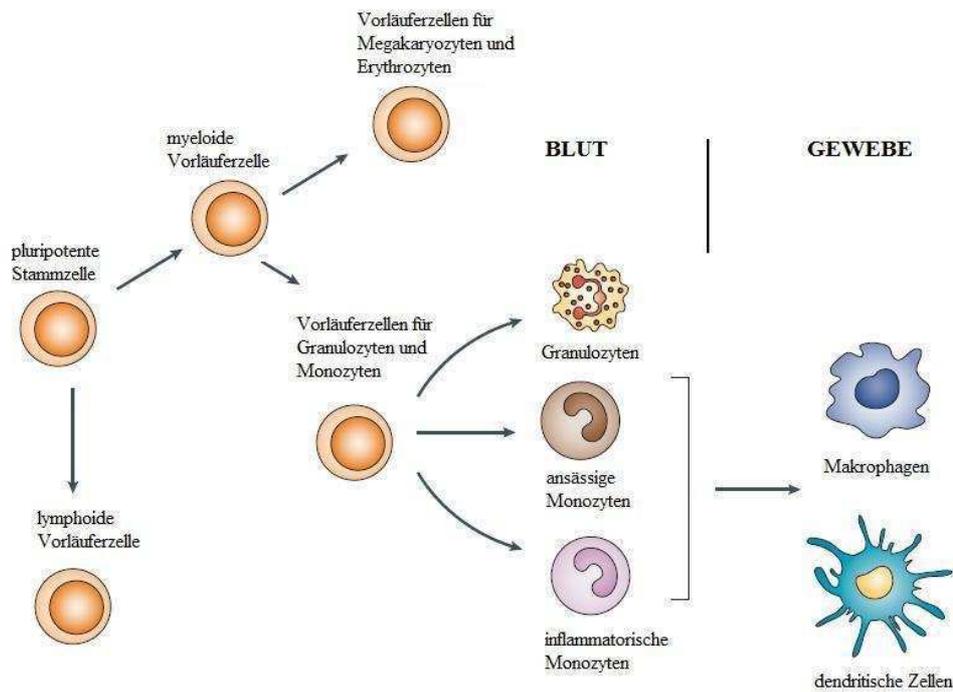


Abbildung 4: Entwicklungsreihe der myeloiden Zellen

Abstammung der myeloiden Leukozyten; modifiziert nach Imhof et al.⁴⁴

Neutrophile Granulozyten sind sekretorische und phagozytäre Zellen des angeborenen Immunsystems, die zur Identifizierung und Zerstörung von Pathogenen beitragen. Sie sind unter den ersten Blutzellen, die ins geschädigte Gewebe einwandern und dort Phagozytose betreiben. In ihrem Zytoplasma enthalten sie Granula, in denen Enzyme und weitere antimikrobielle und proinflammatorische Stoffe gespeichert sind⁴³. Neutrophile Granulozyten wandern über die Adhäsionskaskade aus den Blutgefäßen in Richtung des Gewebeschaden aus, wobei sie nicht nur Phagozytose betreiben, sondern durch ihre Degranulation auch zusätzlichen Gewebeschaden anrichten können⁶⁷.

Monozyten zirkulieren im Blut und differenzieren nach der Transmigration zu Makrophagen oder dendritischen Zellen. Nach Aktivierung können sie sowohl zur lokalen Auflösung der Entzündung beitragen, als auch das Interstitium wieder verlassen und zu sekundären lymphatischen Organen migrieren, wo sie als antigenpräsentierende Zellen fungieren. Zu ihren Aufgaben gehören die Detektion inflammatorischer Prozesse, die Phagozytose von

Pathogenen sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und inflammatorischer Zytokine⁶⁸. Weiterhin können sie die T-Zell vermittelte Immunantwort auslösen und zur Gewebereparatur und Angiogenese beitragen. Sie sind allerdings auch in der Lage, die adaptive Immunantwort bei Infektionen und Autoimmunerkrankungen zu unterdrücken^{83,25,64}. Monozyten produzieren inflammatorische Zytokine, nehmen Zellen und toxische Moleküle auf und wirken als antigenpräsentierende Zellen. Sie stellen ein Reservoir an myeloiden Vorläuferzellen für die Erneuerung der Gewebsmakrophagen und der dendritischen Zellen dar. Durch die Fähigkeit, sich in dendritische Zellen zu wandeln, gehören Monozyten sowohl dem angeborenen, als auch dem erworbenen Immunsystem an^{84,71,34,95}. Sie stellen im murinen Blut 4% der Leukozyten dar, beim Mensch hingegen 10%⁵.

Bei der Maus existieren zwei Subpopulationen zirkulierender Monozyten, unterteilt nach ihren Markern und Funktionen (siehe Abbildung 5)²⁷. Die größere Subpopulation exprimiert das Oberflächenprotein Ly6C, welches durch den Antikörper GR1 erkannt wird, den Chemokinrezeptor CCR2 und ein niedriges Level des Chemokinrezeptors CX₃CR1. Sie werden daher auch als CX₃CR1^{lo}CCR2⁺Gr1⁺ bezeichnet³⁴ und sind den humanen CD14⁺ Monozyten äquivalent³⁴. Murine Ly6C⁺ (GR1⁺) werden auch inflammatorische Monozyten genannt und *in vivo* zu entzündetem Gewebe und Lymphknoten rekrutiert^{34,84}.

Die zweite Unterart der Monozyten ist charakterisiert durch eine geringere Anzahl, die hohe Expression des Chemokin-Rezeptors CX₃CR1 und fehlender Expression von Ly6C. Demnach werden diese Monozyten als CX₃CR1^{hi}CCR2⁻Gr1⁻ bezeichnet und auch klassische oder patrouillierende Monozyten genannt. Sie besitzen eine längere Überlebensdauer *in vivo* und überwachen im nicht-entzündeten Zustand die Blutgefäße³⁴. Diese Unterart ist charakterisiert durch die CX₃CR1-abhängige Rekrutierung in nicht-entzündetes Gewebe³⁴ und ist involviert in die Entstehung von Autoimmunerkrankungen^{79,65}.

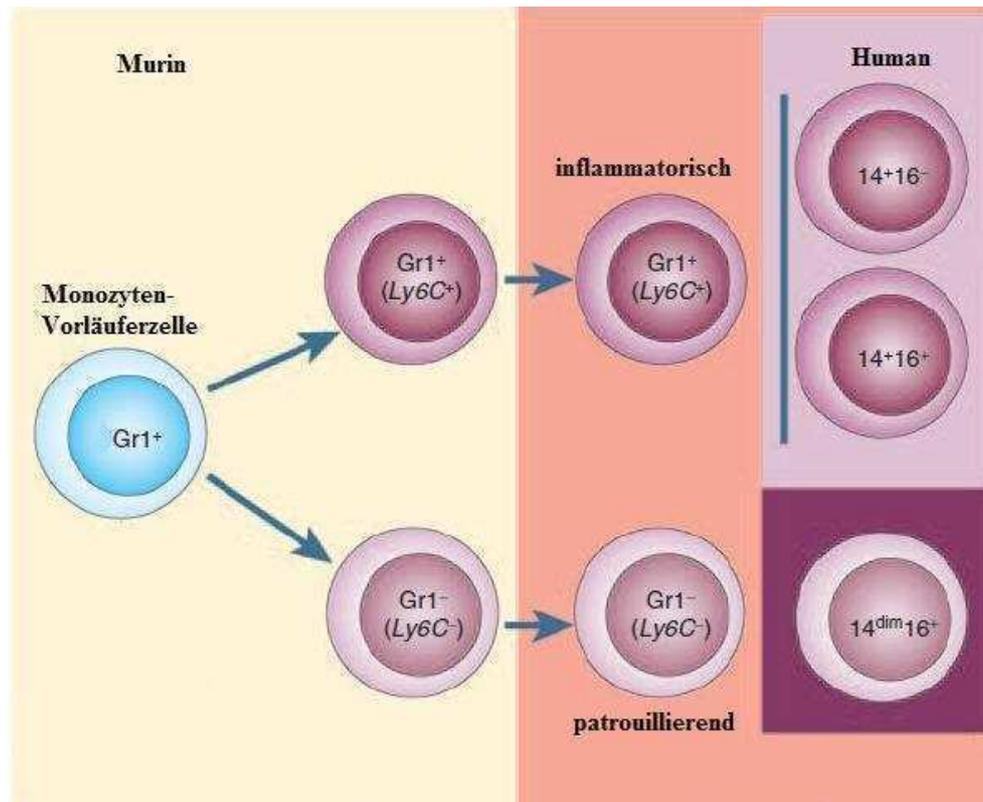


Abbildung 5: Subtypen der Monozyten

Subtypen der murinen Monozyten im Vergleich zu den humanen Subtypen; modifiziert nach Saha et al.⁶⁸

5.2 Faktoren der Rekrutierung myeloider Zellen in entzündetes Gewebe

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten aus der Blutzirkulation in das Gewebe erfordert ein Zusammenspiel adhäsiver Mechanismen zwischen den Leukozyten und dem Endothel und die Etablierung eines Gradienten chemotaktisch wirkender Moleküle, wie unter II 4 beschrieben wurde.

Für die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten sind vor allem die Chemokine CXCL1 bei der Maus und CXCL8 (IL8) beim Mensch verantwortlich. CXCL1 wird insbesondere von Makrophagen produziert und wirkt über den CXCR2-Rezeptor auf neutrophile Granulozyten. CXCL8 ist ein humanes Analogon zu CXCL1 und wird von vielen Zellen produziert, darunter Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Endothelzellen⁴¹.

Die Rekrutierung der klassischen Monozyten (Ly6C⁻) in das entzündete Gewebe ist vor allem von CX₃CL1 (Fraktalkine) und CCL3 (MIP) abhängig, die Rekrutierung der inflammatorischen Monozyten (Ly6C⁺) von dem Chemokin CCL2 (MCP-1)⁴⁴.

Neutrophile Granulozyten und Monozyten haben im Entzündungsgeschehen ähnliche Aufgaben. Sie unterscheiden sich jedoch im Zeitpunkt an dem sie am Ort der Entzündung aktiv werden. So sind neutrophile Granulozyten innerhalb weniger Minuten vor Ort, Monozyten erst nach mehreren Stunden bis Tagen⁸⁵.

Die Antwort auf einen Entzündungsreiz läuft zwischen diesen beiden Zellarten geregelt ab. In der ersten Phase der Entzündung wird diese durch Monozyten wahrgenommen und mit Zytokin-Ausschüttung beantwortet. Dies führt zur zweiten Phase, in der neutrophile Granulozyten rekrutiert werden, eigene Zytokine ausschütten und dadurch weitere Monozyten anlocken⁸⁵. So konnte nachgewiesen werden, dass die Depletion der klassischen Monozyten, d.h. ihre pharmakologische Eliminierung aus dem Kreislauf, die Ansammlung von neutrophilen Granulozyten verringert. Dies geschieht dadurch, dass die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten, die normalerweise von Monozyten gefördert wird, nicht stattfinden kann. Somit spielen Monozyten eine Schlüsselrolle bei der Extravasation neutrophiler Granulozyten⁵².

Das Zusammenspiel der Rekrutierung wird durch Signalstoffe wie Zytokine und Chemokine gesteuert. Leukozyten besitzen auf ihrer Oberfläche ein entsprechendes Repertoire an Rezeptoren, um mit den Chemokinen zu interagieren⁵⁷. Die große Familie der Chemokine wird klassifiziert auf Basis ihrer strukturellen Eigenschaften, welche die Anzahl und die Position der Cystein-Reste betrifft. Daraus entstanden zwei große Chemokin-Subfamilien, CXC und CC und zwei kleinere C und CX3C (siehe Abbildung 6).

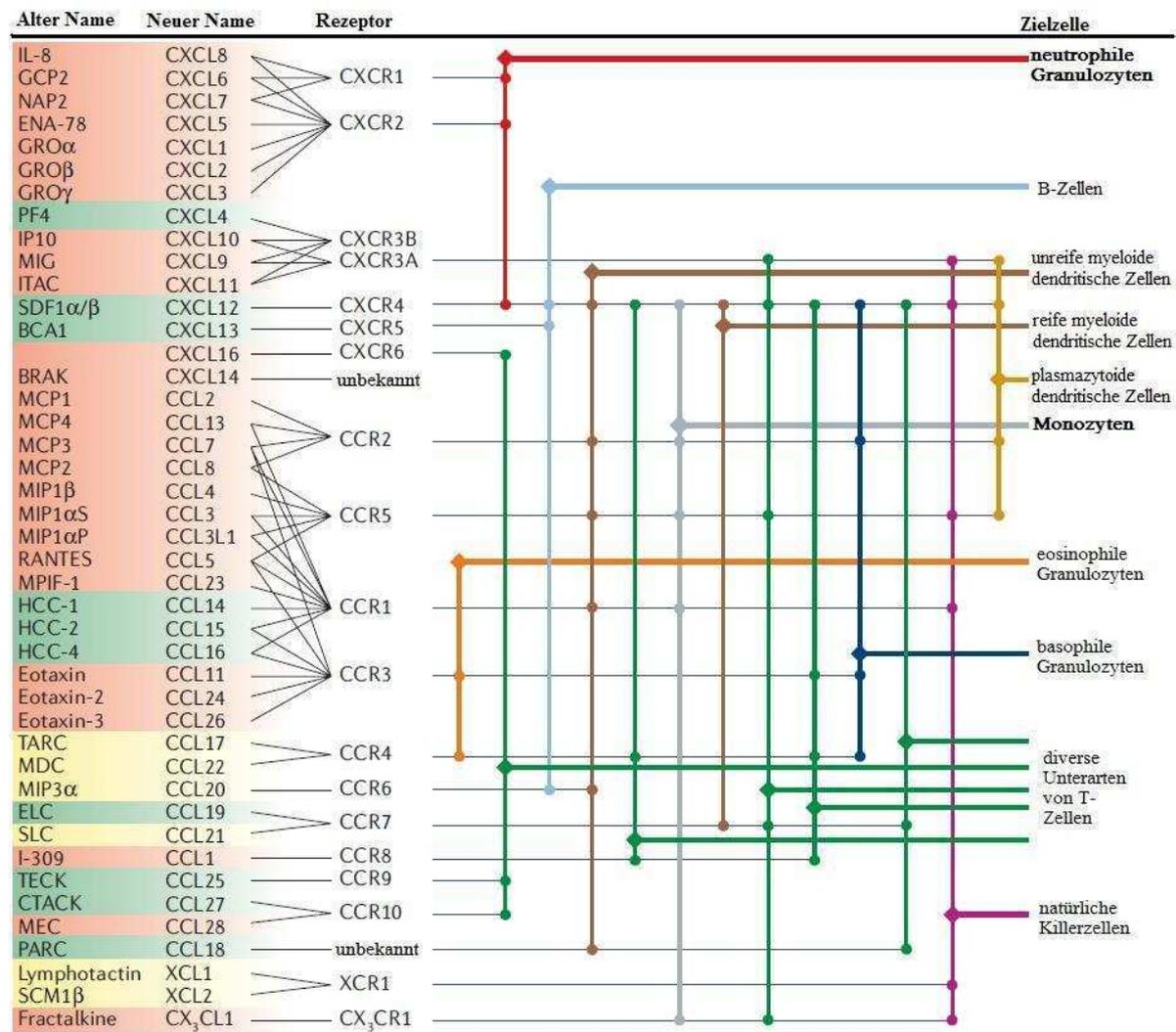


Abbildung 6: Übersicht über die bekannten Chemokine

Bekannte Chemokine, ihre Rezeptoren und die Zellen an denen sie wirken; modifiziert nach Mantovani et al.⁵⁷

Chemokine werden als Antwort auf Entzündungsreize von unterschiedlichen Zelltypen sezerniert und dirigieren so das Entzündungsgeschehen wesentlich mit. Zu diesen inflammatorischen Stimuli zählen auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Moleküle LPS, TNF- α , fMLP, ATP und nekrotisches Zelllysat (siehe II 3). Diese Stoffe induzieren die Produktion inflammatorischer Zytokine, welche durch einen Chemokingradienten die Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe vermitteln⁷⁶. Die Hauptaufgabe von Chemokinen ist ihre chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen und die Kontrolle der Leukozytenmigration und -positionierung im Gewebe⁸¹. Diese erfolgt in einer Kaskade, die die spezifische Anreicherung myeloider Zellen an den Ort der sterilen Gewebeschädigung im interstitiellen Raum vermittelt²⁹.

Ein weiteres wichtiges chemokinähnliches Molekül für die inflammatorische Reaktion und die Rekrutierung von Entzündungszellen ist Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), welchem zunächst inhibitorische Eigenschaften auf die Migration von Makrophagen zugesprochen wurden. Später fanden sich allerdings auch chemotaktische Eigenschaften des MIF auf myeloide Zellen und T-Zellen¹². MIF bindet an die Chemokin-Rezeptoren CXCR2, CXCR4 und CD74 und ist ein wichtiger Mediator des angeborenen Immunsystems mit zentraler Rolle in der Pathophysiologie von Entzündung und Autoimmunerkrankungen. Es weist strukturelle Ähnlichkeiten zu IL8 auf⁹⁰. Exprimiert wird MIF vor allem von Makrophagen und einigen Endothel-Subpopulationen^{63,90}.

5.3 Interstitielle Migration

Als Reaktion auf ein Entzündungsgeschehen wandern neutrophile Granulozyten und Monozyten aus den Blutgefäßen aus und setzen ihren Weg anschließend durch das Gewebe hindurch fort, bis sie den Entzündungsherd erreichen. Diese Wanderung durch das Gewebe wird interstitielle Migration genannt. Sie ist sowohl von der Art des Gewebes als auch vom Zelltyp abhängig³². Während mesenchymale Zellen aufgrund ihrer Rezeptoren-Ausstattung strikt an vorgegebene Leitstrukturen gebunden sind, können Leukozyten entlang eines Gradienten direkt durch das Gewebe migrieren⁷².

Nachfolgend auf eine Verletzung migrieren die ersten neutrophilen Granulozyten auf direktem Weg zum Entzündungsfokus. Darauf folgen Wellen an verstärkenden neutrophilen Granulozyten, was schließlich in einer Stabilisierung der Leukozyten-Ansammlung um die Verletzung endet⁶⁷.

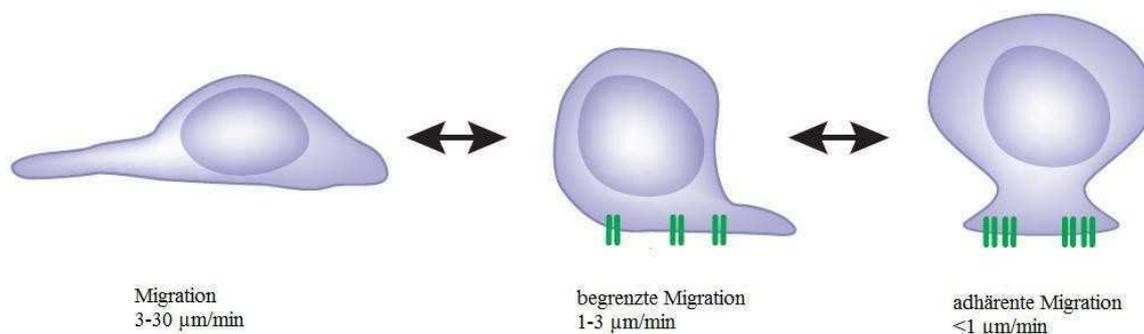


Abbildung 7: Migrationsmuster myeloider Zellen

Migrationsmuster und Geschwindigkeitsprofile von Leukozyten; modifiziert nach Friedl et al.³²

Leukozyten weisen unterschiedliche interstitielle Bewegungsmuster auf zwischen denen sich ein Gleichgewicht einstellt (siehe Abbildung 7). Zellen, die sich frei durch das Interstitium bewegen weisen eine hohe Geschwindigkeit auf (3-30 $\mu\text{m}/\text{min}$), dabei sind keine Integrine auf der Zelloberfläche aktiviert und sie haben keinen Kontakt zu anderen Zellen. Nähert sie sich einer anderen Zelle, werden sie langsamer (1-3 $\mu\text{m}/\text{min}$). Sobald sie über Integrine fest in Wechselwirkung mit einer anderen Zelle treten, zeigen sie kaum noch Bewegung (<1 $\mu\text{m}/\text{min}$). Zwischen diesen drei Stufen können, abhängig von der graduellen Chemokinkonzentration, auch Zwischenstufen angenommen werden³².

Die interstitielle Migration ist nicht nur von löslichen Gradienten abhängig, sondern auch von der Präsentationsform der Chemokine. So können auch immobilisierte Chemokine die Leukozytenmigration beeinflussen. Diese Art der adhäsiven Migration wird Haptokinese genannt wenn die Migration ungerichtet ist bzw. Haptotaxis, wenn die Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten statischer Liganden wandern, die auf den Zellen oder der extrazellulären Matrix immobilisiert sind³². Nicht-adhäsionsbedingte Bewegung kann durch lösliche Chemokine verursacht werden. Falls ein Gleichgewicht zwischen verschiedenen Chemokinsignalen besteht führt dies zur Chemokinese (zufällige Migration). Liegt ein Chemokingradient vor kommt es zur Chemotaxis (gerichtete Migration)⁸¹.

Ebenso ist die Leukozytenmigration abhängig vom Gewebe. Es gibt bestimmte Bereiche, in denen sich die Zellen frei bewegen können. Es wird vermutet, dass entlang von Blutgefäßen, Basalmembranen und unter Epithelien bestimmte Pfade bestehen, in denen Leukozyten frei beweglich sind und schnell migrieren können. Abseits dieser Pfade soll die Migration verlangsamt sein³¹.

Leukozyten haben die Fähigkeit auf verschiedene Chemokingradienten zu reagieren, abhängig von der Rezeptor-Ausstattung auf ihrer Zelloberfläche. Aus *in vitro* Experimenten wurde das Konzept abgeleitet, dass Leukozyten sequentiell auf Chemokingradienten reagieren können. Erreicht eine Zelle die erste Chemokin-Quelle und übersteigt dessen Konzentration anschließend das Sättigungs-Level des Rezeptors, so kommt es im weiteren Verlauf zu einer Desorientierung und schließlich zu einer Neuorientierung auf eine neue Quelle. Auf diese Weise reagieren Leukozyten Schritt für Schritt auf komplexe chemotaktische Felder und navigieren so zu ihrem eigentlichen Ziel, z.B. dem Infektionsherd oder der Nekrosezone²⁹.

6 Modelle der sterilen Inflammation

Um die zellulären Ereignisse bei steriler Inflammation *in vivo* an der Maus zu untersuchen, stehen das Cremastermodell nach Baez⁶ und das Ohrmodell nach Ng et al.⁶⁷ und Roediger et al.⁷³ zur Auswahl. Beide Modelle erlauben die Darstellung der Mikrozirkulation *in vivo* mittels der 2-Photonen Mikroskopie.

Khandoga et al. beschreiben eine Methode, um mittels des Cremastermodells *in vivo* Leukozytenmigration in entzündetem Gewebe zu visualisieren und quantitativ zu analysieren⁴⁸. Dort wurde die Injektion chemotaktisch wirkender Substanzen angewandt um eine Inflammation zu induzieren und nachfolgend die Leukozytensubtypen-spezifische Migration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten analysiert.

Die zweite Variante zur Darstellung der Leukozytenmigration *in vivo* ist das Ohrmodell. Ng et al.⁶⁷ sowie Roediger et al.⁷³ etablierten ein Laser-Verletzungsmodell, beim dem das Verhalten von neutrophilen Granulozyten *in vivo* in der Haut der Maus untersucht wird. Dadurch wurde es ermöglicht die kinetischen und molekularen Mechanismen, die die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten an der Stelle der Gewebsverletzung regulieren, zu analysieren^{67,73}. Um den genauen Rahmen der Gewebsverletzung zu definieren, benutzten sie einen Laserstrahl, der mit hoher Energie für einen kleinen Zeitraum (2-5s) auf einen definierten Bereich gerichtet wird. Daraus resultiert ein exakt definierter Bereich mit Hitzeschaden^{73,66}, im Zuge dessen nekrotische Zellen eine sterile Inflammation induzieren.

Ng et al. benutzten die dorsale Fläche des Ohres, da es leicht zugänglich ist und von der Atmung der Maus weitestgehend unabhängig ist. Dadurch ist es möglich das Migrationsverhalten von Immunzellen auf der Ebene der Einzelzell-Migration sowie ihren interaktiven Charakter in Bezug auf ihr Umfeld *in vivo* zu visualisieren⁶⁶.

III Zielsetzung der Arbeit

Inflammation ist eine fundamentale Gewebereaktion, die durch eine Vielzahl von Zelltypen und Mediatoren gesteuert wird. Die bisherige Forschung ist dabei auf die intravaskulären Prozesse fokussiert, vor allem auf die Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen. Die Prozesse, die nach der Transmigration durch das Endothel stattfinden sind jedoch weitgehend unbekannt. Auch ist nicht geklärt, ob und wie mesenchymale Zellen, wie etwa Perizyten, zu Entzündungsreaktionen beitragen. Perizyten sind durch ihr ubiquitäres Vorkommen und ihre Lage um das Endothel prädestiniert dafür, Stimuli aus dem interstitiellen Raum zu detektieren und durch ihre Reaktion darauf ihren zellulären Kontext zu beeinflussen. Es ist jedoch unbekannt, ob Perizyten aktiv an Entzündungsprozessen teilnehmen und die interstitielle Migration myeloider Zellen beeinflussen.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es daher, die Rolle der Perizyten bei steriler Entzündungsreaktion zu untersuchen. Dies soll zuerst auf zellulärer und molekularer Ebene geschehen. Im Anschluss daran sollen die gewonnenen Ergebnisse *in vivo* am Mausmodell untersucht und verifiziert werden. Folgende Punkte werden dabei untersucht:

- Untersuchung der Expression von Rezeptoren für Inflammationsreize durch Perizyten

Zunächst soll *in vitro* untersucht werden, ob Perizyten über eine Rezeptoren-Ausstattung verfügen, die die Detektion inflammatorischer Stimuli wie DAMPs erlauben. Dabei sollen Perizyten in Zellkultur mit verschiedenen Entzündungs-Mediatoren stimuliert und anschließend die Expression verschiedener Rezeptoren mittels real-time PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

- Analyse der Reaktion von Perizyten auf inflammatorische Stimuli hinsichtlich der Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen.

Weiterhin soll *in vitro* geklärt werden, ob Perizyten basal oder nach Stimulation durch inflammatorische Stimuli Entzündungs-Mediatoren exprimieren und sezernieren können. Hierbei soll zunächst untersucht werden, ob Perizyten Adhäsionsmoleküle und Chemokine exprimieren und ob durch inflammatorische Stimuli (wie TNF- α) eine veränderte Expression dieser Faktoren zu beobachten ist. Dies geschieht mittels real-time-PCR und ELISA.

Ebenso soll murines Gewebe immunhistologisch und mittels Whole Mount Staining untersucht werden, um *ex vivo* die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen durch Perizyten zu analysieren. Dies soll mit Hilfe von Epifluoreszenz- und 2-Photonen Mikroskopie geschehen.

- Einfluss von Perizyten auf die Migration und Apoptose myeloider Leukozyten *in vitro*

Danach soll untersucht werden, ob Perizyten aufgrund der sezernierten Chemokine einen chemotaktischen Reiz auf die Migration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten ausüben und dadurch deren Migration beeinflussen. Dabei soll durch inhibierende Antikörper untersucht werden, welche Mediatoren hierfür entscheidend sind. Ebenso soll die anti-apoptotische und aktivierende Wirkung der Perizyten auf myeloide Zellen analysiert werden. Dies geschieht mittels Chemotaxis Assays, Apoptose Assays, Aktivierungs Assays und FACS-Analysen.

- Etablierung eines Modells für die intravitale Untersuchung der Interaktion myeloider Zellen mit Perizyten nach Induktion einer lokalen sterilen Inflammation mittels 2-Photonen Mikroskopie

Um *in vivo* die Interaktion myeloider Zellen mit Perizyten darstellen zu können, soll ein geeignetes Mausmodell für die intravitale Untersuchung mittels 2-Photonen Mikroskopie angewandt werden. Hierfür bietet sich das sogenannte Ohr-Modell an^{67,73}, welches die Darstellung der Mikrozirkulation ermöglicht. Dieses Modell soll für die neuartige Applikation zur Untersuchung der Migration myeloider Zellen nach lokaler steriler Inflammation im Ohr modifiziert und etabliert werden.

- Untersuchung der Interaktion von Perizyten mit myeloiden Zellen bei der interstitiellen Migration *in vivo*

Nachfolgend soll *in vivo* auf zellulärer Ebene die Reaktion von Perizyten auf inflammatorische Stimuli untersucht werden. Im Fokus steht dabei ebenso die Dynamik der Interaktion von Perizyten mit myeloiden Leukozyten. Dafür werden Knochenmarks-Chimären zwischen LysM-eGFP bzw. CX₃CR1-eGFP und NG2DsRed Mäusen erstellt, welche die Visualisierung der Interaktion von Perizyten mit neutrophilen Granulozyten oder Monozyten

ermöglichen. Die Entzündungsreaktion wird durch lokale fMLP- und TNF- α - Injektion sowie durch Laser-Verletzung induziert, um sowohl die gerichtete als auch die ungerichtete Migration analysieren zu können.

IV Material und Methoden

1 Tiere

1.1 Haltung und Zucht

Die, für die vorliegende Arbeit, benötigten Tiere wurden bei Charles River (Sulzfeld) zugekauft und anschließend im Tierstall weiter verpaart. Die Haltung der Mäuse erfolgt in der räumlich abgetrennten Tierhaltung in Gruppenhaltung von bis zu 6 Tieren in Makrolonkäfigen des Typs III (erhöhte Ausfertigung, Tecniplast, Hohenpeißenberg). Die Zucht erfolgt durch polygame Verpaarung, bei dem ein bis zwei Weibchen mit einem Männchen in einem Käfig gehalten werden. Trächtige Weibchen werden kurz vor der Geburt von der Gruppe getrennt und der Nachwuchs mit 4 Wochen abgesetzt.

Bei den Käfigen handelt es sich um individuell ventilierte Käfige (IVC), welche mit HEPA-gefilterter konditionierter Raumluft versorgt werden und 50 bis 70 Luftwechsel pro Stunde aufweisen. Dadurch wird eine sehr gute hygienische Abschirmung der Tiere erzielt. Die Käfige entsprechen der Mindestanforderung an die Grundfläche für ausgewachsene Tiere über 20 g von 100 cm² je Tier. Die Tiere werden auf entkeimtem und entstaubtem Weichholzgranulat (LIGNOCEL® BK 8-15, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg) gehalten. Die Einstreu wird einmal wöchentlich gewechselt. Wasser und Futter (#1320 Ratte/Maus Halungsdiät, Altromin, Lage) steht den Tieren ad libitum zur Verfügung, ebenso bekommen sie ein Haus aus rotem Plastik (Mouse House, Tecniplast, Hohenpeißenberg) als Rückzugsmöglichkeit. Die Raumtemperatur liegt zwischen 20 und 25° C, bei einer optimalen Luftfeuchte von 45 bis 65 %. Ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h mit einer Lichtintensität von 50 bis 100 Lux wird eingehalten³⁶.

Im Zuge der Generierung von sogenannten Knochenmarks-Chimären bzw. nach einer Bestrahlung bekommen die Tiere saures Wasser (pH 3,1) mit Antibiotikum Cotrimoxazol (144 mg / 300 ml saurem Wasser, Ratiopharm, Ulm) über einen Zeitraum von 2 Wochen.

Das vorliegende Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG. in der Fassung vom 18.05.2006) genehmigt.

Diese Arbeit verwendet die Maus als Versuchstier sowohl für die *in vivo* Versuche, als auch deren Gewebe für histologische Untersuchungen. Entscheidend für die Wahl der Maus als Versuchstier ist die Verfügbarkeit der benötigten transgenen Stämme, anhand derer die Mechanismen der Inflammation erforscht werden können. Ebenso sind schnelle Generationszeiten, meist problemlose Aufzucht und die geringe Größe der Maus für ein problemloses Handling und intravitalmikroskopische Untersuchungen von Vorteil.

1.2 Tierstämme

Folgende Mäusestämme werden verwendet:

- NG2DsRed
- LysM-eGFP
- CX₃CR1-eGFP

Ausgehend von diesen Mausstämmen werden weiterhin die benötigten Knochenmarks-Chimären aus den Empfängertieren (NG2DsRed) und den Spendertieren (LysM-eGFP bzw. CX₃CR1-eGFP) durch Bestrahlung und Knochenmarkstransplantation erstellt.

Um die Rolle der Perizyten bei steriler Inflammation beurteilen zu können, benötigt man NG2DsRed-LysMeGFP Chimären. Bei diesen Tieren exprimieren die NG2 positiven Zellen DsRed, neutrophile Granulozyten sind mit dem grün-fluoreszierenden Protein GFP markiert (gelabelt)^{98,26}. Um die Rolle der Monozyten untersuchen zu können, benutzt man NG2DsRed-CX₃CR1eGFP Chimären. Die Perizyten fluoreszieren in rot und die Monozyten sind in grün sichtbar⁴⁶.

1.2.1 NG2DsRed

Die NG2DsRed-Mäuse werden bei Charles River Laboratories (Sulzfeld) zugekauft und anschließend im Tierstall weiter verpaart. Es handelt sich dabei um Cspg4-DsRed.T1. Um diese Maus zu generieren, wurde die BAC Modifizierungstechnik nach Heintz und Kollegen verwendet^{38,97}. In NG2DsRedBAC transgenen Mäusen wird DsRed speziell in NG2 positiven (NG2⁺) Zellen im ganzen postnatalen ZNS exprimiert. NG2⁺ Zellen können *in vitro* zu Oligodendrozyten oder Astrozyten differenzieren. Zudem wird NG2 von Perizyten im ZNS

und peripheren Gewebe exprimiert, sodass mittels des rot fluoreszierenden Proteins DsRed dieser Zelltyp auch im Ohr der Maus visualisiert werden kann⁹⁸.

1.2.2 LysM-eGFP

Um ein System zu etablieren, das die Differenzierung und Untersuchung von multipotenten Vorläuferzellen mit der Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht, wurden myelomonozytäre Zellen *in vivo* mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) markiert. Dies wird durch das Knock-In des Gens für das grün fluoreszierende Protein GFP (enhanced GFP) in den murinen Lysozym M (lysM)-Locus erreicht. Blut- und Knochenmarksuntersuchungen ergaben, dass in diesen Tieren spezifisch myelomonozytäre Zellen fluoreszieren, vor allem reife neutrophile Granulozyten und wenige Monozyten. Die höchste Fluoreszenzintensität wird bei reifen neutrophilen Granulozyten beschrieben, gefolgt von deren Vorläuferzellen und von Monozyten. Die Tiere weisen normale Fertilität und Vitalität auf²⁶. Für die Versuche werden heterozygote Tiere verwendet.

1.2.3 CX₃CR1-eGFP

Der transmembranöse-Rezeptor CX₃CR1 ist ein spezifischer Rezeptor für das neu entdeckte Chemokin Fraktalkine (FKN, Neurotactin). Dieses wird auf aktivierten Endothelzellen und Neuronen exprimiert und definiert Fraktalkine als ein potenzielles Ziel für therapeutische Intervention bei entzündlichen Erkrankungen.

Um die physiologischen Funktionen der Fraktalkine-Interaktion zu untersuchen, wurde eine Mauslinie generiert, bei der das CX₃CR1-Gen durch ein grün fluoreszierendes Protein (GFP)-Reporter-Gen ersetzt wurde. Dieser Ansatz ermöglicht es bei heterozygoten Tieren die CX₃CR1 Expression auf Monozyten, Unterarten der natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen zu erhalten⁴⁶. Dadurch kann *in vivo* die Migration von Zellen untersucht werden, die diesen Rezeptor exprimieren. Für die Versuche werden heterozygote Tiere verwendet.

1.3 Erstellung von Chimären

Um sowohl Perizyten als auch Monozyten bzw. neutrophile Granulozyten *in vivo* mittels 2-Photonen Mikroskopie untersuchen zu können, werden Knochenmark-Chimären erstellt. Dabei dienen NG2DsRed Tiere als Empfänger- und LysM-eGFP und CX₃CR1-eGFP Mäuse als Spendertiere.

Hierzu isoliert man das Knochenmark des Spendertieres und führt es einem zuvor zweimal bestrahlten Empfängertier über Schwanzveneninjektion zu. Nach acht Wochen können die erstellten Chimären für den Versuch verwendet werden.

1.3.1 Bestrahlung

Um die Empfängertiere für die Knochenmarkstransplantation vorzubereiten und ihr eigenes Knochenmark abzutöten, müssen die Mäuse zunächst zweimal bestrahlt werden. Hierzu werden je ein bis zwei Mäuse in ein steriles Becherglas gesetzt und das Glas anschließend mit autoklaviertem Filterpapier (Tecniplast, Hohenpeißenberg) verschlossen. Zum Transport zur Bestrahlungseinheit (Bestrahlungsanlage OB29-BA, Buchler, Braunschweig) werden die Gläser in einem Transportkäfig (Tecniplast, Hohenpeißenberg) untergebracht. Das Glas mit den Mäusen wird in die Vorrichtung der Caesium-Bestrahlungsquelle gestellt und mit 6,5 Gray bestrahlt. Am nächsten Tag wiederholt man die Bestrahlung. Direkt am Tag der zweiten Bestrahlung wird dem Empfängertier das Knochenmark der Spendermaus über Schwanzveneninjektion (siehe IV 1.3.3) appliziert.

1.3.2 Präparation von Knochenmark

Zuerst wird der benötigte Puffer aus PBS + 5% FBS (Fetal Bovine Serum, Invitrogen, Carlsbad, USA) + 2 mmol EDTA (Ethylendiamintetraacetat, Sigma-Aldrich, Steinheim) vorbereitet und erwärmt. Die Spendermaus wird mit Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Deieich) und Sauerstoff narkotisiert und anschließend durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Die Oberfläche der Maus wird mit 70% igem Ethanol (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn) desinfiziert, die Haut an den Füßen herum mit einem Skalpell (Pfm Medical AG, Köln) eingeschnitten und abgezogen. Beine und Arme werden im Hüft- bzw. am Schultergelenk abgesetzt und die Muskulatur mit dem Skalpell vollständig vom Knochen entfernt. Die gesäuberten Knochen werden ohne Muskulatur- oder Hautreste in eine

Zellkulturschale (Cellstar Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen) gelegt, die mit 10 ml des vorher hergestellten und erwärmten Puffers befüllt ist. Die nun folgende Präparation der Knochenmarkszellen wird an der Sterilbank (Typ HS12, Heraeus, Hanau) ausgeführt.

Auf ein 50 ml Falcontube (50 ml Polypropylen Conical Tube, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) wird ein Sieb (Cell Strainer, 40 µm Nylon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) mit 40 µm Maschenabstand aufgelegt. Die Epiphysen der Knochen werden in der Zellkulturschale mit Hilfe eines Skalpell vorsichtig abgetrennt und der Knochen wird mit dem Puffer und einer Spritze (B. Braun, Melsungen) mit Kanüle (26G, BD Microlance, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) in den Filter gespült bis er frei von Knochenmark ist. Lange Knochen werden in der Diaphyse durchtrennt und beide Hälften einzeln gespült.

Das Falconröhrchen wird nun mit dem Puffer auf 30 ml aufgefüllt und danach mit 612x g bei 4° C für 5 min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau). Der Überstand wird mittels Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH + CO KG, Wertheim) abgesaugt und das Pellet in 2,5 ml 8% Ammoniumchlorid-Lösung zur Erythrozytenlyse (1,5 M NH₄Cl + 0,1 M KHCO₃ + 10 mM EDTA, alle Sigma-Aldrich, Steinheim) resuspendiert und bei 4° C für 4 min inkubiert. Anschließend wird mit Puffer auf 30 ml aufgefüllt und erneut mit 612x g bei 4° C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in 2 ml RPMI-Medium (Biochrom AG, Berlin) resuspendiert. Die Zellen werden mittels der Neubauer-Zählkammer gezählt (Mittelwert aus 16 Feldern der 4 Außenfelder x 10.000= Zellzahl pro ml) Die Zellsuspension wird nun auf Eis gelagert bis die bestrahlten Mäuse zur Injektion bereit sind. Vor Transplantation der Zellen werden diese erneut bei 612x g bei 4° C für 5 min zentrifugiert und in 2 - 4 ml PBS resuspendiert. Je Maus wird die benötigte Zellzahl (mindestens 5 Mio Zellen) in 200–300 µl über die Schwanzvene mittels eines Katheters (Katheterschlauch Portex®, Polythene Tubing, 0,28mm ID, Smiths Medical, St. Paul, USA) injiziert.

1.3.3 Schwanzveneninjektion

Um Knochenmarkszellen intravenös applizieren zu können, wird die Schwanzveneninjektion verwendet. Die Maus wird mittels einer Fixations-Vorrichtung (Injektionskäfig, Typ Broome HAR-52-04, Föhr Medical Instruments GmbH) fixiert, wobei der Schwanz frei zugänglich bleibt. Nun staut man das Blut proximal an der Schwanzbasis, indem man ihn zwischen Zeige- und Mittelfinger zusammendrückt. Mit Hilfe von warmem Wasser werden die Gefäße

geweitet. Vor dem Einstich desinfiziert man mit Octeniderm® (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt). Zur Injektion sind vor allem die zwei lateralen Venen geeignet. Mit Hilfe einer gebogenen Pinzette und eines Katheters mit aufgesetzter Kanüle (30G, BD Microlance, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) kann man nun die entsprechende Substanz applizieren.

Der Katheter wird zuvor aus einem kurzen Stück Katheterschlauch und zwei Kanülen (30G) hergestellt. Von einer Kanüle wird der Konus entfernt und nur die Nadel in das vordere Ende des Schlauches gesteckt, in das hintere Ende steckt man die zweite Kanüle. Darauf wird eine 1ml Spritze (B. Braun, Melsungen) aufgesetzt, in die das zu transplantierende Knochenmark zuvor eingebracht wurde.

2 Zellkultur

2.1 Humane plazentare Perizyten

Die *in vitro* verwendeten Zellen werden vom Hersteller PromoCell (Heidelberg) bezogen und von diesem aus unveränderter menschlicher Plazenta gewonnen. Sie werden in Pericyte Growth Medium kultiviert, welches ebenso von PromoCell bezogen wird.

2.2 Immunfluoreszenz-Färbung

2.2.1 Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung

Um Zellen auf spezifische Marker zu untersuchen, werden sie mit immunhistologischen Methoden gefärbt. In eine 24-Loch Platte (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) wird je Well ein steriles Deckgläschen eingelegt. 5×10^3 bis 1×10^4 Zellen in 500 μ l Medium werden je Well eingebracht und bis zur Konfluenz im Inkubator (37° C, 5 % CO₂; IG150 Jouan, Unterhaching) inkubiert.

Das Medium wird mit einer Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH + CO KG, Wertheim) abgesaugt und die Wells dreimal vorsichtig mit je 1 ml warmen PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 500 μ l 4 % igem Paraformaldehyd (Thermo Scientific, Rockford, USA) für 20 min im Inkubator (37° C) fixiert. Wiederum wird dreimal mit PBS gewaschen, die Zellen mit 0,25% igem Triton (Triton X-100, Sigma-Aldrich, Steinheim) für 5-15 min bei Raumtemperatur (RT) permeabilisiert und erneut mit PBS gewaschen. Das

Blocken der unspezifischen Bindungen erfolgt durch Zugabe von 500 µl 3% igem bovinen Serumalbumin (BSA, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) für 5 min bei RT und anschließendem Absaugen ohne Waschschrift. Der primäre Antikörper wird in 3%igem BSA in PBS gelöst, aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird der Überstand abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Erneut wird BSA für 5 min aufgebracht und verworfen. Der sekundäre Antikörper wird ebenfalls in 3%igem BSA gelöst, aufgebracht und 60 min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wäscht man dreimal mit PBS und einmal mit BSA. Zur Färbung der Zellkerne wird Hoechst 33342 (1µg/ml, Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet und für 10 min inkubiert. Auf dreimaliges Waschen mit PBS folgt ein Waschgang mit destilliertem Wasser.

Das Deckgläschen mit den Zellen wird anschließend aus dem Well entnommen und umgedreht auf einen Objektträger gegeben, auf den zuvor 1 Tropfen Mounting Medium (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) aufgebracht wurde. Nach einer Stunde Trocknungszeit können die Zellen mittels des Fluoreszenzmikroskops (DMRB, Leica, Bensheim) bzw. mittels des konfokalen Mikroskopes (Zeiss, LSM 510 META) untersucht werden. Die verwendeten Primär- sowie Sekundärantikörper sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Antikörper zur Immunfluoreszenz

Antigen	Primärantikörper	Klon	Hersteller	Sekundärer Antikörper	Hersteller
NG2	rabbit anti-NG2	-	Chemicon	goat anti-rabbit Alexa 594	Invitrogen
α-sma	mouse anti-α smooth muscle actin	1A4	Sigma	goat anti-mouse Alexa 488	Invitrogen
Calponin	rabbit anti-Calponin 3 (H-55)	-	Santa Cruz Biotechnology	goat anti-rabbit Alexa 594	Invitrogen
MIF	rabbit anti-MIF	-	Sigma	donkey anti-rabbit Alexa 488	Invitrogen
CD74	mouse anti-CD74	5- 329	eBioscience	donkey anti-mouse Alexa 594	Invitrogen
-	-	-	-	Rhodamin Phalloidin	Invitrogen

Verwendete Antikörper sowie Sekundärantikörper mit jeweiligem Klon und Hersteller

2.2.2 Konfokale Mikroskopie

2.2.2.1 Aufbau des konfokalen Mikroskopes

Die konfokale Mikroskopie ist eine Form der Fluoreszenzmikroskopie, welche die exakte Darstellung von Geweben oder Zellen ermöglicht. Diese können im herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop nur unscharf dargestellt werden, da die Fluoreszenz nicht nur in der Fokusebene, sondern auch ober- und unterhalb dieser Ebene angeregt wird. Bei der konfokalen Mikroskopie wird durch die Einführung einer Lochblende diese störende Hintergrundinformation deutlich reduziert, was zu einer erhöhten optischen Auflösung sowie einem stärkeren Bildkontrast führt. Hierdurch wird nur die Fokusebene des Objektivs scharf abgebildet. Ebenso wird vor dem Detektor eine Lochblende installiert, welche Streulicht und Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene abhält. Über den Durchmesser der konfokalen Lochblende kann man das Volumen des untersuchten Gewebes regulieren. Außerdem können optische Schnitte angefertigt werden, um dreidimensionale Informationen über die Zellen zu erhalten. Konfokale Systeme verwenden zur Anregung der Fluoreszenz Laser unterschiedlicher Wellenlänge. Das Präparat wird Punkt für Punkt mit dem Laserlicht abgetastet, die Fluoreszenz mittels Sensoren (Photomultiplier) aufgenommen und daraus das Fluoreszenzbild zusammengesetzt⁷⁴.

2.2.2.2 Färbung für die konfokale Mikroskopie

Färbungen für die konfokale Mikroskopie laufen nach oben aufgeführtem Schema ab (siehe VI 2.2.1). Zusätzlich zur Färbung auf MIF wird ein sekundärer Antikörper (Alexa Fluor 488 Phalloidin) benutzt, der das Aktinskelett der Zellen anfärbt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Antikörper für die konfokale Mikroskopie

Antigen	Primärantikörper	Klon	Hersteller	Sekundärer Antikörper	Hersteller
MIF	rabbit anti-MIF	-	Sigma	donkey anti-rabbit Alexa 594	Invitrogen
-	-	-	-	Alexa Fluor 488 Phalloidin	Invitrogen

Verwendete Antikörper sowie Sekundärantikörper mit jeweiligem Klon und Hersteller

2.2.2.3 Auswertung mittels des konfokalen Mikroskopes

In den angefertigten Versuchen wird ein konfokales Mikroskop (Zeiss, LSM 510 META) verwendet, welches auf einem angeschlossenen Mikroskop (Axiovert 200 MOT) basiert. Die Aufnahmen werden unter Benutzung eines 63x-fachen Objektivs mit Verwendung von Plan-Apochromat-Linsen (numerische Apertur 1.4, Ölimmersion) erreicht. Die anschließende Bilddarstellung erfolgt durch eine Software (Zeiss LSM Browser).

2.3 Stimulation von Perizyten

Um den Einfluss verschiedener Entzündungsmediatoren auf Perizyten untersuchen zu können, werden *in vitro* kultivierte humane plazentare Perizyten verwendet und mit unterschiedlichen Entzündungs-Mediatoren inkubiert. Die Perizyten sezernieren daraufhin Chemokine, die man im Medium-Überstand quantifizieren kann. Ebenso werden die stimulierten Perizyten direkt für real-time PCR Untersuchungen herangezogen, dazu werden sie als Pellet verwendet.

2.3.1 Pelletierung stimulierter Perizyten

Hierfür verwendet man 6-Loch Platten, in denen man Perizyten bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wird entfernt und 2 ml frisches Medium mit den entsprechenden Entzündungs-Mediatoren in unterschiedlichen Konzentrationen dazu gegeben und inkubiert (siehe Tabelle 3). Nach der Inkubation von 6 bzw. 24 Stunden verwirft man den Überstand und wäscht die Zellen dreimal mit je 2 ml PBS. Zur Ablösung der Zellen benutzt man 500 µl Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim) je Well und inkubiert für 2-5 min im Inkubator. Die Reaktion wird mit 1 ml Vollmedium gestoppt und anschließend die Zellsuspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgt eine Zentrifugation bei 272x g für 5 min. Der Überstand wird entfernt und das Zellpellet bei -80°C gelagert.

Tabelle 3: Verwendete Entzündungsmediatoren zur Herstellung von Pellets stimulierter Perizyten

Entzündungs-Mediator	Konzentration	Inkubationsdauer	Hersteller
fMLP	100 μ M	6h / 24h	Sigma-Aldrich
LPS	100 ng/ml	6h / 24h	Sigma-Aldrich
TNF- α	100 ng/ml	6h / 24h	Sigma-Aldrich
ATP	100 ng/ml	6h / 24h	Peptotech Inc.
Nekrot. Zelllysat	1:1 Verdünnung	6h / 24h	aus Perizyten gewonnen

Verwendete Entzündungsmediatoren mit jeweiliger Konzentration, Inkubationsdauer und Hersteller

2.3.2 Herstellung konditionierter Medien und Gewinnung von Mediumüberstand für ELISA

Die konditionierten Medien werden dazu benutzt, die im nachfolgenden beschriebenen Chemotaxis Assays durchzuführen. Auf gleiche Weise erfolgt auch die Gewinnung von Mediumüberstand für ELISA-Untersuchungen.

Ebenso wie bei der Herstellung der Pellets, inkubiert man konfluente 6-Loch Platten mit diversen Entzündungs-Mediators. Dazu sät man in einer 6-Loch Platte je Well 1×10^4 Zellen in 2 ml Medium aus und inkubiert sie bis zur Konfluenz. Das Medium wird verworfen und 2 ml neues Medium mit entsprechender Konzentration des jeweiligen Entzündungs-Mediators (siehe Tabelle 4) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 6 bzw. 24 Stunden saugt man den Überstand ab und wäscht jedes Well dreimal mit 2 ml PBS. Anschließend wird je Well 2 ml Medium dazugegeben und für 24 h inkubiert. Dieses Medium wird anschließend als konditioniertes Medium und für die ELISA-Untersuchungen verwendet.

Man nimmt das Medium mit einer Pipette (Eppendorf, Hamburg) ab und gibt es in ein 15 ml Falcontube. Es folgt eine Zentrifugation bei 272x g für 5 min und anschließend eine Filtration des Überstandes mittels Sterilfilter (Pall Corporation, Ann Arbor, USA). Das konditionierte Medium wird auf kleine Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Tabelle 4: Verwendete Entzündungsmediatoren zur Herstellung von konditionierten Medien und zur Gewinnung von Mediumüberstand für ELISA

Entzündungs-Mediator	Konzentration	Inkubationsdauer	Hersteller
fMLP	100 μ M	6h / 24h	Sigma-Aldrich
LPS	100 ng/ml	6h / 24h	Sigma-Aldrich
TNF- α	50 ng/ml	6h / 24h	Sigma-Aldrich
ATP	1 mM	6h / 24h	Peptotech Inc.
Nekrot. Zelllysate	1:1 Verdünnung	6h / 24h	Aus Perizyten gewonnen

Verwendete Entzündungsmediatoren mit jeweiliger Konzentration, Inkubationsdauer und Hersteller

2.3.3 Gewinnung von nekrotischem Zelllysate

Bei der oben beschriebenen Stimulation von Perizyten kommt auch nekrotisches Zelllysate zum Einsatz. Darin sind diverse Faktoren gelöst, die Zellen bei Nekrose freisetzen. Hergestellt wird er aus 1×10^6 Zellen/ml, die man in ein Reaktionsgefäß gibt und bei 58°C für 20 min im Wasserbad erhitzt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 10.000 g für 5 min. Der klare Überstand wird sterilfiltriert, bei -80°C gelagert und kann anschließend zur Herstellung stimulierter Pellets, konditionierter Medien oder für den bei IV 2.5 beschriebenen Chemotaxis Assay verwendet werden.

2.4 Analyse mittels real-time PCR

Mit Hilfe der PCR kann man in den stimulierten Perizyten diverse Chemokine und das Expressionslevel unterschiedlicher Rezeptoren nachweisen. Man isoliert zunächst die RNA der Zellen und schreibt sie anschließend in cDNA um. Daraufhin kann man diese mittels real-time PCR analysieren und quantifizieren. Hierzu verwendet man die Pellets der stimulierten Perizyten, die wie unter IV 3.2.1. beschrieben hergestellt wurden

2.4.1 Isolation von RNA aus Zellpellets

Zuerst wird die RNA aus dem Zellpellet der stimulierten Perizyten isoliert. Dazu verwendet man das RNeasy Kit von Qiagen (Hilden). Alle nachfolgend verwendeten Reagenzien

entstammen diesem Kit. Der Mastermix aus 1:100 Mercaptoethanol in RLT Puffer wird zunächst unter dem Abzug angesetzt. Je Probe gibt man 350 µl des Mastermixes hinzu und vermischt diesen gründlich. Dann gibt man 350 µl 70% iges Ethanol (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn) hinzu. Die Probe wird in eine Säule überführt und für 15 s bei 8000 rcf zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen, 350 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 15 s bei 8000 rcf zentrifugiert. Der Durchfluss wird wiederum verworfen, 100 µl DNase I (1:10 DNase Stocklösung in RDD Puffer) auf den Filter der Säule geben und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wird 350µl RW1 Puffer hinzugegeben und wieder für 15 s bei 8000 rcf zentrifugiert. Der Durchfluss wird erneut verworfen, es werden 500 µl RPE Puffer hinzugegeben und für 15 s bei 8000 rcf zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und es werden nochmals 500 µl RPE Puffer hinzugegeben. Diesmal wird für 2 min bei 8000 g zentrifugiert. Daraufhin wird für 1 min trocken zentrifugiert. Die Säule wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 40 µl RNase-freies Wasser wird direkt auf den Filter der Säule geben und 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wird ein letztes Mal bei 8000 rcf für 1 min zentrifugiert. Die RNA im Eluat kann nun bei -80°C gelagert werden.

2.4.2 cDNA Synthese

Um die RNA in cDNA umzuschreiben wird ebenso ein Kit verwendet, das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Zunächst stellt man einen Mastermix her. Hierzu benötigt man je Probe 2 µl 10x RT Puffer, 0,8 µl 25x dNTP Mix, 2 µl 10x RT Random Primers, 1 µl MultiScribe reverse Transkriptase, 1 µl RNase Inhibitor und 3,2µl Nuclease freies H₂O. Für die Negativkontrolle verwendet man Wasser anstatt der Reversen Transkriptase. In einem 250µl Reaktionsgefäß gibt man nun zu je 10 µl des Mastermixes 10µl RNA hinzu. Nachdem man die Reaktionsgefäße kurz zentrifugiert hat, gibt man sie in den Thermo Cycler (Applied Biosystems, Veriti 96 well Thermal Cycler, Carlsbad, USA) mit folgendem Protokoll: 10 min bei 25°C, 2x 60 min. bei 37°C, 5 min. bei 85°C, unendlich bei 4°C. Die cDNA kann nun bei -20°C gelagert werden.

2.4.3 real-time PCR

Die entsprechenden Primer und die, wie oben beschriebenen, cDNA-Proben werden aufgetaut und auf Eis gelagert. Zur PCR verwendet man ein Kit von Qiagen für Sybr® Green basierte real-time RT-PCR (QuantiTect® Primer Assay, Quiagen, Hilden). Alle Komponenten, die für die PCR verwendet werden, entstammen diesem Kit.

Hierbei wurden rtPCRs mit den in Tabelle 5 aufgeführten Primern angefertigt. Als Referenzwert wurde jeweils eine rtPCR für β -Aktin mituntersucht, welche von allen Zellen exprimiert wird.

Tabelle 5: Verwendete Primer für real-time PCR

Primer	Nummer
β – Aktin	QT 01680476
CCL 2	QT 00212730
CCL3	QT 01008063
CD74	QT 00059402
CXCL 1	QT 00199752
CXCL5	QT 00203686
CX ₃ CL ₁	QT 00098490
CXCR2	QT 00000518
CXCR4	QT 02311841
FPR1	QT 00199745
FPR2	QT 00204295
FPR3	QT 00054677
G-CSF	QT 00001414
ICAM – 1	QT 0074900
IL – 6	QT 00083720
IL – 8	QT 00000722
MIF	QT 00219233
NLRP3	QT 01666343
TLR2	QT 00236131
TLR4	QT 01670123
TLR9	QT 00015183
TNFR1	QT 00216993
VCAM-1	QT 00018347

Zu Beginn wird je Probe und je Primer der Mastermix aus 2 μ l Primer, 10 μ l Sybr® Green und 7 μ l Nuclease-freiem Wassern erstellt. In eine 96 well rt-PCR Platte, die auf einem Eisblock gelagert wird, wird zuerst je 19 μ l Primermix vorgelegt und dann 1 μ l cDNA zugegeben. Die Platte wird mit einer Folie verschlossen und kurz zentrifugiert. Anschließend

wird die Platte in den Real-Time Cycler (Perkin Elmer, ABI Prism™ 7700 Sequence Detector, Waltham, USA) gestellt und das Programm gestartet. Das Zeitprotokoll lautet wie folgt: 50°C 2 min, 95°C 10 min und eine 40-fache Wiederholung des Zyklus aus 95°C 15 s und 60°C 1 min. Die Analyse der Expressionswerte erfolgt nach der Methode von Livak und Schmittgen, welche die Analyse der relativen Veränderungen in der Genexpression von quantitativen real-time PCR-Experimente ermöglicht⁵⁴.

2.5 Chemotaxis Assay

Durch Transwell Assays soll untersucht werden, ob die von Perizyten sezernierten Faktoren chemotaktisch wirken. Bei den Versuchen werden die zuvor hergestellten konditionierten Medien genutzt (siehe IV 2.3.2), welche die, von stimulierten Perizyten sezernierten, Chemokine enthalten.

2.5.1 Isolation von neutrophilen Granulozyten

Um neutrophile Granulozyten für die Chemotaxis Assays zu gewinnen, werden diese aus humanem Blut isoliert. Da die in Kultur gehaltenen Perizyten humanen Ursprungs sind, werden für die nachfolgend beschriebenen Chemotaxis Assays Zellen aus humanem Blut benötigt.

Für die Gewinnung von neutrophilen Granulozyten benötigt man eine 20 ml Spritze (B.Braun, Melsungen), in die zuvor 50 µl Heparin (Rotexmedica GmbH, Trittau) eingebracht werden. Man nimmt einem gesunden Probanden 20 ml Blut ab und verteilt dieses Blut auf drei 15 ml Falconröhrchen. Eines der Röhrchen wird bei 1589x g für 5 min zentrifugiert und das Plasma auf die anderen zwei Röhrchen verteilt. Die Innenwand wird mit Hilfe eines Zellstoffes vom Blut gereinigt und die Luftblasen entfernt. Die Röhrchen werden verschlossen und 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. In dieser Zeit senkt sich das Blut. In der Zwischenzeit schichtet man einen Percoll-Gradienten (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden) aus 4 ml 74% igem Percoll und 3 ml 55% iges Percoll.

Dann gibt man 2 ml des Plasmas aus den Röhrchen vorsichtig auf den Percoll-Gradienten mittels einer Pasteurpipette (Sarstedt, Nümbrecht). Nach einer Zentrifugation bei 600x g für 20 min (ohne Bremse) gewinnt man die Interphase und überführt sie in ein 50 ml Falconröhrchen mit 40 ml vorgelegtem PBS. Erneut wird bei 272x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgekippt und das Pellet in 1 ml HBSS (Hanks' Balanced Salt

solution, Sigma-Aldrich, Steinheim) + 10% FBS gelöst. Es folgt eine Zellzählung mittels der Neubauer-Zählkammer.

2.5.2 Isolation von Monozyten

Ebenso isoliert man auch Monozyten aus menschlichem Blut, um nachfolgend damit Chemotaxis Assays anzufertigen.

Für die Isolation von Monozyten benötigt man sieben CPDA (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin)-Röhrchen (Sarstedt Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht), in die ca. 60 ml Blut eines Probanden abgenommen werden. Das Blut wird mit einer Pasteurpipette vorsichtig auf zwei 50 ml Falconröhrchen aufgeteilt, in die je 25 ml Ficoll (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden) vorgelegt wurden. Nach einer Zentrifugation bei 853x g für 17 min bei 20° C ohne Bremse wird die Intermediärschicht mit einer Pasteurpipette gewonnen und in ein neues 50 ml Falconröhrchen überführt. Dieses füllt man mit VLE (very low endotoxin) RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, Berlin) auf 40 ml auf und zentrifugiert es bei 483x g für 8 min. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert und erneut bei 483x g für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum verworfen und das Pellet in 2,5 ml Medium gelöst. In fünf Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht) wird jeweils 9 ml Medium vorgelegt und 500 µl des gelösten Pellets zugegeben.

Diese Petrischalen werden nun bei 37° C und 5% CO₂ für vier bis sechs Stunden inkubiert, danach wird der Überstand mit einer 5 ml Pipette abgenommen, die Schale damit kräftig überspült und verworfen. Anschließend erfolgt zweimaliges Waschen der Schale mit je 5 ml PBS und einmal mit 5 ml 4°C kaltem PBS, dem 0,05% EDTA zugesetzt sind. Der Überstand wird jeweils verworfen. Anschließend gibt man 5 ml kaltes VLE RPMI 1640 Medium in die Petrischalen und lagert diese 20 min auf Eis.

Dann überspült man mit dem Medium den Plattenboden kräftig, gibt die Zellsuspension in ein 50 ml Falcontube und zentrifugiert dieses bei 483x g für 8 min. Das Pellet wird in 500 µl Medium resuspendiert, die Zellsuspension in eine Petrischale mit 9 ml vorgelegtem Medium gegeben und über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag nimmt man das Medium auf und gibt es in ein 50 ml Falcontube. Die Petrischale wird erneut zweimal mit 5 ml PBS und einmal mit 5ml PBS + 0,05% EDTA kräftig gewaschen und alle Überstände in dem Falconröhrchen gesammelt. Wiederum gibt man 5-7 ml kaltes Medium zu und stellt die Platte für 20 min auf Eis. Das Medium wird ebenso in das Falconröhrchen gegeben und dieses wird dann bei 483x g für 8 min

zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 500-1000 μl Medium resuspendiert. Nun zählt man die Zellen mittels der Neubauer-Zählkammer.

2.5.3 *In vitro* Chemotaxis Assays

Nach dem, wie oben beschrieben, neutrophile Granulozyten bzw. Monozyten aus menschlichem Blut isoliert wurden, können diese für Chemotaxis Assay verwendet werden.

2.5.3.1 Neutrophile Granulozyten

Für den Chemotaxis Assay benutzt man eine 24-Loch Platte von Falcon. Jeweils 500 μl des konditionierten Mediums werden je Well eingebracht. Anschließend gibt man je nach Versuch in dieses vorgelegte Medium noch einen inhibierenden Antikörper hinzu. Je Well wird ein Transwellchamber (BD Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) eingesetzt und die entsprechende Zellzahl von $1,2$ bis $1,5 \times 10^6$ neutrophilen Granulozyten in ca. 100 μl HBSS-Medium werden oben in die Kammer eingebracht. Die 24-Loch Platte wird mit einem Deckel verschlossen und für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Hierauf werden die Transwells entnommen, das Medium in der unteren Kammer wird mit einer Pipette abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden nun mittels der Neubauer-Zählkammer jeweils 3-mal ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

2.5.3.2 Monozyten

Der Chemotaxis Assay erfolgt ebenfalls in einer 24-Loch Platte. Jeweils 500 μl des zuvor konditionierten Mediums werden je Well eingebracht. Nun gibt man je nach Versuchsansatz erneut noch einen Antikörper in das vorgelegte Medium hinzu. Je Well wird ein Transwell eingesetzt und die entsprechende Zellzahl von $1,7-1,8 \times 10^5$ Monozyten werden oben in die Kammer eingebracht. Die 24-Loch Platte wird verschlossen und für 4 h inkubiert. Während der Inkubationszeit wandern die Zellen aus der oberen Kammer nach unten durch die Transwellmembran.

Nach vier Stunden nimmt man die 24-Loch Platte aus dem Inkubator und entnimmt die Transwells. Das Medium wird mit einer Pipette abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Jedes Well wird mit 200 μl PBS und danach mit 200 μl PBS + 0,05% EDTA

gewaschen und der Überstand jeweils in das Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen werden nun mittels der Neubauer-Zählkammer jeweils 3-mal ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

2.5.4 Inhibitorischer Chemotaxis Assay

Um herauszufinden, ob die Chemotaxis aufgrund einzelner Chemokine zustande kommt, fertigt man Chemotaxis Assays an, bei denen zuvor inhibierende Antikörper für eine Stunde in das konditionierte Medium zugesetzt wurden. Hierbei wurde anti-IL8 und der MIF-Antagonist ISO-1 bei den neutrophilen Granulozyten und anti-CCL2 und ISO-1 bei den Monozyten verwendet (siehe Tabelle 6). Nach der Inkubationszeit fertigt man einen, wie unter IV 2.5.3 beschriebenen, Chemotaxis Assay an und zählt im Anschluss die migrierten Zellen aus.

Tabelle 6: Inhibitorische Antikörper und Antagonisten für Chemotaxis Assays

Antikörper	Konzentration	Inkubationsdauer	Hersteller
anti – CCL2	10 µg/ml	1 h	R&D Systems
anti – IL8	1 µg/ml	1 h	R&D Systems
ISO – 1	36 µg/ml	1 h	Merck

Verwendete inhibitorische Antikörper mit jeweiliger Konzentration, Inkubationsdauer und Hersteller

2.6. Apoptose Assay und Aktivierungs Assay

Um zu analysieren, welchen Einfluss die konditionierten Medien und damit die von Perizyten sezernierten Stoffe auf die Überlebensdauer und die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten besitzen, werden ein Apoptose Assay sowie ein Aktivierungsassay durchgeführt, welcher mittels Durchflußzytometrie analysiert werden.

2.6.1 Prinzip der Durchflußzytometrie

Anhand der FACS-Analyse (Fluoreszenz-amplifizierte Zellsortierung) werden Zellen nach ihrer Größe bzw. ihrer Granularität analysiert. Ebenso erhält man Aussagen über den Anteil der gefärbten bzw. ungefärbten Zellen im Vergleich zur Gesamtpopulation der untersuchten Zellen. In flüssigem Medium gelöst werden sie durch einen Lichtstrahl geschickt, der sie nach

Parametern wie Größe, Granularität, Zelltyp und Fluoreszenzintensität analysiert. Zwei grundlegende Faktoren, nach denen die Zellen im FACS analysiert werden, sind der Forward scatter (FSC) und der Sideward scatter (SSC), der SSC ist dabei proportional zur Granularität der Zellen, der FSC proportional zur Zellgröße³³.

Zur zusätzlichen Charakterisierung verwendet man fluoreszenzmarkierende Techniken, um daraus Informationen über die gewünschte Zellpopulation zu erhalten. Die Farbstoffe, die vor allem zur Differenzierung der Zellen mittels FACS verwendet werden, sind FITC und PE (Phycoerythrin). Diese beiden Fluorochrome werden häufig in Kombination verwendet, da beide mit dem, vom Argon-Laser ausgestrahlten, Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt werden können ohne dass sich ihre Emissionsmaxima überlappen. (FITC: 530 nm; PE: 570 nm).

Um eine quantitative Analyse zu erhalten, werden Histogramme oder Zytogramme (Dotplots) erstellt, die die Anzahl der fluoreszierenden Zellen erfassen. Beide Darstellungen können anschließend in einem weiteren Programm (FlowJo, Tree Star, Inc., Ashland, USA) analysiert und ausgewertet werden.

2.6.2 Durchführung des Apoptose Assays

Zur Detektion apoptotischer und nekrotischer Zellen werden die beiden Farbstoffe 7-Amino-Actinomycin (7AAD) und PE Annexin V verwendet. PE Annexin V positive Zellen befinden sich in der frühen Phase der Apoptose, 7AAD positive Zellen in der späten Phase bzw. sind bereits tote Zellen. Die doppelt positiven Zellen kennzeichnen demnach die gesamten avitalen Zellen. Annexin V bindet dabei an Phosphatidylserin, welches bei intakten Zellen fast ausschließlich auf der zytosolischen Seite der Membran lokalisiert ist, bei Zelluntergang auch in der nach aussen gerichteten Membran auftritt. Durch die Fluoreszenzmarkierung mit dem Farbstoff Phycoerythrin (PE) kann man die frühe Phase der Apoptose mittels FACS-Analyse darstellen. Bei 7AAD handelt es sich um einen DNA-Farbstoff, welcher nur bindet wenn die Integrität der Zellmembran verloren geht.

In dieser Arbeit wurde dazu ein Apoptosis Detection Kit der Firma BD Pharmingen (Franklin Lakes, USA) verwendet. Dieses enthält sowohl die Farbstoffe (7AAD und PE Annexin V) als auch den benötigten Puffer (Binding Buffer). Diese Färbung wird sowohl für Monozyten als auch für neutrophile Granulozyten durchgeführt, die man zuvor 24 Stunden mit konditioniertem Medium inkubiert hat.

Die neutrophilen Granulozyten bzw. Monozyten werden zunächst (wie unter IV 2.5.1 bzw. IV 2.5.2 beschrieben) isoliert. Anschließend gibt man ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen (neutrophile Granulozyten) bzw. $1,5 \times 10^5$ Zellen (Monozyten) in 500 μ l konditioniertes Medium, bzw. in frischem Basalmedium als Kontrolle. Man inkubiert für 24 h, entnimmt anschließend die Zellen und überführt sie in Reaktionsgefäße.

Bei 4000 rcf zentrifugiert man die Zellen zunächst und wäscht das Pellet zweimal mit 500 μ l 4°C kaltem PBS. Danach resuspendiert man das Pellet in 100 μ l Binding Buffer und gibt jeweils 2 μ l mouse IgG1 (Invitrogen, Carlsbad, USA) hinzu zum Blocken der unspezifischen Bindungen. Dies stellt man für 10 min in den Kühlschrank. Aus der Kontrollprobe entnimmt man nun für die Einzelfärbungen für PE Annexin V, 7AAD und für die ungefärbte Probe jeweils 40 μ l und füllt sie auf 100 μ l mit Binding Buffer auf. Zu den Einzelfärbungen gibt man nun 5 μ l des jeweiligen Farbstoffes, bei den Proben jeweils 5 μ l beider Farbstoffe. Nach einer Inkubation von 15 min im Dunklen, zentrifugiert man erneut mit 400 rcf für 3 min. Das Pellet wird in 400 μ l Binding Buffer gelöst und kann in die Röhren (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) zur FACS-Analyse überführt werden. Anhand dieser Untersuchungen kann man anschließend analysieren, wie viele Zellen apoptotisch bzw. nekrotisch sind. Verwendet wird das FACS-Gerät BD FACScalibur (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)

Anschließend erfolgt die Analyse mit dem Software Programm BD CellQuest (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA), und die Auswertung mit Hilfe des Softwareprogramms FlowJo.

2.6.3 Durchführung des Aktivierungs Assays

Zur Untersuchung der Aktivierung neutrophiler Granulozyten wurden ebenso FACS-Analysen angefertigt. Hierbei wurden isolierte humane neutrophile Granulozyten in 500 μ l konditionierten Medien bzw. frischem Basalmedium als Kontrolle inkubiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit, werden die Zellen entnommen und in Reaktionsgefäße überführt. Wie beim Apoptose Assay, werden sie zentrifugiert, gewaschen, unspezifische Bindungen geblockt und mit einem fluoreszenzmakiertem Antikörper (CD11b) inkubiert. Dieser Antikörper ist ein Marker für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Über die Auswertung mittels des FACS-Gerätes (BD FACScalibur, BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) und der dazu passenden Software können die prozentualen Anteile aktivierter neutrophiler Granulozyten ermittelt werden.

2.7 ELISA

2.7.1 Prinzip des ELISA

Um die Menge der sezernierten Chemokine quantifizieren zu können, werden diese mittels ELISA (Enzym-Linked-Immunoabsorbant-Assay) aus den Mediumüberständen stimulierter Perizyten (siehe VI 2.3.3) nachgewiesen. Das Prinzip dieses antikörperbasierten Nachweissystems beruht auf einer enzymatischen Farbumsetzung. Der erste Antikörper ist dabei bereits an die Multiwell-Platte gebunden. Das zu untersuchende Material wird darauf gegeben und anschließend ein enzymgekoppelter zweiter Antikörper hinzugegeben, der spezifisch an das zuvor gebundene Antigen bindet. Ein, dem Enzym entsprechendes Substrat, wird zugegeben, welches umgesetzt wird und in einem Farbumschlag resultiert. Mittels eines Photometers (Tecan Safire, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) kann die optische Extinktion gemessen werden. Die Intensität der Farbe steigt dabei mit der Konzentration des entstandenen Produktes aus dem umgesetzten Substrat. Daraus kann man die Konzentration des Antigens in der Probe errechnen.

2.7.2 Durchführung des ELISA

Hierbei werden die Mediums-Überstände von stimulierten Perizyten auf ihren quantitativen Gehalt der Chemokine MIF, CCL2, CXCL1 und IL-8 untersucht. Dazu werden kommerziell verfügbare Kits (Quantikine) von R&D Systems (Minneapolis, USA) verwendet.

Zunächst werden die im Kit enthaltenen benötigten Reagenzien angemischt. Aus der Stock Solution wird eine Verdünnungsreihe angefertigt, welche der Erstellung der Eichkurve dient. Nach Vorbereitung aller Reagenzien wird der ELISA angefertigt werden.

Dazu gibt man in jedes Well 100 µl Assay Diluent, darauf 50 µl der Probe bzw. des jeweiligen Standards und stellt diese Proben für eine Stunde auf einen Rüttler (Type: Reax 3, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach). Der Überstand wird entfernt und die Platte viermal mit je 400 µl Waschpuffer gewaschen. Danach gibt man in jedes Well 100 µl Conjugate und inkubiert erneut für eine Stunde auf dem Rüttler. Der Überstand wird wiederum entfernt und die Platte viermal gewaschen. Daraufhin gibt man 200 µl Substrate Solution je Well hinzu, inkubiert für 30 bis 60 min im Dunkeln und stoppt die Reaktion mit 50 µl Stop Solution. Nun kann man die Platte innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm mittels des Photometers auslesen.

3 Histologische Verfahren

3.1 Immunhistologie

Auch *in vitro* kann man die Eigenschaften der Fluoreszenz nutzen, indem man das Prinzip der Immunhistologie anwendet. Hierbei werden spezifische Strukturen gefärbt und durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper sichtbar gemacht.

3.1.1 Gefrierschnitte

3.1.1.1 Organ-Entnahme für Immunhistologie

Für die Organentnahme wird zunächst die Maus in tiefer Isofluran-Narkose durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet und anschließend die Ohren abgetrennt. In unserem Versuchsaufbau werden diese in 24-Loch Platten unter Verwendung von Medium für Cryoschnitte (Tissue Tek® OCT Compound, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande) bei -80°C eingefroren und gelagert.

3.1.1.2 Anfertigung der Gefrierschnitte

Zur Herstellung histologischer Präparate werden dünne Schnitte (3-5 µm) der entnommenen Ohren angefertigt. Dieses wird mittels Tissue Tek auf einem Stempel fixiert und unter Verwendung spezieller Klingen (C35, pfm Medizin AG, Köln) mit einem Cryotom (Cryotom CM 1850, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht (Super Frost® Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig). Bei -20°C können die Schnitte bis zur Färbung gelagert werden.

3.1.2 Immunfluoreszenz

3.1.2.1 Prinzip der immunhistologischen Färbungen

Antigene auf der Zelloberfläche, im Zytoplasma oder im Zellkern werden hierbei sichtbar gemacht. Zuerst wird ein unmarkierter Primäantikörper und anschließend ein fluoreszenzmarkierter Sekundäantikörper aufgebracht. Anschließend werden die Schnitte

mittels des Fluoreszenzmikroskopes (DMRB, Leica, Bensheim) betrachtet, einer Kamera (AxioCam, Zeiss, Göttingen) abfotografiert und mit der Software AxioVision 4.6 (Zeiss, Göttingen) ausgewertet.

3.1.2.2 Durchführung der Immunhistologie

Man entnimmt die Gefrierschnitte aus dem Gefrierschrank und legt sie in die Färbekammer. Die Schnitte werden mit einem Fettstift (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) umrandet, dann folgt die Fixierung mit jeweils 100 µl 4% igem Paraformaldehyd (PFA) für 4 min bei Raumtemperatur (RT). Mit PBS + 1% Tween wäscht man die Objektträger anschließend für 5 min bei RT in einer Küvette. Im Anschluss daran blockt man mit 100 µl 0,3% BSA + 1:50 bzw. 1:100 Fc-Block (anti-mouse CD 16/32, eBioscience, San Diego, USA) für 20 min die unspezifischen Bindungen. Danach wird der Objektträger (OT) auf Zellstoff abgeklopft und 100 µl des primären Antikörper, in BSA gelöst, in der gewünschten Konzentration aufpipettiert. Bei jeder Färbung verwendet man ebenfalls einen OT für die Isotypkontrolle und einen OT für die Negativkontrolle (PBS). Nach einer Inkubation im Dunkeln für 1 Stunde wäscht man die Objektträger dreimal mit PBS + 1% Tween in einer Küvette.

Nun gibt man den sekundären Antikörper (1:200) auf alle Objektträger, einschließlich der Isotypen- und Negativkontrolle. Erneut inkubiert man im Dunkeln für 1 Stunde, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS + 1% Tween. Zum Schluss erfolgt die Kernfärbung mittels DAPI (1:3000, 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim) für 10 s. Nachdem wiederum mit PBS + 1% Tween gewaschen wurde, wird je Objektträger ein Tropfen Mounting Medium und anschließend ein Deckgläschen (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs- GmbH, Braunschweig) aufgebracht. Nach einer kurzen Trocknungsphase kann man die Schnitte unter dem Fluoreszenzmiskroskop betrachten und auswerten.

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper, sowie deren Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 7: Antikörper für Immunhistologie

Antigen	Primärantikörper	Klon	Hersteller	Sekundärantikörper	Hersteller
MIF	rabbit anti-mouse MIF	-	abcam	donkey anti-rabbit Alexa 488	Invitrogen
CCL2	hamster anti-mouse CCL2	-	R&D Systems	goat anti-armenian hamster FITC	Abcam
CXCL5	rabbit anti-mouse CXCL5	-	AbD Serotec	donkey anti-rabbit Alexa488	Invitrogen

Verwendete Primär- und Sekundärantikörper sowie Hersteller für immunhistologische Färbungen.

3.2 Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Mittels eines Fluoreszenzmikroskopes werden die gefärbten Schnitte auf Ihre Fluoreszenz untersucht. Dazu werden die Präparate digital am Mikroskop (Leica DMRB, Leica, Bensheim) betrachtet, mit einer Kamera fotografiert (AxioCam, Zeiss, Göttingen) und mittels der Software AxioVision 4.6 (Zeiss, Göttingen) ausgewertet.

4 *In vivo* 2-Photonen Mikroskopie

4.1 Aufbau des 2-Photonen Mikroskops

Das 2-Photonen Mikroskop ist eine Weiterentwicklung der gebräuchlichen Fluoreszenzmikroskope und stellt eine optische Schnittbildtechnik dar. Bei dieser macht man sich den physikalischen Effekt der Fluoreszenz zu eigen. Werden bestimmte Moleküle, so genannte Fluorochrome, mit Licht definierter Wellenlänge bestrahlt, so senden sie Licht aus. Diese Fluorochrome verfügen über Elektronen, die mit Licht definierter Wellenlänge in einen angeregten Zustand gehoben werden können und anschließend wieder in ihren Grundzustand zurückfallen. Die dabei frei werdende Energie strahlen sie in Form von längerwelligem Licht wieder ab (Stoke's Shift), welches als Fluoreszenz sichtbar wird.

Durch spezielle Filter kann man dieses Licht sichtbar machen. Zur Anregung in den gebräuchlichen Fluoreszenzmikroskopen werden meist Hochdruckmetalllampen mit Quecksilber oder Xenon verwendet, die für eine hohe Lichtintensität sorgen⁷⁴.

Beim 2-Photonen Mikroskop wird das Elektron des Fluorochroms nicht durch die Energie eines einzelnen Photons angeregt, sondern durch gleichzeitige Absorption zweier Photonen. Daher können beide Photonen energieärmer sein. Mittels gepulster Infrarot-Laser wird eine

Energiedichte im Fokus erzeugt, die zur Fluoreszenz führt⁷⁴. Außerhalb der Fokusebene ist die Energiedichte zu gering um Fluoreszenz zu erzeugen. Daher kann ganz definiert Fluoreszenz in einem Bereich erzeugt werden, ohne dass diese durch Streustrahlung überlagert wird, wie das z.B. bei der konfokalen Mikroskopie der Fall ist.

Als Laserquelle benutzt man ultraschnelle Titanium-Saphir-Laser (Ti:S-Laser) mit 70 bis 100 MHz, die sich bei einer Wellenlänge von 690 bis 1080 nm betreiben lassen. Die Zeitspanne zwischen zwei Pulsen liegt bei 10 ns, was der Fluoreszenzlebensdauer der Fluorochrome entspricht⁷⁴. Um eine hohe Eindringtiefe, bei gleichzeitiger hoher Qualität zu bekommen, benutzt man bei der 2-Photonen Mikroskopie Wasserimmersions-Objektive. Diese ermöglichen eine hohe Eindringtiefe bei gleichzeitig hoher Numerische Apertur und hoher Auflösung.

Das 2-Photonen Mikroskop besitzt gegenüber den herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen entscheidende Vorteile, was die 3D-Visualisierung von Prozessen *in vivo* ermöglicht. Zum einen weist es eine hohe Eindringtiefe des Anregungslichtes von bis zu 200 μm auf, vereinzelt sind auch 1000 μm möglich. Die zielgenaue nicht lineare Anregung minimiert Streustrahlung weitgehend. Durch die Anregung mittels der zwei energieärmeren Photonen sinkt die Fototoxizität für das Gewebe, wodurch Langzeit *in vivo* Aufnahmen ermöglicht werden²².

Ein weiterer Vorteil des 2-Photonen Mikroskops ist die Erzeugung des Second Harmonic Signals, mit dem geordnete Strukturproteine wie Kollagenfasern dargestellt werden^{61,16}. Dieses Signal entsteht durch Streuung im Gewebe und erlaubt eine gute Orientierung. Da es die halbe Wellenlänge der anregenden Wellenlänge besitzt, ist das Second Harmonic Signal in der vorliegenden Arbeit bei einer Wellenlänge von circa 400 nm zu sehen, was blauem Licht entspricht (siehe Abbildung 8).

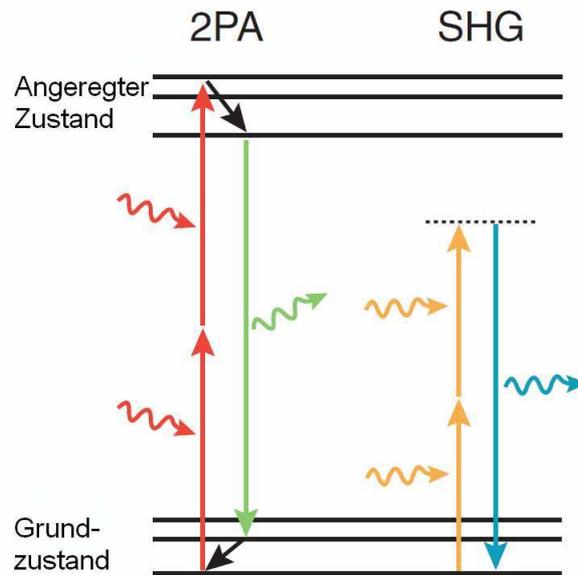


Abbildung 8: Energieniveaus von Elektronen

Darstellung der Energieniveaus von Elektronen (Jablonski-Diagramm), links sichtbar die Anregung durch 2-Photonen (2PA), rechts dargestellt die Effekte, die beim Second Harmonic Signal auftreten; modifiziert nach Helmchen et al.³⁹

In dem verwendeten Versuchsaufbau wird die, zuvor auf der Vorrichtung (Stage) befestigte, Maus mit dem eingespannten Ohr unter das Objektiv gelegt, die beheizbare Stage an das Heizsystem angeschlossen und der Rand der Stage mit Silikon abgedichtet. Zum Schluss wird isotone Natriumchloridlösung (Delta Pharma GmbH, Pfullingen) eingefüllt. Nun benutzt man die Software (Inspector, LaVison Biotech, Bielefeld) des 2-Photonen Mikroskops um den Scanbereich, die Eindringtiefe, die Laserpower sowie Frequenz und Wellenlänge einzustellen.

4.2 Auswertung mittels des 2-Photonen Mikroskopes

In den angefertigten Versuchen wird das TrimScope Mikroskop der Firma LaVision Biotech (Bielefeld) verwendet, unter Benutzung eines Mikroskops von Olympus (Tokio, Japan) mit einem 20-fach Wasserimmersions-Objektiv (numerische Apertur 0.95, Olympus). Die Erzeugung der Bilder geschieht mit einer Anregungs-Wellenlänge von 900 nm in einem Bildausschnitt von bis zu 500 x 500 μm mit 512 x 512 Pixel. Die Aufnahmen entstehen durch horizontale Schnittbilder durch das Gewebe, die durch den Laser (MaiTai, Spectra-Physics, Santa Clara, USA) angefertigt werden. Man erhält daraus so genannte Stapel (z-stacks) an Bilder, die anschließend zu einem dreidimensionalen Schnittbild mittels der Software von

Volocity (Improvision/Perkin-Elmer, Waltham, USA) rekonstruiert werden können (siehe Abbildung 9). Den Umfang des Gewebes wählt man zuvor aus, ebenso den Abstand zwischen den einzelnen Schnitten ($3\mu\text{m}$). Damit man über einen längeren Zeitraum Aufnahmen anfertigen kann, lässt man nach jedem Stapel eine Wartezeit (wait time) von 30 Sekunden verstreichen. Im Anschluss wird erneut ein Stapel Schnittbilder angefertigt. Das automatische bzw. manuelle Verfolgen (Tracking) der Zellen erfolgt ebenfalls mittels Volocity, die anschließende Visualisierung der Pfade (Tracks) mit ImageJ Software .

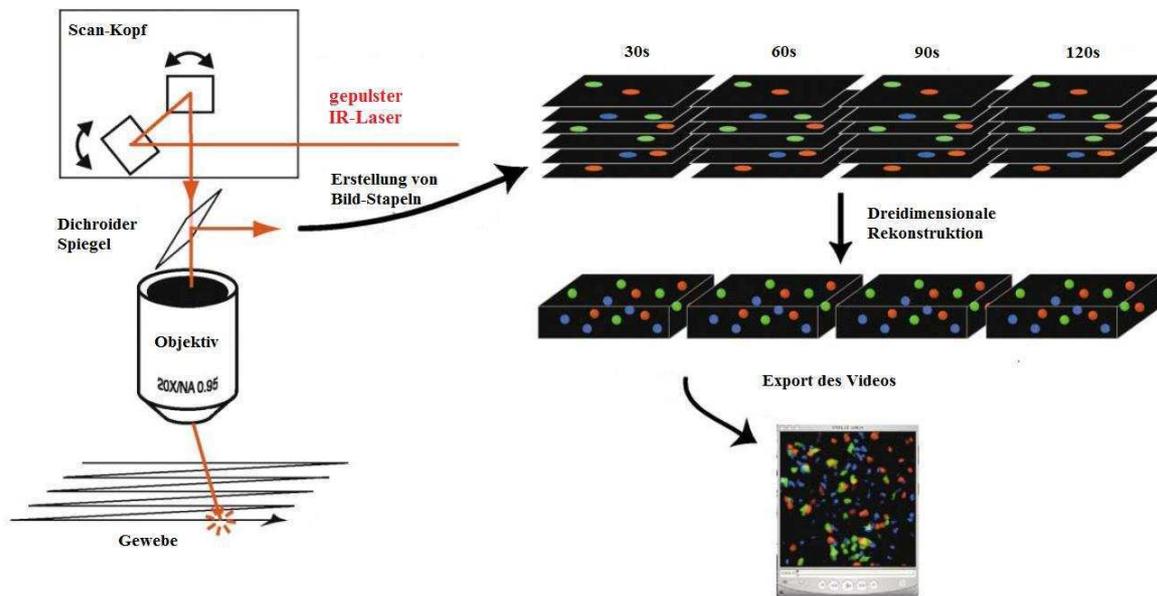


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Erzeugung dreidimensionaler Videos

Schematische Darstellung der Erstellung von Schnittbildern mittels 2-Photonen-Mikroskopie und anschließender dreidimensionaler Rekonstruktion; modifiziert nach Sumen et al.⁸⁹

Im Anschluß an die Anfertigung der Rohdaten werden mittels des Volocity-Softwareprogrammes 3-dimensionale Rekonstruktionen des Gewebes erstellt.

4.3 Anästhesie

4.3.1 Durchführung der Narkose

Bei der Durchführung der Intravitalmikroskopie und des, in der vorliegenden Arbeit angewandten, Ohr-Modells benötigt man eine Narkose, die zum einen über mehrere Stunden aufrechterhalten werden kann und zum anderen freien Zugang zum Ohr der Maus ermöglicht. Hierfür eignet sich eine Injektionsnarkose am besten.

Die Narkoseeinleitung erfolgt durch eine Inhalationsnarkose aus einem Gemisch aus Sauerstoff und dem Inhalationsanästhetikum Isofluran. Dieses wird über einen Verdampfer (Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen, eingerichtet von Völker Vet, Völker GmbH, Kaltenkirchen) in eine Körperkammer geleitet, in der die Maus zuvor eingebracht wurde.

Isofluran ist ein leicht-flüchtiges Gas, mit einer sehr schnellen An- und Abflutung, welches kaum zu kardiovaskulären oder respiratorischen Beeinträchtigungen führt. Bei der Maus benötigt man zur Einleitung ein 2-3 % iges Isofluran-Sauerstoff-Gemisches, zum Erhalt der Narkose 1-2 %⁵⁰.

Anschließend appliziert man intraperitoneal (i.p.) die Injektionsnarkose, welche zur Herbeiführung des chirurgischen Toleranzstadiums III führt.

Die Kriterien, die an eine Allgemeinanästhesie gestellt werden (Hypnose, Analgesie und Relaxation), können nicht durch ein einzelnes Anästhetikum erzielt werden. Deshalb behilft man sich einer bewährten Kombination aus drei verschiedenen Substanzen: Medetomidin, Midazolam und Fentanyl (siehe Tabelle 8). Dadurch kann zum einen eine deutliche Verringerung der Einzeldosis jedes Anästhetikums und zum anderen eine Minimierung der unerwünschten Nebenwirkung erreicht werden.

Medetomidin (Domitor®, Pfizer GmbH, Karlsruhe), ein α_2 -Adrenozeptoragonist, ist ein sedativ-hypnotisches Analgetikum. Es führt zu einer Konstriktion der Gefäßmuskulatur und somit zum Blutdruckanstieg. Midazolam (Midazolamratiopharm ®, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) zur Gruppe der Benzodiazepine gehörend, trägt vor allem zur Muskelrelaxation und zur Krampfhemmung bei. Die Analgesie wird durch das stark wirksame, synthetisch hergestellte, Opioid Fentanyl (Fentanyl-Curamed®, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) erreicht, welches circa 100-mal potenter als Morphin ist. Als Gemisch werden diese drei Substanzen wie folgt dosiert und, mit 0,9% NaCl verdünnt, intraperitoneal verabreicht:

Tabelle 8: Dosierungen der vollständig antagonisierbaren Narkose (VAA), nach Erhardt ⁵⁰

Injektionsanästhetika	Dosierung	Applikationsweise
Medetomidin	0,5 mg/kg	intraperitoneal
Midazolam	5,0 mg/kg	
Fentanyl	0,05 mg/kg	

Die chirurgische Toleranz tritt nach circa 10 bis 20 Minuten ein. Während dieser Zeit liegt die Maus in einer dunklen Box und der Eintritt der Narkose wird anhand des Flexorreflexes geprüft. Sobald dieser erloschen ist, kann man vom chirurgischen Toleranzstadium ausgehen. Der hier verwendete Versuchsaufbau erfordert eine Narkosedauer von bis zu sechs Stunden. Eine Kombinationsnarkose wie oben beschrieben führt zu einer Narkosedauer von 45 bis 60 Minuten. Der Vorteil der VAA-Narkose besteht in der Nachdosierbarkeit, d.h. dass bei Nachlassen der Narkosetiefe, welches unter anderem mittels des Flexorreflexes getestet wird, die halbe Dosis nachgegeben werden kann. Damit kann die Narkosedauer jeweils um ca. 45 min verlängert werden.

4.3.2 Narkosemanagement und –überwachung

Während der Narkose wird eine Wärmematte (ThermoLux-Wärmematte, Fa. Dehner) benutzt, die Atmung überprüft, sowie das Fehlen des Flexorreflexes regelmäßig kontrolliert. Gegebenenfalls wird Narkose nachinjiziert oder Sauerstoff über die Nasenkammer zugeführt. Zum Schutz der Hornhaut vor Austrocknung wird Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) aufgetragen.

4.4 Femoraliskatheter und Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen

Um der Maus wiederholt während eines Versuches Fluoreszenzfarbstoffe injizieren zu können wird ein Verweilkatheter verwendet. Da Fluoreszenzfarbstoffe eine relativ kurze Halbwertszeit von zwei bis drei Stunden besitzen, müssen sie während des Versuchs wiederholt appliziert werden, um eine gleich bleibende Qualität der Aufnahmen zu garantieren.

Die gesamte Operation wird unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss, Jena) ausgeführt und das OP-Feld wird mit einer Schwanenhalslampe (Schott Kaltlichtquelle KL200, Schwanenhals-Lichtleiter, Zeiss, Jena) ausgeleuchtet. Operiert wird mit sterilem mikrochirurgischem Instrumentarium (siehe Abbildung 10, Micro2000, Medicon, Tuttlingen).



Abbildung 10: Mikrochirurgisches Instrumentarium und benötigte Materialien zur Platzierung des Femoraliskatheter

Die Maus wird, wie unter IV 4.3.1 beschrieben, in Narkose gelegt, in Rückenlage auf einer Wärmematte (ThermoLux-Wärmematte, Fa. Dehner) fixiert, Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) aufgetragen und der linke Fuß seitlich mit Klebeband (Transpore™, 3M Health Care, Neuss) ausgebunden (siehe Abbildung 12). Die Oberschenkelinnenseite wird rasiert, enthaart (Plica® extra soft, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Bühl) und desinfiziert (Cutasept®F, Fa. Bode Chemie, Hamburg) (1, Abbildung 11). Es folgt ein kleiner Hautschnitt circa 2 cm proximal des Kniegelenks (2). Nun kann man Nerv, Arterie und Vene nebeneinander erkennen (3). Die in der Mitte liegende Arterie wird von den beiden ihr angrenzenden Strukturen, Nerv und Vene, vorsichtig auf der Länge von ungefähr einem Zentimeter mit einer Pinzette frei präpariert (4). Proximal und distal der separierten Stelle werden nun zwei kurze Fäden (Pearsalls Limited, Taunton, England) unter der Arterie durchgeführt, der distale Faden zugeknotet und beim proximalen Faden der Knoten vorgelegt (5,6). Mit einer Pinzette wird

ein stumpfes Trauma in die Arterie gesetzt, so dass ein Aneurysma (7) entsteht. Eine umgeknickte Nadel dient dazu ein kleines Loch in das Aneurysma der Arterie zu machen, in das anschließend der Polyethylen-Katheter (Katheterschlauch Portex®, Polythene Tubing, 0,28mm ID, Smiths Medical, Keene, USA) vorgeschoben werden kann (8). Zur Fixation des Katheters zieht man nun den proximalen Faden über dem Katheter zu (9). Mit dem überstehenden Faden des distalen Knotens wird durch einen Einfachknoten der Katheter erneut fixiert und die Durchgängigkeit mittels NaCl getestet. Die Haut wird darüber mit Einzelheften mit einem monofilen Faden (Prolene® Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Während der Operation wird das Gewebe mit isotoner Natriumchloridlösung befeuchtet. Durch den Katheter kann nun der Fluoreszenzfarbstoff appliziert werden.

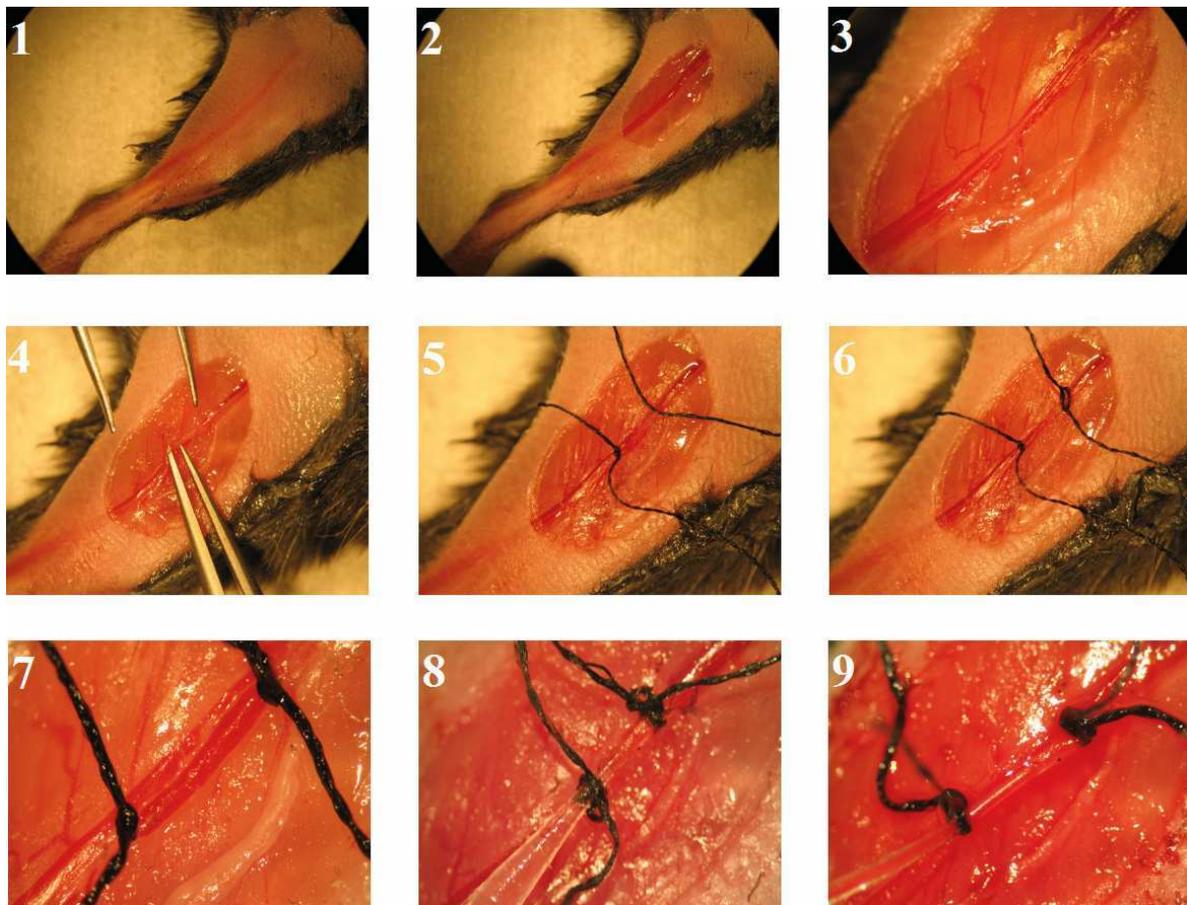


Abbildung 11 : Operationsschritte zur Platzierung des Femoraliskatheters

1) Enthaarung und Desinfektion der Oberschenkelinnenseite, 2) Hautschnitt proximal des Kniegelenks, 3) Freipräparation der Arteria femoralis von den ihr angrenzenden Strukturen, 4) Sicht auf die freipräparierte Arteria femoralis, 5) Vorlage der Fäden und Ligatur des distalen Fadens, 6) vorgelegter Knoten des proximalen Fadens, 7) gesetztes Aneurysma proximal des ligierten Fadens, 8) Platzierung des Katheters, 9) Ligatur des proximalen Fadens zur Fixation des Katheters in der Art. femoralis

Bei den *in vivo* Versuchen werden 20µg FITC-Dextran (Fluorescein-Isothiocyanat, 2 Mega-Dalton, Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet (siehe Abbildung 12). Bei FITC handelt es sich um ein Fluorochrom, welches ein Anregungsmaximum bei 495 nm und ein Emissionsmaximum bei 519 nm besitzt. Gekoppelt an Proteine oder andere Makromoleküle (Dextran, BSA) ermöglicht es die Darstellung der Blutgefäße in der Intravitalmikroskopie. FITC-Dextran ist allerdings nicht sehr fotostabil, daher muss man es circa alle zwei bis drei Stunden erneut i.v. applizieren¹.

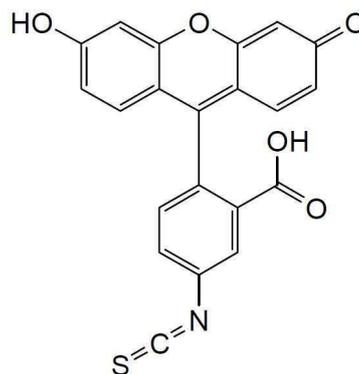


Abbildung 12: Strukturformel FITC-Dextran , modifiziert nach Data Sheet¹

4.5 Ohrmodell

Bei diesem Modell wird das Ohr verwendet um mittels des 2-Photonen Mikroskopes Aufnahmen der Mikrozirkulation *in vivo* anzufertigen. Das Ohr eignet sich besonders gut für diese Untersuchungen, da es leicht zugänglich ist und die Blutgefäße oberflächlich liegen. Ebenso werden die Aufnahmen nicht beeinflusst von Atembewegungen des Tieres. Etabliert wurde dieses Modell von Ng et al. und Roediger et al.^{73,67}.

Die Narkose der Maus erfolgt wie bereits erwähnt (IV 4.3.1). Die Maus wird in Rückenlage auf die Vorrichtung (Stage, siehe Abbildung 13) gelegt, mit Klebeband fixiert und Augensalbe auf die Augen aufgetragen. Den inneren, abgesenkten Rand des Ringes dichtet man mit Silikon (Baysilone-Paste, GE Bayer Silicones, Leverkusen) ab und legt anschließend das Ohr der Maus in Position. An fünf Stellen wird das Ohr plan und faltenfrei mittels umgeknickter Nadeln an dem inneren Silikonring der Stage fixiert. Nun dichtet man den kompletten Ring mit Silikon ab und befüllt die Stage mit 0,9% NaCl oder destilliertem Wasser. Anschließend wird die Stage unter das Mikroskop gelegt und an das Heizsystem angeschlossen um eine physiologische Temperatur des Tieres und des Ohres aufrecht zu erhalten.



Abbildung 13: Vorrichtung für das Ohrmodell

Vorrichtung (Stage) zur Fixation des Ohrs der narkotisierten Maus für die Untersuchung mittels des 2-Photonen Mikroskops (Ohrmodell); links benötigtes Silikon sowie Pinzetten

In den angefertigten Versuchen wird auf zwei Modelle der sterilen Inflammation zurückgegriffen. Dies ist zum einen die Injektion chemotaktisch wirkender Substanzen und zum anderen die Laser Verletzung.

4.5.1 Injektion chemotaktisch wirkender Substanzen

Bei dem ersten Modell handelt es sich um die lokale Applikation von chemotaktisch wirkenden Stoffen (TNF- α und fMLP). Unter Sichtkontrolle durch das Mikroskop appliziert man 30 μ l TNF- α (600ng, ImmunoTools, Friesoythe) bzw. 30 μ l fMLP (5mM, PeproTech, Rocky Hill, USA) an mehreren Stellen unter Verwendung einer 29G Kanüle (Micro-Fine, BD, Franklin Lakes, USA) in das Ohr.

Hierzu wurde bei den LysM-eGFP Chimären fMLP verwendet und bei den CX₃CR1-eGFP Chimären TNF- α . Diese Stoffe werden direkt in das Ohr appliziert um dort gezielt eine lokale Entzündungsreaktion auszulösen.

Beide Stoffe üben einen chemotaktischen Reiz auf Entzündungszellen aus. Kurze Zeit nachdem man die Substanz ins Ohr verabreicht hat, kann man die Extravasation und die interstitielle bzw. perivaskuläre Migration von Monozyten bzw. neutrophilen Granulozyten beobachten.

TNF- α und fMLP sind chemotaktisch wirkende Stoffe, die auch von nekrotischen Zellen bei steriler Inflammation produziert werden. Auf diese Weise kann man eine sterile Inflammation simulieren. Die Aufnahmen werden eine Stunde nach fMLP-Injektion bzw. vier Stunden nach TNF- α -Injektion angefertigt.

4.5.2 Laser Verletzung

Bei der zweiten Methode wird mittels des 2-Photonen Mikroskopes eine fokale Gewebsverletzung generiert, indem man den Laser für kurze Zeit auf einen definierten Bereich richtet. Mit einer hohen Laserpower und einer Wellenlänge von 800 nm richtet man für 2-5 Sekunden den Laser gezielt auf eine 40 x 40 μm große, zuvor definierte, Stelle im Gewebe. Dabei kommt es lokal zu einer Zerstörung des Gewebes und nachfolgender Nekrose der Zellen. Diese Technik wurde von Ng et al etabliert⁶⁷.

Die dabei geschädigten, nekrotischen oder apoptotischen Zellen sezernieren bestimmte Signalstoffe (DAMPs), ebenso wie es bei der sterilen Inflammation abläuft.

Knochenmark-Chimären aus NG2DsRed und LysM-eGFP-Mäusen werden verwendet, um die Migration von neutrophilen Granulozyten zu visualisieren, für die Analyse der Monozytenmigration werden Knochenmark-Chimären aus NG2DsRed und CX₃CR1-eGFP Mäusen verwendet.

Damit kann man über einen längeren Zeitraum die Migration der Entzündungszellen beobachten. Dabei beruht die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten auf dem Stimulus, der von den nekrotischen Zellen ausgeht.

5 Whole Mount Staining

Beim Whole Mount Staining werden extrazelluläre Strukturen oder Zelloberflächen von ganzen Gewebestücken wie Muskulatur, Knorpel oder Gefäßen mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt und können danach mit Hilfe des 2-Photonen Mikroskopes analysiert werden. Diese Technik ermöglicht eine dreidimensionale Darstellung von Zellen und Proteinen direkt im Gewebe.

5.1 Durchführung des Whole Mount Stainings

Das entsprechende Gewebestück wird zunächst mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 30 min fixiert und dann in PBS und 1%igem BSA dreimal für 5 min bei 4°C bei 500rpm auf einem Rüttler (TC-100, Kisker, Steinfurt) gewaschen. Anschließend wird in einem dunklen Reaktionsgefäß 200 µl 1%iges BSA und 4 µl Fc-Block (anti-mouse CD 16/32) hinzugegeben, um unspezifische Bindungen zu blocken. Nachdem man es für 30 min bei 4°C in den Rüttler gestellt hat, gibt man die Probe in ein weiteres Reaktionsgefäß und pipettiert den primären Antikörper hinzu (siehe Tabelle 9). Dieses wird für 4 h bei 4°C inkubiert. Die Probe wird anschließend in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, zweimal für 15 min mit 300 µl PBS + 1% BSA gewaschen und bis zur Verwendung in PBS bei 4°C gelagert.

Tabelle 9: Antikörper für Whole Mount Staining

Antigen	Primärantikörper	Klon	Hersteller
CD31	rat anti-mouse CD 31 FITC-conjugated	MEC 13.3	BD
α-sma	mouse anti-α smooth muscle actin FITC conjugated	1A4	Sigma
ICAM-1	hamster anti-mouse ICAM-1 FITC-conjugated	3E2	BD

Verwendeten Antikörper für Whole Mount Staining, sowie Klon und Hersteller

5.2 Auswertung mittels 2-Photonen Mikroskopie

Die Analyse der gefärbten Gewebestücke erfolgt mit dem 2-Photonen Mikroskop. Dazu legt man sie auf einen Objektträger und bedeckt sie mit einem Deckgläschen. Ein Tropfen Wasser wird aufgebracht, in den das Objektiv eintaucht. Mit Hilfe des Softwareprogrammes (Inspector) werden horizontale Schnittbilder des Gewebes angefertigt. Anschließend wird mit der Software (Volocity) aus den Schnittbildern eine dreidimensionale Rekonstruktion angefertigt, um die Aufnahmen auszuwerten.

6 Versuchsplanung und Durchführung

In vitro Versuche:

Chemotaxis Assay:

Anzahl Chemotaxis Assays mit neutrophilen Granulozyten je konditioniertes Medium	mind. n=5
Anzahl Chemotaxis Assays mit Monozyten je konditioniertes Medium	mind. n=5

Inhibitorischer Chemotaxis Assay (anti-IL-8/ anti-CCL2/ ISO-1):

Anzahl inhibitorischer Chemotaxis Assays mit neutrophilen Granulozyten je Gruppe (anti-IL-8/ISO-1)	mind. n=5
Anzahl inhibitorischer Chemotaxis Assays mit Monozyten je Gruppe (anti-CCL2/ISO-1)	mind. n=5

PCR auf DAMP-Rezeptoren sowie MIF-Rezeptoren:

Anzahl rt-PCR der unstimulierten Kontrollgruppe	mind. n=3
Anzahl rt-PCR der stimulierten Gruppen	mind. n=3

PCR auf Zytokine, Chemokine und ICAM-1:

Anzahl rt-PCR der unstimulierten Kontrollgruppe	mind. n=3
Anzahl rt-PCR der stimulierten Gruppen	mind. n=3

ELISA für Chemokine:

Anzahl ELISA der unstimulierten Kontrollgruppe	mind. n=3
Anzahl ELISA der stimulierten Gruppen	mind. n=3

Apoptose Assay:

Anzahl Apoptose Assay mit neutrophilen Granulozyten	mind. n=5
Anzahl Apoptose Assay mit Monozyten	mind. n=5

Aktivierungs Assay:

Anzahl Aktivierungs Assay mit neutrophilen Granulozyten	mind. n=4
---	-----------

Whole Mount Staining und immunhistologische Färbungen:

Je Gruppe	mind. n=3
-----------	-----------

***In vivo* Versuche:**

Laser Verletzung:

Anzahl verwendeter Chimären NG2DsRed-CX ₃ CR1eGFP	n=3
Anzahl verwendeter Chimären NG2DsRed-LysMeGFP	n=3

Injektion chemotaktisch wirkender Substanzen TNF- α /fMLP:

Anzahl verwendeter Chimären NG2DsRed-CX ₃ CR1eGFP (TNF- α)	n=3
Anzahl verwendeter Chimären NG2DsRed-LysMeGFP (fMLP)	n=3

7 Statistische Versuchsauswertung

Zur statistischen Auswertung der Versuche wurden das Softwareprogramm SigmaPlot 11.0 (Systat, Erkrath) sowie SPSS Statistics (IBM, Ehningen) verwendet. Die so erlangten Ergebnisse werden als Einzelwerte in Dot Plots oder mit Mittelwerten \pm s.e.m. graphisch dargestellt. Bei normalverteilten Werten wurde der p-Wert mittels Students T-Test oder ANOVA/Bonferoni Test errechnet. Die statistische Signifikanz wird für einen p-Wert von kleiner 0,05 angenommen. Bei Gruppen mit Anzahl der unabhängigen Stichproben n unter 15, wurde der Fisher-Pittman Test angewendet¹⁴. Voraussetzung hierfür sind zum einen die Normalverteilung und zum anderen homogene Varianzen. Die Auswertung der rtPCR-Ergebnisse erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ – Methode nach Livak und Schmittgen⁵⁵. Diese Methode ermöglicht die Berechnung der relativen Änderung der Genexpression. Bei der Auswertung der FACS-Ergebnisse wurde ein 95% Intervall bei der Referenzprobe angelegt und diese Einstellungen für die Auswertung der Proben angewandt.

V Ergebnisse

1 Charakterisierung der humanen Perizyten

Zunächst wurden die humanen Perizyten auf die, für die gegebene Fragestellung wichtigen, Marker untersucht. Perizyten sind schwierig zu charakterisieren und es gibt, wie unter II 1 beschrieben, eine Reihe unterschiedlicher Marker je nach Funktion und Lokalisation der Perizyten. Es wurden die Marker NG2 und α -Smooth-Muscle-Actin (α -SMA) ausgewählt, da sie von dem Großteil der Perizyten exprimiert werden. NG2 ist ein Proteoglycan, welches u.a. auf der Oberfläche von Perizyten zu finden ist. Bei α -SMA handelt es sich um ein Protein, das von allen muralen Zellen, also Perizyten und glatten Muskelzellen, exprimiert wird. Da α -SMA sowohl für Perizyten als auch für glatte Muskelzellen und Fibroblasten charakteristisch ist, werden diese anschließend noch durch den Marker Calponin abgegrenzt. Calponin ist ein Protein, das spezifisch für glatte Muskelzellen ist und an Aktin-, Tropomyosin- und Calmodulin bindet. Es wird nicht von Perizyten exprimiert.

Um diese oben genannten Proteine mittels Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen, wurde die Immunfluoreszenz verwendet (siehe Abbildung 14). Diese Färbungen zeigten, dass die Perizyten die typischen Marker NG2 (a) und α -SMA (b) exprimieren. Weiterhin konnte kein Calponin (c) auf den humanen Perizyten nachgewiesen werden, was sie von glatten Muskelzellen abgrenzt.

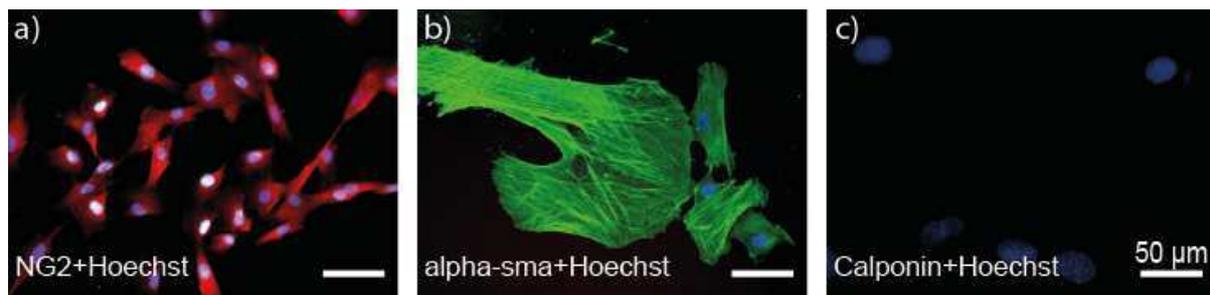


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbungen von Perizyten

- a) Immunfluoreszenzfärbung für NG2 (rot), Zellkernfärbung Hoechst 33342 (blau);
- b) Immunfluoreszenzfärbung für α -SMA (grün), Zellkernfärbung Hoechst 33342 (blau);
- c) Immunfluoreszenzfärbung für Calponin (hier negativ), Zellkernfärbung Hoechst 33342 (blau); Repräsentativ für n=3 Experimente

2 Expression von Rezeptoren durch Perizyten

Zu Beginn wurde untersucht, ob Perizyten Rezeptoren für verschiedene damage-associated-molecular-patterns (DAMPs) exprimieren und ob das Expressionsniveau dieser Rezeptoren durch Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren verändert wird.

Dafür wurden kultivierte Perizyten mit TNF- α , LPS, ATP und nekrotischem Zelllysat für 24 Stunden inkubiert und mit unstimulierten Perizyten verglichen. LPS dient dabei jeweils als Positivkontrolle. Aus ihrem Zellpellet und der daraus isolierten mRNA wurden real-time PCRs auf verschiedene Rezeptoren durchgeführt (siehe Abbildung 15).

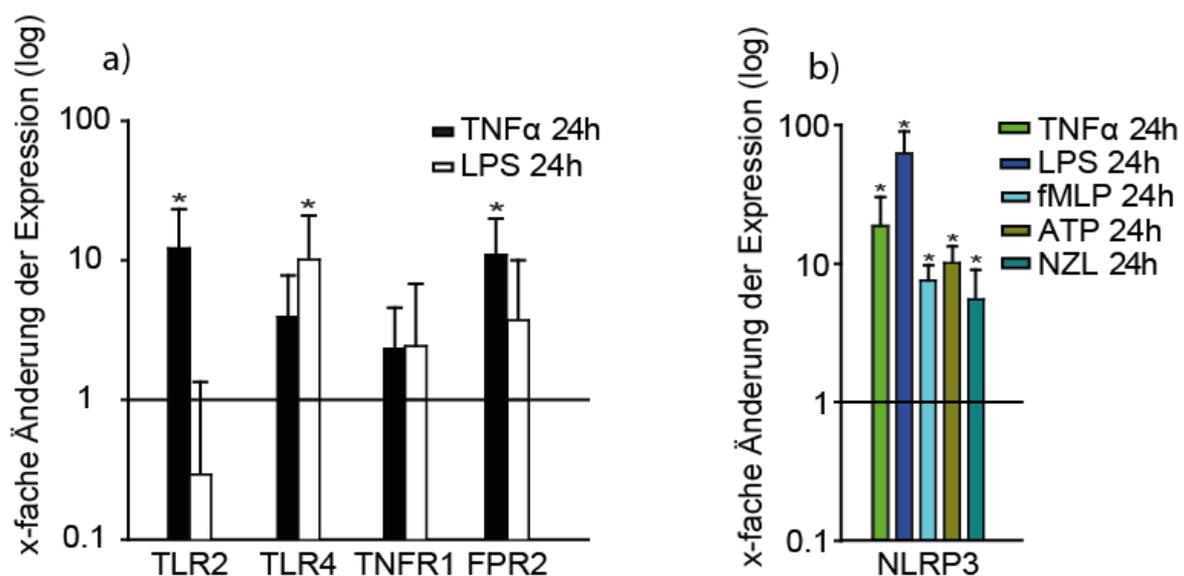


Abbildung 15: Expression von DAMP-Rezeptoren durch Perizyten

a) Darstellung der x-fachen Änderung der Expression der Rezeptoren TLR2, TLR4, TNFR1 und FPR2 nach Stimulation mit TNF- α (100ng/ml) und LPS (100 ng/ml) auf mRNA-Ebene; **b)** Darstellung der x-fachen Änderung der Expression von NLRP3 nach Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml), LPS (100 ng/ml), ATP (100 μ M), fMLP (100 μ M) und nekrotischem Zelllysat (NZL) auf mRNA-Ebene. In beiden Diagrammen werden die Änderungen im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe dargestellt. Die mit einem * gekennzeichneten Balken weisen eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) auf. Werte aus mindestens n=3 Experimenten

Dieses Diagramm zeigt bei a) die Änderung der Expression der Rezeptoren TLR2, TLR4, TNFR1 und FPR3 nachfolgend auf eine Stimulation mit TNF- α und LPS für 24 Stunden im Vergleich zu unstimulierten Zellen. TLR2 und TLR4 sind Rezeptoren aus der Gruppe der Toll-like Rezeptoren (TLRs). Diese sind transmembranöse Rezeptoren, die eine wichtige Rolle bei der Pathogenerkennung durch das angeborene Immunsystem spielen. Sie erkennen sowohl exogene als auch endogene inflammatorische Stimuli.

Bei TNFR1 handelt es sich um den Rezeptor für TNF- α , FPR2 ist ein Rezeptor für fMLP. Ebenfalls wird, wie unter b) sichtbar, ein weiterer Rezeptor für sterile Stimuli, NLRP3, von den Perizyten exprimiert. NLRP3 ist ein zytosolischer Rezeptor, der zu vermehrter Gentranskription und darauf folgender Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen führt. Negativ verliefen die rt-PCRs für den Rezeptor TLR9 und die beiden fMLP-Rezeptoren FPR1 und FPR3 (hier nicht aufgeführt). Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass Perizyten Rezeptoren für eine Vielzahl von DAMPs und PAMPs exprimieren und dass diese auf proinflammatorische Reize hin vermehrt exprimiert werden.

3 Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen durch Perizyten

Im Anschluss daran sollte geklärt werden, wie Perizyten auf Stimulation der oben beschriebenen Rezeptoren durch Entzündungsreize reagieren, vor allem hinsichtlich der Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen.

Dazu wurde mittels rtPCR und ELISA die Reaktion der Perizyten auf inflammatorische Stimuli untersucht. Perizyten wurden in Kultur mit unterschiedlichen Entzündungsmediatoren (TNF- α , LPS, fMLP, ATP und nekrotischem Zelllysat) stimuliert und ihre Reaktion auf zellulärer Ebene untersucht. Dabei wurden auch unterschiedliche Zeitspannen der Inkubation untersucht.

Zunächst wurde mittels real-time PCR analysiert, ob Perizyten Adhäsionsmoleküle und Chemokine exprimieren und ob durch inflammatorische Stimuli eine veränderte Expression dieser Faktoren zu beobachten ist. Hierbei wurden die Perizyten auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 (siehe Abbildung 17), sowie der Chemokine CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL5, CX3CR1, IL6, IL8, MIF, GM-CSF und TNF- α mit den entsprechenden Primern untersucht (siehe Abbildung 16).

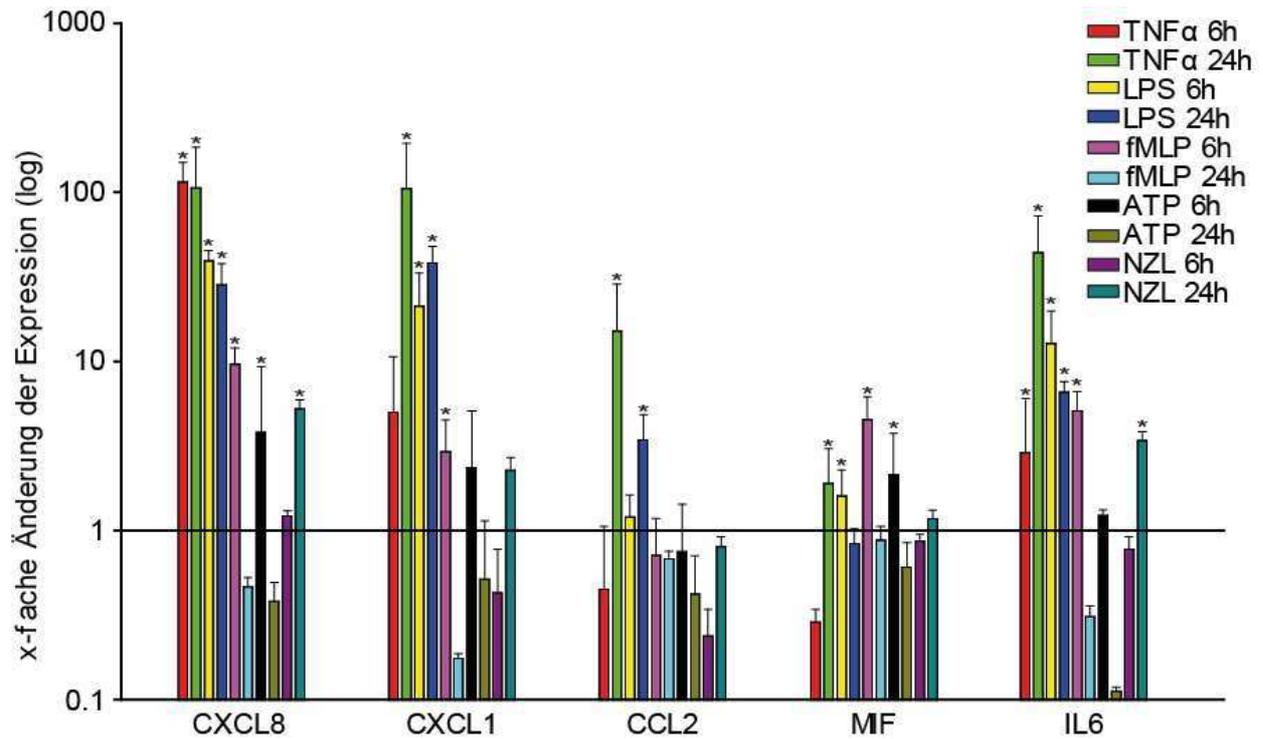


Abbildung 16: Expression von Chemokinen durch Perizyten

Darstellung der Ergebnisse der real-time PCRs mit verschiedenen Primern (CCL2, CXCL1, IL6, CXCL8 und MIF) nach Stimulation von Perizyten mit den Entzündungsmediatoren TNF- α (100ng/ml), LPS (100ng/ml), fMLP (100 μ M), ATP (100ng/ml) und nekrotischem Zelllysate (NZL) für 6h bzw. 24h. Dargestellt ist die x-fache Änderung der Expression der Chemokine im Bezug auf die unstimulierte Kontrollgruppe (einfacher Wert). Die mit einem * gekennzeichneten Balken weisen eine signifikante Erhöhung auf ($p < 0,05$), Werte aus mindestens $n=3$ Experimenten.

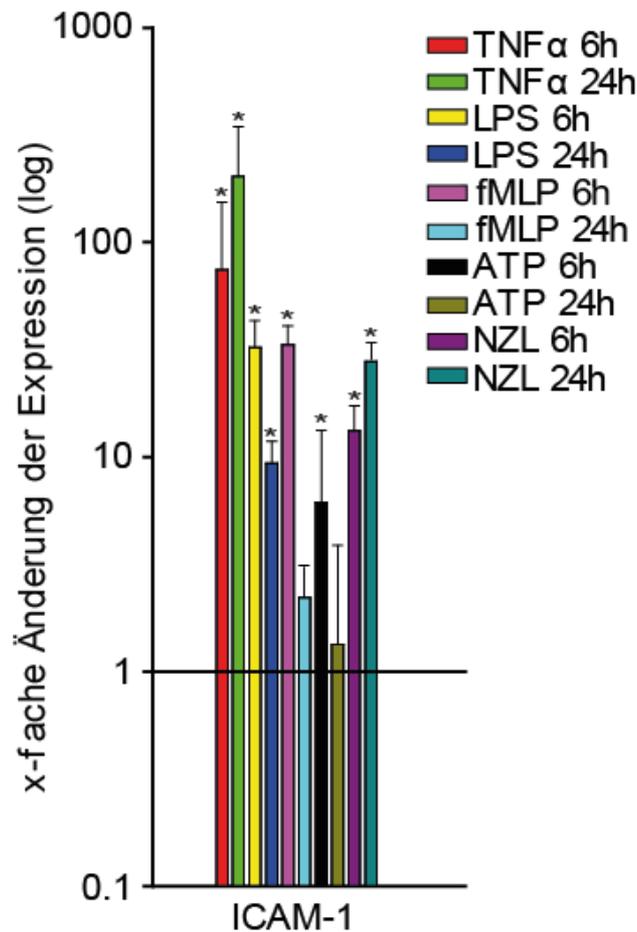


Abbildung 17: Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 durch Perizyten

Darstellung der Ergebnisse der real-time PCRs für die Expression des Adhäsionsmolekül ICAM-1 nach Stimulation von Perizyten mit den Entzündungsmediatoren TNF- α (100 ng/ml), LPS (100ng/ml), fMLP (100 μ M), ATP (100ng/ml) und nekrotischem Zelllysat (NZL) für 6h bzw. 24h. Dargestellt ist die x-fache Änderung der Expression der Chemokine im Bezug auf die unstimulierte Kontrollgruppe (einfacher Wert). Die mit einem * gekennzeichneten Balken weisen eine signifikante Erhöhung auf ($p < 0,05$); Werte aus mindestens $n=3$ Experimenten.

Erhöhte Expression findet sich demnach bei ICAM-1, CCL2, CXCL1, IL6, CXCL8 und MIF. In Bezug auf die Adhäsionsmoleküle konnte gezeigt werden, dass Perizyten ICAM-1 exprimieren, welches nach Stimulation stark hochreguliert wird. Am stärksten exprimiert wird es bei TNF- α -Stimulation für 24h, im Gegensatz dazu ist keine signifikante Veränderung des Expressionslevels bei Stimulation mit fMLP und ATP für 24h erkennbar.

Bei dem Chemokin CCL2, welches vor allem auf Monozyten chemotaktisch wirkt, fällt auf dass es durch alle Entzündungsmediatoren, außer ATP, jeweils erst nach 24h verstärkt exprimiert wird. Der 6h Wert unterscheidet sich nicht signifikant von dem der unstimulierten Kontrollgruppe. Eine deutliche und signifikante Erhöhung ist nur bei TNF- α und LPS (jeweils 24h) sichtbar. Im Gegensatz dazu ist die Expression der Chemokine CXCL1 und

CXCL8, die vor allem auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirken, bereits nach 6h signifikant hochreguliert.

Bemerkenswert ist, dass fMLP nach 6 h zu einer vermehrten Expression von CXCL1 und CXCL8 führt, nach 24h aber eine verminderte Expression hervorruft. Eine ähnliche Dynamik ist auch bei ATP zu beobachten. Das Zytokin IL-6 wird vor allem nach Stimulation mit TNF- α (6h, 24h) und LPS (6h, 24h) vermehrt exprimiert, wobei fMLP wiederum die selbe differenzierte Wirkung zeigt wie bei CXCL1 und IL8. Bei MIF fällt auf, dass es konstitutiv bereits stark exprimiert wird, trotzdem kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression bei Stimulation mit TNF- α (24h), LPS (6h), fMLP (6h) und ATP (6h). Keine oder nur eine sehr geringe Expression konnte bei CCL3, CXCL5, CX₃CR1, GM-CSF, TNF- α und VCAM-1 gefunden werden. Übergreifend erkennbar ist, dass die Hochregulation der Adhäsionsmoleküle und Chemokine bei TNF- α und LPS am stärksten ist, während fMLP, ATP und nekrotisches Zelllysate einen geringeren Einfluss haben.

Anschließend an die real-time PCR Ergebnisse wurde die Sekretion der oben genannten chemotaktischen Moleküle mittels ELISA überprüft und quantifiziert (siehe Abbildung 18).

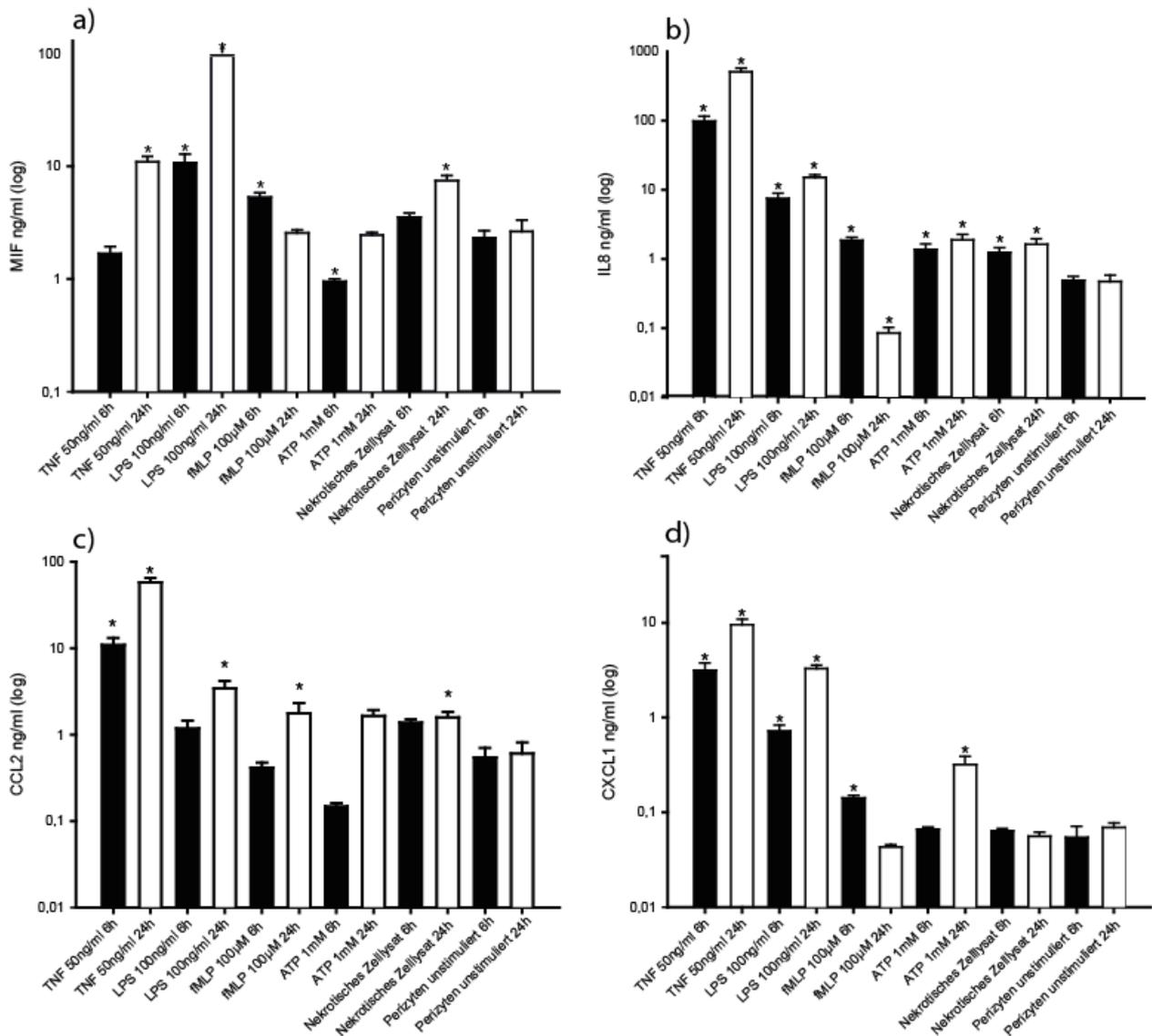


Abbildung 18: Sekretion von Chemokinen durch Perizyten

Darstellung der quantitativen Ergebnisse der ELISA-Experimente auf Sekretion von **a) MIF**, **b) IL-8**, **c) CCL2** und **d) CXCL1** nach Stimulation mit den Entzündungsmediatoren TNF- α (50 ng/ml), LPS (100 ng/ml), fMLP (100 μ M), ATP (1 mM) und nekrotischem Zelllysat (1:1 Verdünnung) für jeweils 6 h oder 24h; Ergebnisse aus Mediumüberständen von stimulierten Perizyten im Vergleich zu unstimulierten Perizyten. Die mit einem * gekennzeichneten Balken weisen eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) auf. Werte aus mindestens $n=3$ Experimenten

Bei der Sekretion von MIF ist zu erkennen, dass sie signifikant erhöht ist, bei Stimulation der Perizyten mit TNF- α (24h), LPS (6h und 24h), fMLP (6h) und nekrotischem Zelllysat (24h). Sie weisen alle eine MIF Konzentration von über 1 ng/ml bis über 10 ng/ml auf. Am stärksten erhöht ist es bei LPS 24h mit einer MIF-Konzentration von 100ng/ml. Bei CCL2 wird deutlich, dass dieses vor allem nachfolgend auf eine Inkubation mit TNF- α sezerniert wird, wobei hier ein Anstieg von 6h auf 24h zu beobachten ist. Ebenfalls signifikant erhöht ist es

bei LPS (24h), fMLP (24h) und bei nekrotischem Zelllysate (24h). Sichtbar ist auch, dass die Sekretion von CCL2, außer bei dem potenten Mediator TNF- α , erst nach 24h Inkubationszeit signifikant über dem Wert der unstimulierten Probe liegt. CXCL1 wird vor allem als Antwort auf einen proinflammatorischen Reiz durch TNF- α und in geringerem Maße durch LPS sezerniert. Signifikant erhöht ist es bei TNF- α (6h und 24h), LPS (6h und 24h), fMLP (6h) und ATP (24h). Die Werte für die anderen Stimulantien liegen auf der Höhe der Werte der unstimulierten Perizyten. Interleukin 8 (CXCL8) wird ebenso am meisten von den Perizyten sezerniert, die mit TNF- α oder LPS stimuliert wurden. Signifikante Erhöhungen findet man hier allerdings bei allen Entzündungsmediatoren, außer bei fMLP (24h). Erneut sichtbar ist, dass der Wert der 24 Stunden Stimulation über dem des sechs Stunden Wertes liegt.

Zusammenfassend sezernieren Perizyten die Chemokine MIF, CCL2, CXCL1 und CXCL8. Bei MIF und CCL2 ist erst nach 24h eine signifikante Erhöhung der Sekretion zu beobachten, während CXCL1 und CXCL8 bereits nach 6h vermehrt zu finden sind. Weiterhin bestätigen sich die Ergebnisse der rt-PCR, dass TNF- α und LPS die stärksten Stimuli darstellen. Die sterilen Entzündungsreize fMLP, ATP und nekrotisches Zelllysate haben im Vergleich dazu eine geringere Wirkung.

Da in den oben genannten Ergebnissen festgestellt wurde, dass MIF konstitutiv bereits stark exprimiert wird, nach Stimulation kaum hochreguliert wird, aber von den Perizyten sezerniert wird, sollte untersucht werden, ob MIF innerhalb der Perizyten gespeichert werden kann.

Dazu wurde Immunfluoreszenzfärbungen auf MIF und CD 74 von Perizyten durchgeführt (siehe Abbildung 19). Dabei zeigte sich, dass unstimulierte Perizyten MIF in kleinen intrazellulären Vesikeln speichern, CD74 weist ebenso eine zytosolische Lokalisation auf. Ebenso wurden diese Perizyten für 6h mit TNF- α (100ng/ml) stimuliert, um einen möglichen Unterschied in der Lokalisation von MIF zu erkennen.

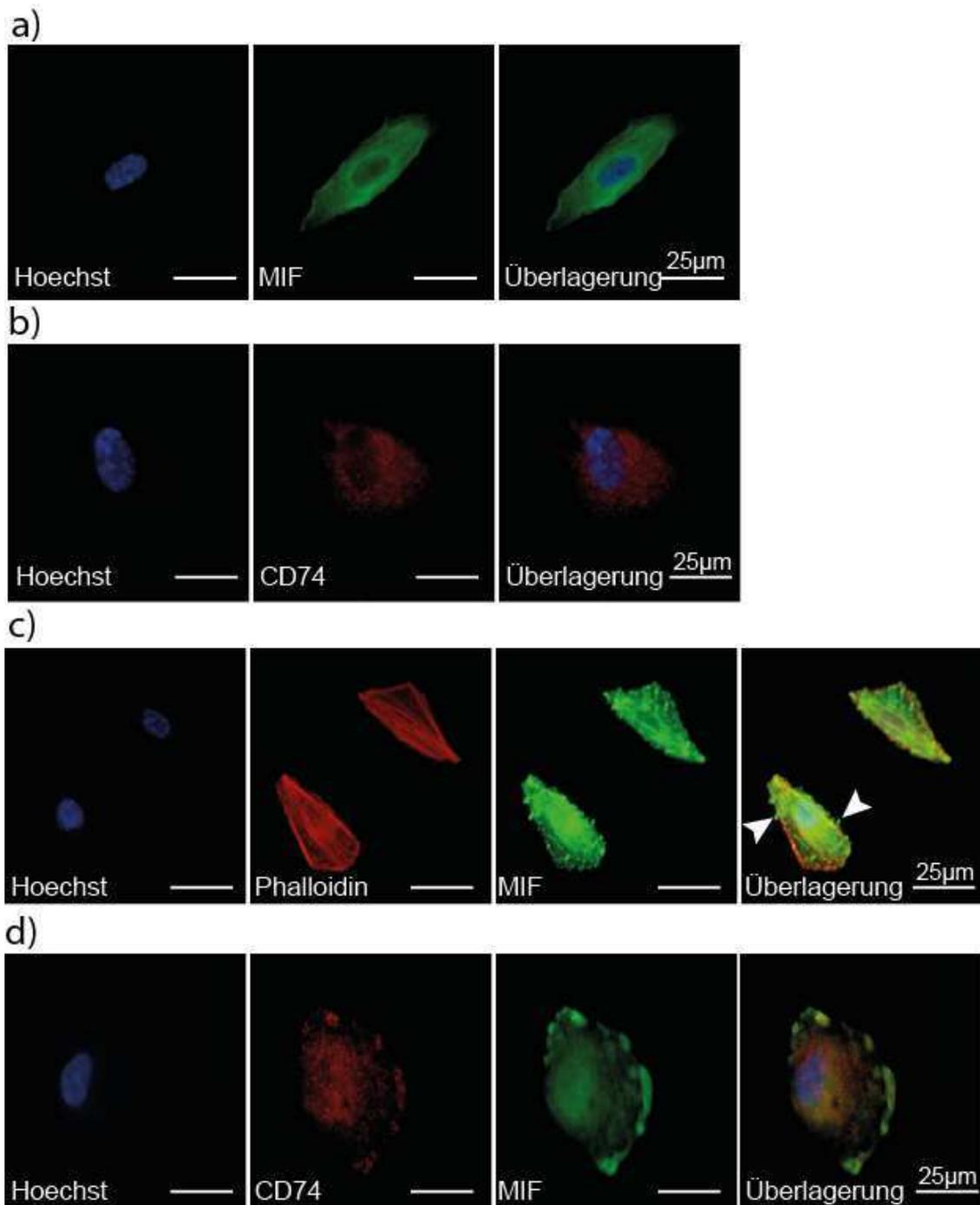


Abbildung 19: Präsentation von MIF an der Zelloberfläche von Perizyten

Immunfluoreszenzfärbung humaner Perizyten für MIF, CD74, Hoechst 33342 und Phalloidin mit und ohne Stimulation mit TNF- α (6h, 100ng/ml), 40fache Vergrößerung; **a)** Färbung unstimulierter Perizyten für MIF (grün), die Zellkerne fluoreszieren in blau (Hoechst 33342), daneben Überlagerung; **b)** Immunfluoreszenzfärbung unstimulierter Perizyten für CD 74 (rot) und Hoechst 33342 (Zellkerne, blau), rechts daneben die Überlagerung; **c)** Doppelfärbung TNF- α stimulierter Perizyten für Phalloidin (Aktinfilament, rot) und MIF (grün), Zellkerne (blau), rechts Überlagerung der Einzelbilder; Pfeilspitze: MIF in Vesikel auf der Zelloberfläche **d)** Doppelfärbung TNF- α stimulierter Perizyten für CD74 (rot) und MIF (grün), Zellkerne (Hoechst 33342, blau), rechts Überlagerung der Einzelbilder; repräsentativ für mindestens n=3 Färbungen

Nach Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ waren große MIF-enhaltende Vesikel im Zytoplasma erkennbar, aber auch eine Vielzahl an der Zelloberfläche. Ebenfalls exprimieren Perizyten den MIF-Rezeptor CD74, der basal vermehrt im Zytoplasma und nach Stimulation dagegen vermehrt an der Zelloberfläche zu finden ist.

Da die genaue Lokalisation von MIF in den Perizyten untersucht werden sollte, wurden Aufnahmen mittels des konfokalen Mikroskopes angefertigt. Dieses ermöglicht die Anfertigung von Schnittbildern der Zellen und somit eine exaktere Bestimmung der Lokalisation einzelner Strukturen. Auch hier wurde der Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Perizyten untersucht, wobei erneut $\text{TNF-}\alpha$ als Stimulanz verwendet wurde (siehe Abbildung 20).

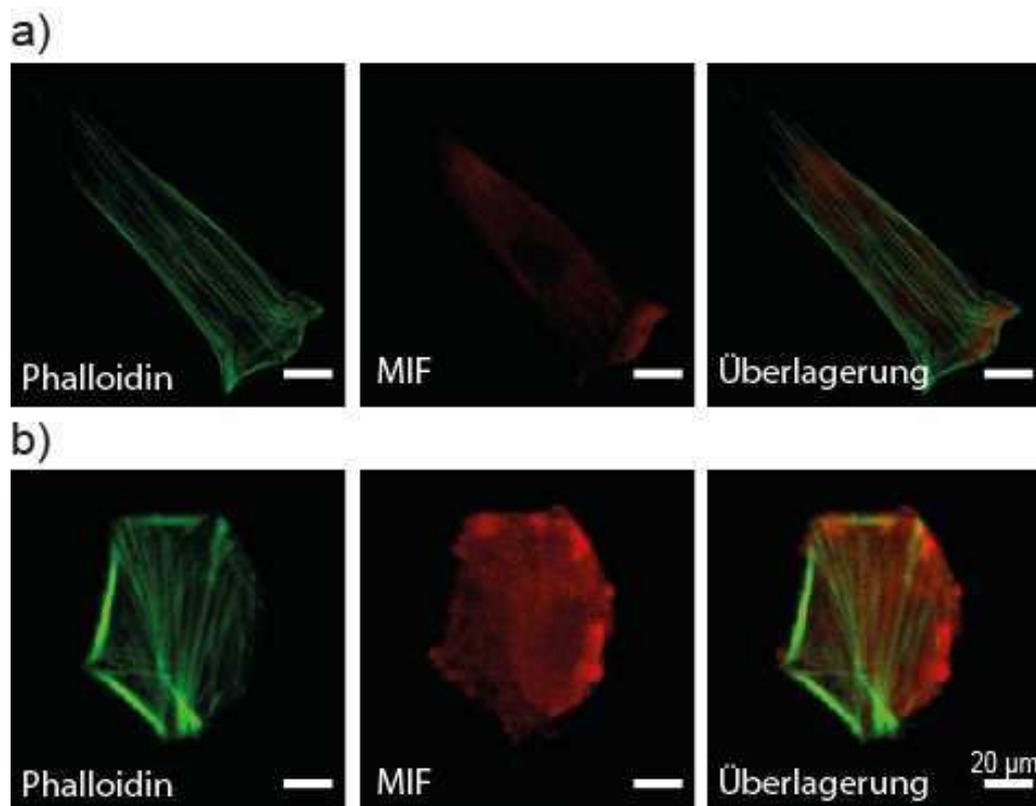


Abbildung 20: Mobilisierung von MIF durch Perizyten nach Stimulation durch $\text{TNF-}\alpha$

Immunfluoreszenzfärbung humaner Perizyten; **a)** Färbung unstimulierter Perizyten auf Phalloidin (grün) und MIF (rot), rechts daneben die Überlagerung; **b)** Färbung stimulierter Perizyten ($\text{TNF-}\alpha$ 100ng/ml) auf Phalloidin und MIF, rechts daneben die Überlagerung; Lokalisation von MIF in Vesikeln auf der Oberfläche der Perizyten erkennbar; repräsentativ für mindestens $n=3$ Färbungen

In diesen Aufnahmen wird ersichtlich, dass MIF auf der Oberfläche der Zellen in Vesikeln gespeichert wird. Es ist deutlich zu sehen, dass diese Vesikel die Oberfläche der Zelle überragen und somit auf der Zellmembran präsentiert werden. Perizyten speichern dementsprechend MIF in Vesikeln und schütten dieses nach Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ aus. Dadurch wird MIF zum einen sezerniert, und kann so einen chemotaktischen Gradienten bewirken, und zum anderen in Vesikeln und über CD74 an der Oberfläche präsentiert, was einen haptotaktischen/-kinetischen Reiz für Leukozyten darstellen kann.

Im Anschluss an diese Ergebnisse wurde mittels real-time PCR die Expression der MIF-Rezeptoren, CD74 und CXCR4 analysiert (siehe Abbildung 21). Da CD74 gewöhnlich intrazellulär lokalisiert ist, die MIF-Vesikel allerdings oberflächlich auf der Zelle zu finden sind, wurde untersucht, ob CXCR4 ebenso exprimiert wird. Dieser Rezeptor kann mit CD74 einen Komplex formen.

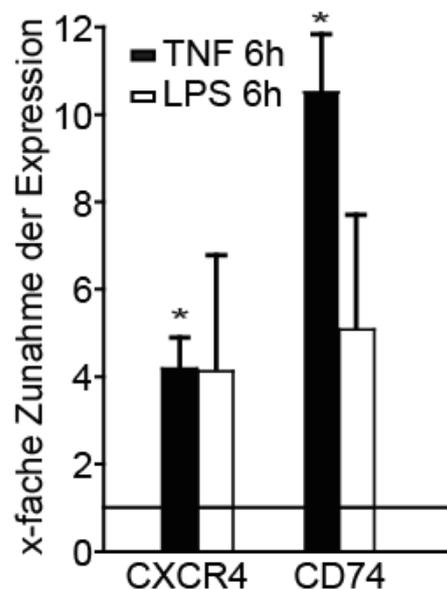


Abbildung 21: Expression der MIF-Rezeptoren CXCR4 und CD 74 durch Perizyten

X-fache Zunahme der Expression der Rezeptoren CXCR4 und CD74 nach Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ (100 μM) bzw. LPS (100 ng/ml) für 6h im Vergleich zu unstimulierter Kontrollgruppe. Die mit einem * gekennzeichneten Balken weisen eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) auf. Werte aus mindestens $n=3$ Experimenten

Es zeigte sich, dass Perizyten die beiden MIF-Rezeptoren CXCR4 und CD74 exprimieren, nicht jedoch CXCR2. Weiterhin ist zu sehen, dass vor allem der Rezeptor CD74 nach Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ signifikant hochreguliert wird. Ebenso ist CXCR4 signifikant erhöht

nach TNF- α Stimulation. Bei LPS finden sich ebenso Unterschiede in der Höhe der Expression, allerdings haben sich diese nicht als statistisch signifikant erwiesen.

4 Chemotaktische Wirkung von Perizyten auf myeloide Zellen

Da in den oben genannten Versuchen gezeigt werden konnte, dass Perizyten Chemokine sezernieren, von denen bekannt ist, dass sie chemotaktisch auf myeloide Leukozyten wirken, wurde darauf aufbauend untersucht, inwieweit diese Faktoren die Migration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten *in vitro* beeinflussen. Dazu wurden aus menschlichem Blut isolierte neutrophile Granulozyten und Monozyten verwendet und verschiedene Chemotaxis Assays durchgeführt, bei denen die Migration dieser Zellen untersucht wird. Im Zuge dessen wurde analysiert, ob konditionierte Medien von Perizyten eine chemotaktische Wirkung auf Leukozyten haben und welche Faktoren dabei entscheidend sind.

Es wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt, die nur aus Medium besteht, sowie eine Kontrolle mit Mediumüberstand von Perizyten die nur mit PBS stimuliert wurden. Nachdem die Zellen für eine Stunde (Neutrophile) oder vier Stunden (Monozyten) durch das Transwell migrieren, werden die gewanderten Zellen ausgezählt und verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

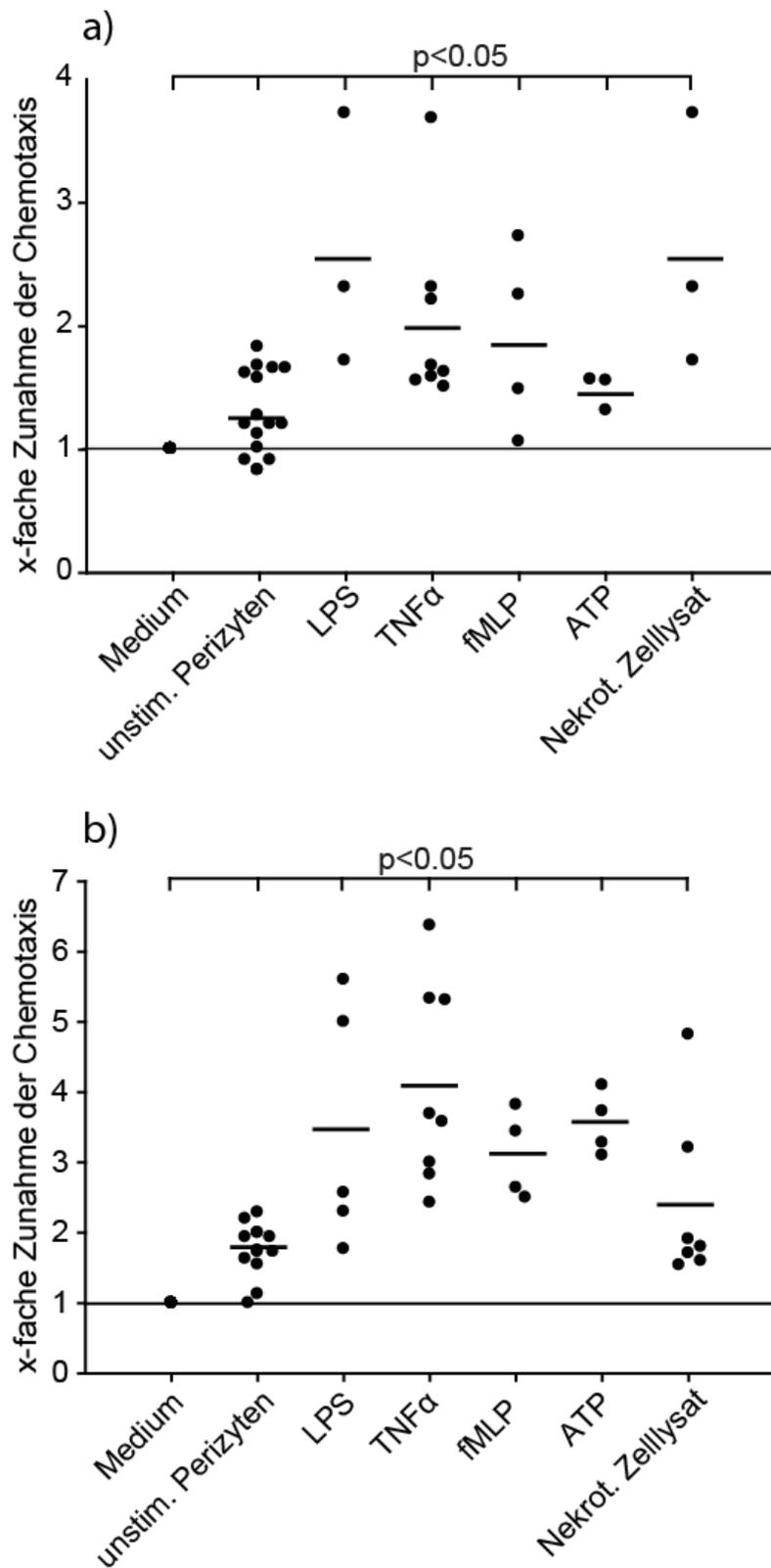


Abbildung 22: Chemotaktische Wirkung von Perizyten auf Monozyten und neutrophile Granulozyten
X-fache Zunahme der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten **(a)** und Monozyten **(b)** durch konditioniertes Medium von Perizyten im Vergleich zu Medium und unstimulierten Perizyten; Ergebnisse aus mindestens n=3 Experimenten, Einzelwerte als Punkte dargestellt, Balken entspricht dem Mittelwert

Der Chemotaxis Assay für neutrophile Granulozyten zeigt, dass alle Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Medium) eine signifikante Änderung der Chemotaxis aufweisen. Werden die Perizyten mit inflammatorischen Mediatoren stimuliert, ist eine Verstärkung der chemotaktischen Wirkung zu beobachten. Dabei ist der Effekt von LPS und TNF- α konditionierten Medien am stärksten, korrespondierend zum oben gezeigten Effekt auf die Expression von Chemokinen, aber auch nekrotisches Zelllysate zeigt einen starken Effekt.

Ebenso wurde auf die gleiche Weise der Einfluss von Perizyten auf die Migration von Monozyten untersucht. Hierbei sind ähnliche Tendenzen wie bei der Migration von neutrophilen Granulozyten zu erkennen. Die chemotaktische Wirkung der Perizyten nach Stimulation ist signifikant erhöht, wobei auch hier LPS und TNF- α konditionierte Medien die stärkste Wirkung zeigten.

Da in den vorherigen Versuchen nachgewiesen wurde, dass Perizyten *in vitro* eine chemotaktische Wirkung auf myeloide Leukozyten haben, wurde nun untersucht welche Chemokine für diesen Effekt verantwortlich sind. Dafür wurden Chemotaxis Assays durchgeführt bei denen die wichtigsten Chemokine zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (IL-8 / MIF) und Monozyten (CCL2/MIF) inhibiert wurden. Diese Versuche wurden jeweils mit LPS und TNF- α konditionierten Medium durchgeführt, da diese die stärkste chemotaktische Wirkung zeigten. Jeweils als Vergleichsgruppe wurden konditionierte Medien mit Isotyp-Antikörper (bei IL-8 und CCL2) bzw. dem Lösungsmittel DMSO (bei ISO-1) verwendet, um unspezifische Einflüsse auszuschließen (siehe Abbildung 23).

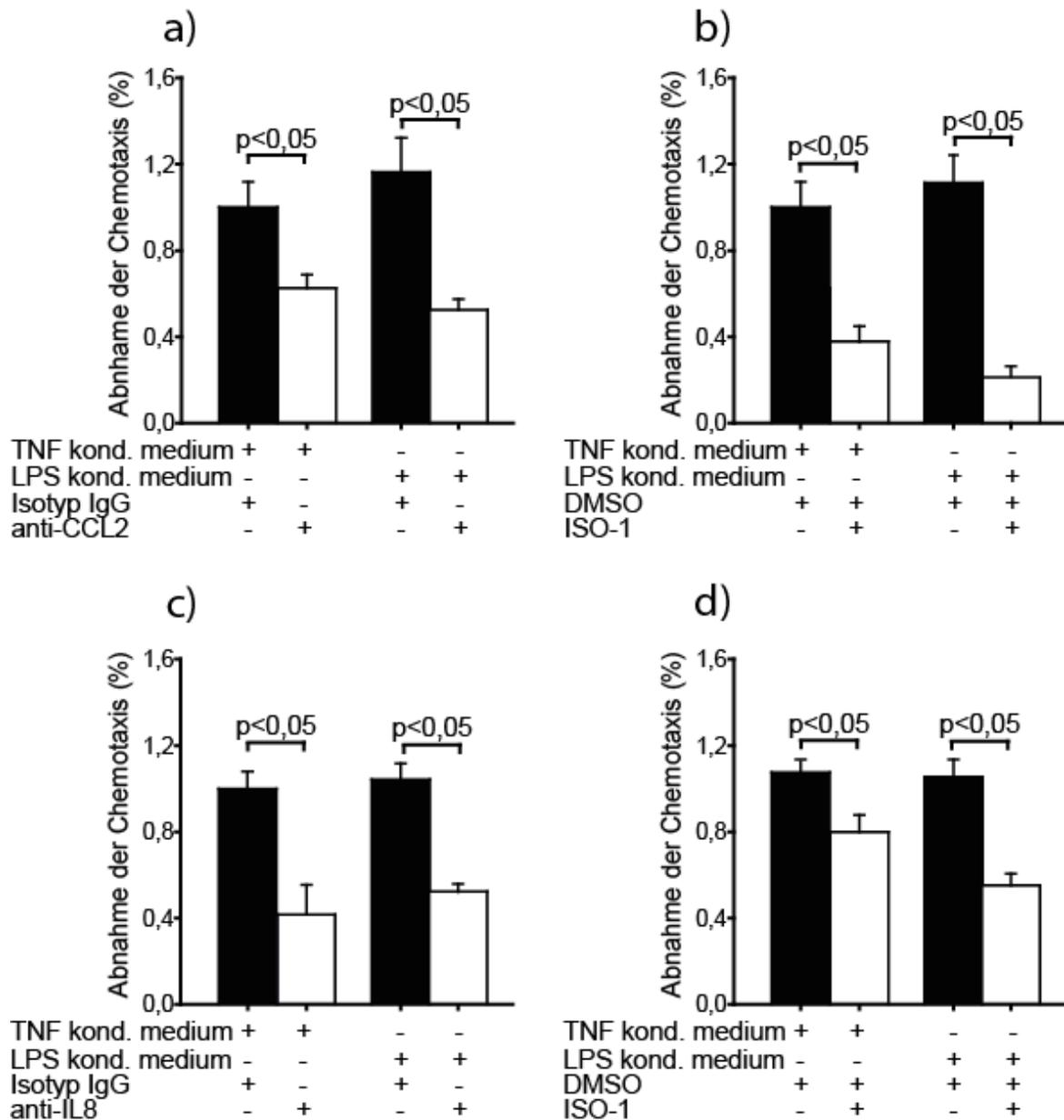


Abbildung 23: Chemotaktische Wirkung von Perizyten durch IL-8, CCL2 und MIF

Prozentuale Abnahme der Chemotaxis im Vergleich zur Kontrollgruppe von Monozyten und neutrophilen Granulozyten bei Inhibition durch anti-CCL2 (10 µg/ml), ISO-1 (36µg/ml) und anti-IL-8 (1µg/ml). Der linke Balken zeigt jeweils die Versuche mit TNF- α konditioniertem Medium (500µM), der rechte mit LPS konditioniertem Medium (1µg/ml) bzw. dem dazu passenden Isotyp (IgG)/ Lösungsmittel (DMSO) und den inhibierenden Antikörpern anti-IL8, anti-CCL2 und ISO-1. **a)** zeigt die Ergebnisse des inhibitorischen Chemotaxisassay von Monozyten unter Verwendung des Antikörper anti-CCL2, **b)** unter Verwendung des MIF-Antagonisten ISO-1; **c)** inhibitorischer Chemotaxisassay neutrophiler Granulozyten unter Verwendung des Antikörpers anti-IL8, **d)** unter Verwendung des MIF-Antagonisten ISO-1; Ergebnisse aus mindestens n=5 Experimenten.

Bei den Versuchen mit isolierten Monozyten (siehe Abbildung 23 a und b) ist die Verminderung der Chemotaxis durch den Antikörper anti-CCL2 sichtbar. Bei beiden Gruppen (TNF- α und LPS) ist die Chemotaxis signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenso ist bei der Hemmung von MIF durch den MIF-Antagonisten ISO-1 die Chemotaxis der Monozyten signifikant erniedrigt.

Bei den Chemotaxis Assays mit neutrophilen Granulozyten (siehe Abbildung 23 c und d) ist bei Verwendung von anti-IL8 die Chemotaxis sowohl bei TNF- α konditioniertem Medium als auch bei LPS konditioniertem Medium signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Verwendung des MIF-Antagonisten ISO-1 führt ebenso zu einer signifikanten Verminderung der Chemotaxis, auch hier bei beiden Gruppen (TNF- α und LPS) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigt sich, dass IL-8 und MIF entscheidende Faktoren für die Migration neutrophiler Granulozyten darstellen, da die Inhibition dieser Chemokine eine signifikant verminderte Migration zur Folge hatten. Mithilfe dieses Ansatzes konnten ebenso CCL2 und MIF als verantwortliche Mediatoren der Monozytenmigration identifiziert werden.

5 Anti-apoptotische und aktivierende Wirkung von Perizyten auf neutrophile Granulozyten *in vitro*

Da die oben beschriebenen Versuche zeigten, dass Perizyten eine chemotaktische Wirkung auf myeloide Leukozyten haben, wurde genauer untersucht, ob Perizyten auch einen Einfluss auf die Apoptose dieser Zellpopulation haben. Dabei wurden die beiden Farbstoffe PE-Annexin V (PE = Phycoerythrin) und 7AAD (7-Amino-Actinomycin) verwendet, die die Zellen in der frühen bzw. späten Phase von Nekrose oder Apoptose anfärben.

Isolierte neutrophile Granulozyten bzw. Monozyten wurden hierfür in konditioniertes Medium (unstimuliert oder TNF- α stimuliert) eingebracht, nach 24 Stunden entnommen, gefärbt und eine Durchflußzytometrie durchgeführt. Ebenso wurden eine Kontrolle mit unstimulierten Perizyten, sowie eine mit reiner Mediumkontrolle angefertigt (siehe Abbildung 24 und 25). Dieser Ansatz wurde durch FACS-Messungen untersucht, wobei die Anzahl der vitalen Zellen (doppelt negativ) und der nekrotischen bzw. apoptotischen Zellen (7AAD oder PE Annexin V positiv, bzw. doppelt positiv) zwischen den Gruppen verglichen wurde.

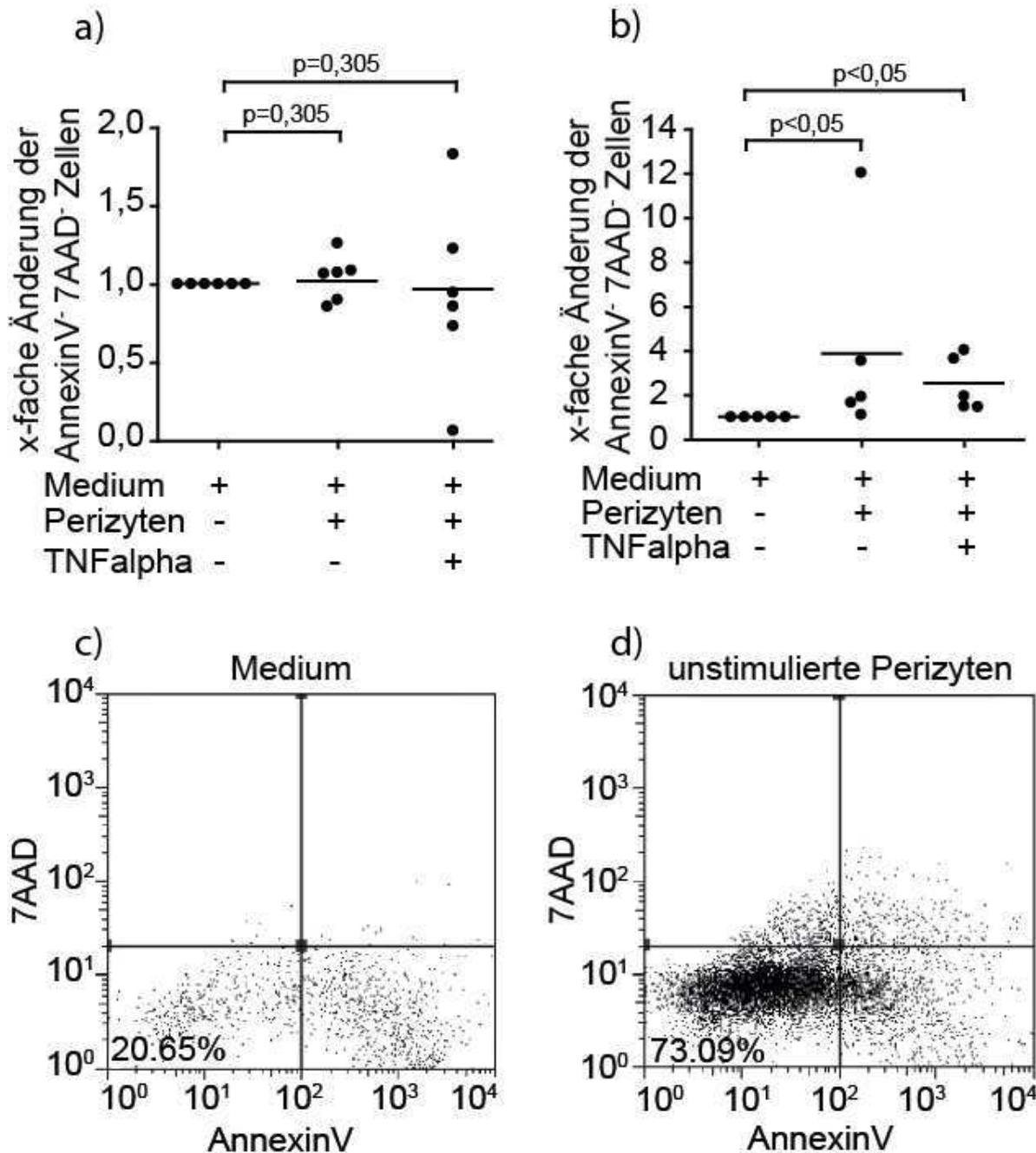


Abbildung 24: Anti-apoptotische Wirkung von Perizyten auf Monozyten und neutrophile Granulozyten
a) und **b)** zeigt die Darstellung der x-fachen Änderung der Annexin V und 7AAD negativen Zellen, d.h. der vitalen Monozyten (**a**) bzw. neutrophilen Granulozyten (**b**). Diese Änderung ist für a) nicht signifikant erhöht, bei b) sowohl für das kond. Medium unstimulierter Perizyten, als auch für TNF- α kond. Medium (500 μ M) signifikant erhöht ($p<0,05$) im Vergleich zur Mediumkontrolle. Einzelwerte als Punkte dargestellt, Balken entspricht dem Mittelwert; **c)** und **d)** zeigt die prozentuale Verteilung der neutrophilen Granulozyten nach Apoptose Assay. **c)** Ergebnis der neutrophilen Granulozyten, die in Medium inkubiert wurden, mit prozentuaalem Anteil der doppelt negativen Zellen, d.h. der vitalen Zellen. **d)** Ergebnis nach Inkubation mit konditioniertem Medium unstimulierter Perizyten; Ergebnisse aus n=5 Experimenten,

Dabei zeigte sich, dass vor allem unstimulierte Perizyten einen anti-apoptotischen Effekt auf neutrophile Granulozyten haben. Bei den stimulierten Perizyten ist der Effekt zwar noch signifikant, aber geringer ausgeprägt als bei den unstimulierten Perizyten. Bei den Monozyten ergibt sich ein anderes Bild. Hier führte die Inkubation mit konditioniertem Medium zu keiner signifikanten Erhöhung der vitalen Zellen, weder bei stimulierten noch bei unstimulierten Perizyten. Dennoch ist - wie bei den neutrophilen Granulozyten - erkennbar, dass die Inkubation mit konditioniertem Medium unstimulierter Perizyten zu einer leichten Zunahme der vitalen Zellen führt. Allerdings sind diese Ergebnisse nicht signifikant ($p=0,305$).

Ebenso wurden für die neutrophilen Granulozyten untersucht, ob die konditionierten Medien einen Einfluß auf ihre Aktivierung besitzen. Hierfür wurden isolierte neutrophile Granulozyten in konditioniertem Medium (unstimuliert oder $\text{TNF-}\alpha$ stimuliert) für eine Stunde inkubiert, anschließend mit dem Aktivierungsmarker CD11b gefärbt und eine Durchflußzytometrie durchgeführt. Dabei wurden eine Kontrolle mit unstimulierten Perizyten sowie eine reine Mediumkontrolle mitgeführt. Nachfolgend sind die Ergebnisse der Färbung für den Aktivierungsmarker CD11b dargestellt:

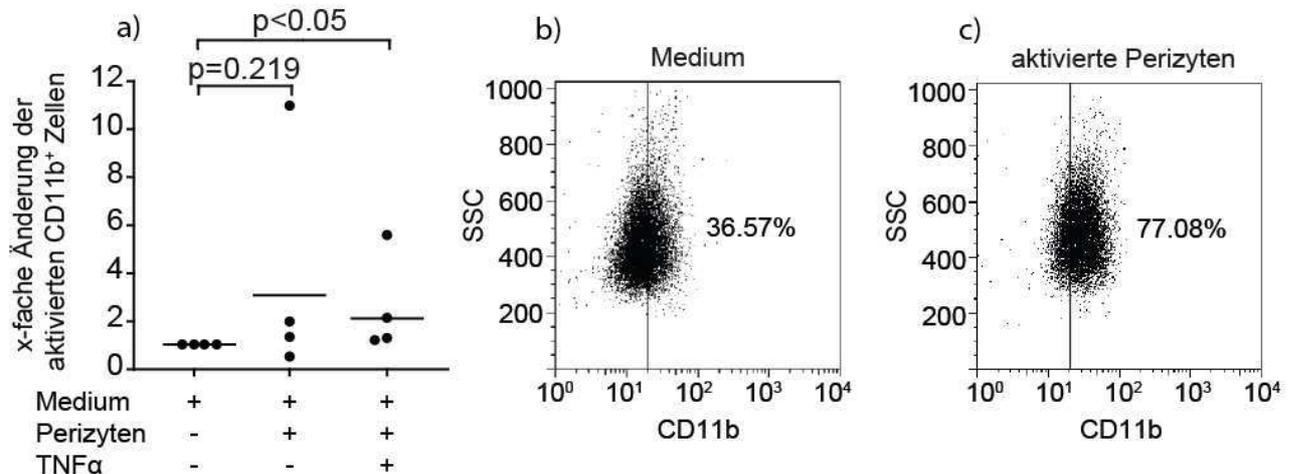


Abbildung 25: Aktivierende Wirkung von Perizyten auf neutrophilen Granulozyten

a) x-fache Änderung der CD11b positiven Zellen, d.h. der aktivierten neutrophilen Granulozyten; für $\text{TNF-}\alpha$ kond. Medium ($500\mu\text{M}$) signifikant erhöht ($p < 0,05$) im Vergleich zur Mediumkontrolle; b) und c) Darstellung der prozentualen Ergebnisse der FACS-Analyse, von in Medium bzw. kond. Medium inkubierten neutrophilen Granulozyten. Ergebnisse aus mindestens $n=5$ Experimenten, Einzelwerte als Punkte dargestellt, Balken entspricht dem Mittelwert

In diesen Ergebnissen wird deutlich, dass sowohl Medium unstimulierter Perizyten als auch $\text{TNF-}\alpha$ konditioniertes Medium zu einer vermehrten Aktivierung der neutrophilen

Granulozyten führen. Bei letzterem fällt die Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant aus, bei reiner Mediumkontrolle dagegen nicht ($p=0,219$). In den daneben aufgeführten Darstellungen der FACS-Populationen ist der prozentuale Anteil CD11b-positiver Zellen zu sehen. Hierbei fällt auf, dass neutrophile Granulozyten, die in konditioniertem Medium inkubiert wurden, vermehrt positiv für CD11b sind (77,08%) im Vergleich zu denen, die in reinem Basalmedium inkubiert wurden (36,57).

6 Die sterile Inflammation im Mausmodell

Um die *in vitro* gesammelten Daten auch *in vivo* zu analysieren, wurde ein Mausmodell für diese Anwendungsart etabliert. Dieses lässt die Analyse steriler Inflammationsprozesse *in vivo* zu. Zunächst wurden auch hier die Perizyten charakterisiert und verifiziert, damit es eindeutig ist, dass es sich bei den betrachteten Zellen um Perizyten handelt. Die Perizyten lassen sich zum einen direkt im murinen Gewebe, *ex vivo*, mittels Whole Mount Staining visualisieren. Da ein Großteil dieser Arbeit auch *in vivo* angefertigt wird, ist es zum anderen wichtig, die Perizyten im Blutgefäßsystem der Maus genau zu lokalisieren und zu charakterisieren.

Zuerst wurde verifiziert, dass die betrachteten und untersuchten Zellen wirklich Bestandteil der Gefäßwand sind. Dafür wurden Whole Mount Stainings auf den typischen Perizyten Marker α -SMA in einer NG2DsRed Maus durchgeführt, bei dem man mit Immunfärbungen und dem 2-Photonen-Mikroskop detaillierte Aufnahmen des Ohres, der Zellen und den umgebenden Strukturen in 3D anfertigen kann (siehe Abbildung 26).

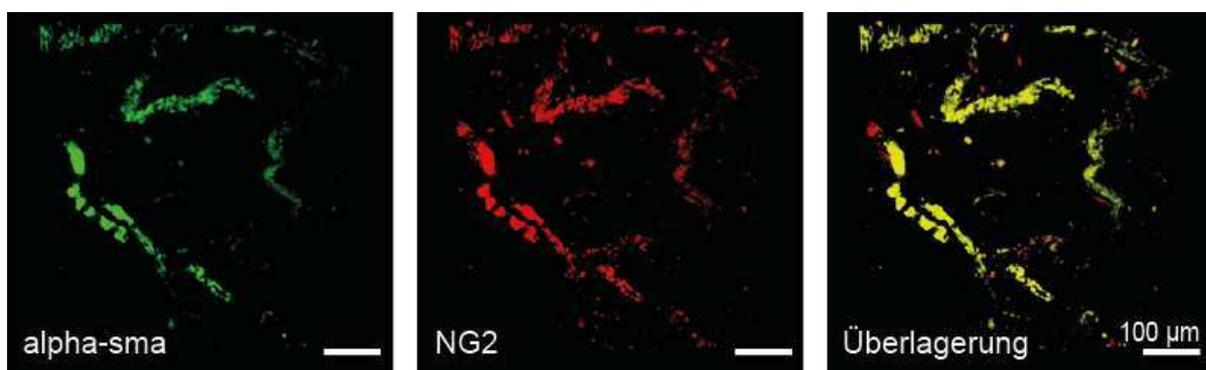


Abbildung 26: Expression von NG2 und α -SMA durch mikrovaskuläre Perizyten

Whole Mount Staining von murinem Ohr-Gewebe einer NG2DsRed-Maus; Fluoreszenz von α -SMA in grün, NG2 in rot (Eigenfluoreszenz) und Überlagerung (gelb); die überlagerten Bereiche decken sich fast vollständig mit den Einzelfärbungen; repräsentativ für $n=3$ Experimenten

Hier zeigte sich, dass die Mehrzahl der NG2⁺ Zellen auch α -SMA⁺ ist und somit die typische Markerkombination für Perizyten aufweisen. Einige Zellen sind nur NG2⁺, was für kapilläre Perizyten beschrieben ist.

Zudem wurde untersucht, ob die NG2⁺ Zellen die typische Lokalisation von Perizyten um das Endothel aufweisen. Whole Mount Stainings auf CD31 zeigten, dass die NG2⁺ Zellen in der NG2DsRed Maus direkt dem Endothel anliegen (siehe Abbildung 27 b). Weiterhin wurde die Lokalisation der Perizyten *in vivo* untersucht, indem FITC-Dextran i.a. appliziert wurde, um die Blutgefäße darzustellen. Auch hier zeigte sich, dass die NG2⁺ Zellen unmittelbar um das Gefäß angeordnet sind (Abbildung 27 a). In der NG2DsRed Maus weisen die DsRed exprimierenden Zellen also die typische Markerexpression und Lokalisation von Perizyten auf.

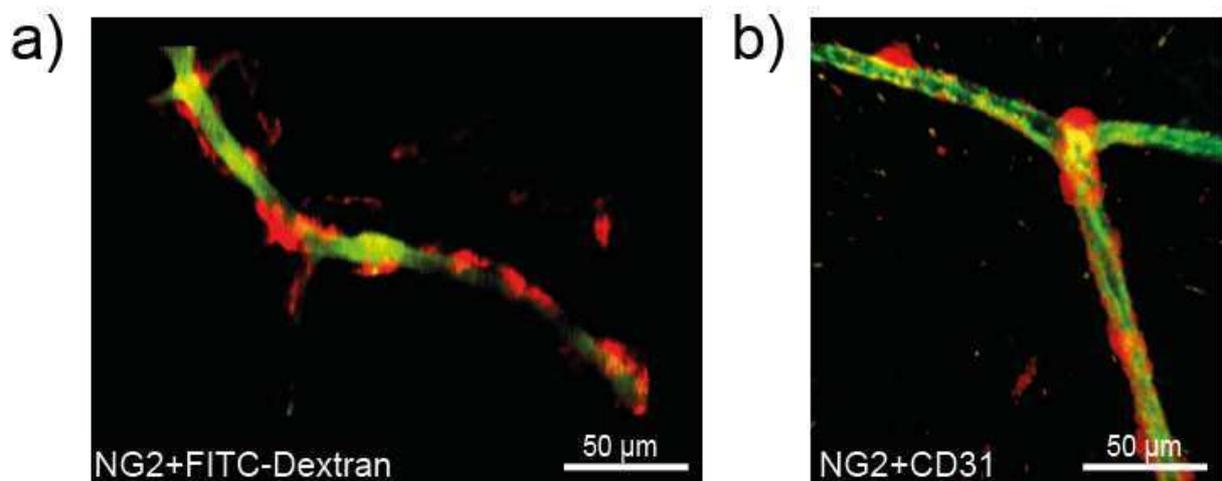


Abbildung 27: Lokalisation der Perizyten am Blutgefäß

2-Photonen mikroskopische Darstellung der Lokalisation der Perizyten am Blutgefäß; **a)** Blutgefäß (FITC-Dextran, grün), anliegende Perizyten (NG2⁺, rot) *in vivo*; **b)** Whole Mount Staining für den Endothelmarker CD31 (grün) mit anliegenden Perizyten (NG2⁺, rot) *ex vivo*; repräsentativ für mindestens n=3 Experimenten

Als nächstes wurden die Perizyten auf die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 untersucht. Nachfolgend ist dies durch Whole Mount Staining visualisiert (siehe Abbildung 28).

Der Marker ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) ist ein Adhäsionsmolekül und wird von Endothelzellen und Zellen des Immunsystems exprimiert. Er ist in der Membran von Leukozyten und Endothelzellen präsent und vermittelt die Interaktion mit Immunzellen. Nach Zytokinstimulation steigt seine Expression stark an. Die Färbung zeigt, dass murine Perizyten, ebenso wie humane Perizyten, ICAM-1 exprimieren.

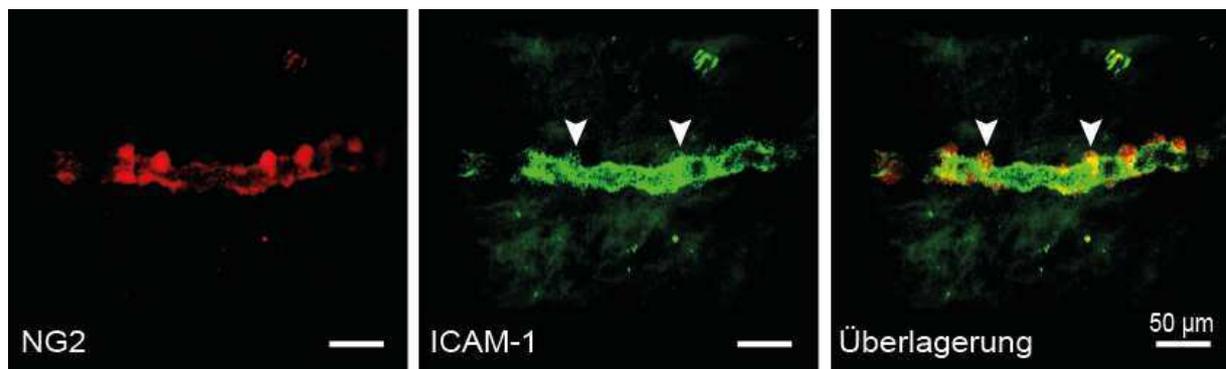


Abbildung 28: Expression von Chemokinen durch NG2⁺ Perizyten

Whole Mount Staining von murinem Ohr für das Adhäsionsmolekül ICAM-1; Perizyten (NG2⁺, rot) ICAM-1 (grün) und Überlagerung (gelb, Pfeile); repräsentativ für n=3 Experimenten

Weiterhin wurden immunhistologische Färbungen für die Chemokine MIF, CXCL5 und CCL2 angefertigt, da in den *in vitro* Versuchen die Sekretion diverser Chemokine durch Perizyten nachgewiesen wurde. Hier sollte die Lokalisation der sezernierten Chemokine nach Injektion von 600 ng TNF- α s.c. im Gewebe untersucht werden. Repräsentativ wurden immunhistochemische Färbungen für CXCL5 (für neutrophile Granulozyten), CCL2 (für Monozyten) und MIF angefertigt (siehe Abbildung 29). MIF wirkt chemotaktisch sowohl auf neutrophile Granulozyten als auch auf Monozyten. Die immunhistologischen Färbungen in Abbildung 30 zeigen die positive Färbung der Cryoschnitte auf MIF, CXCL5 und CCL2. In der jeweiligen Überlagerung ist zu erkennen, dass die sezernierten Chemokine in direkter Nähe zu den Perizyten zu finden sind.

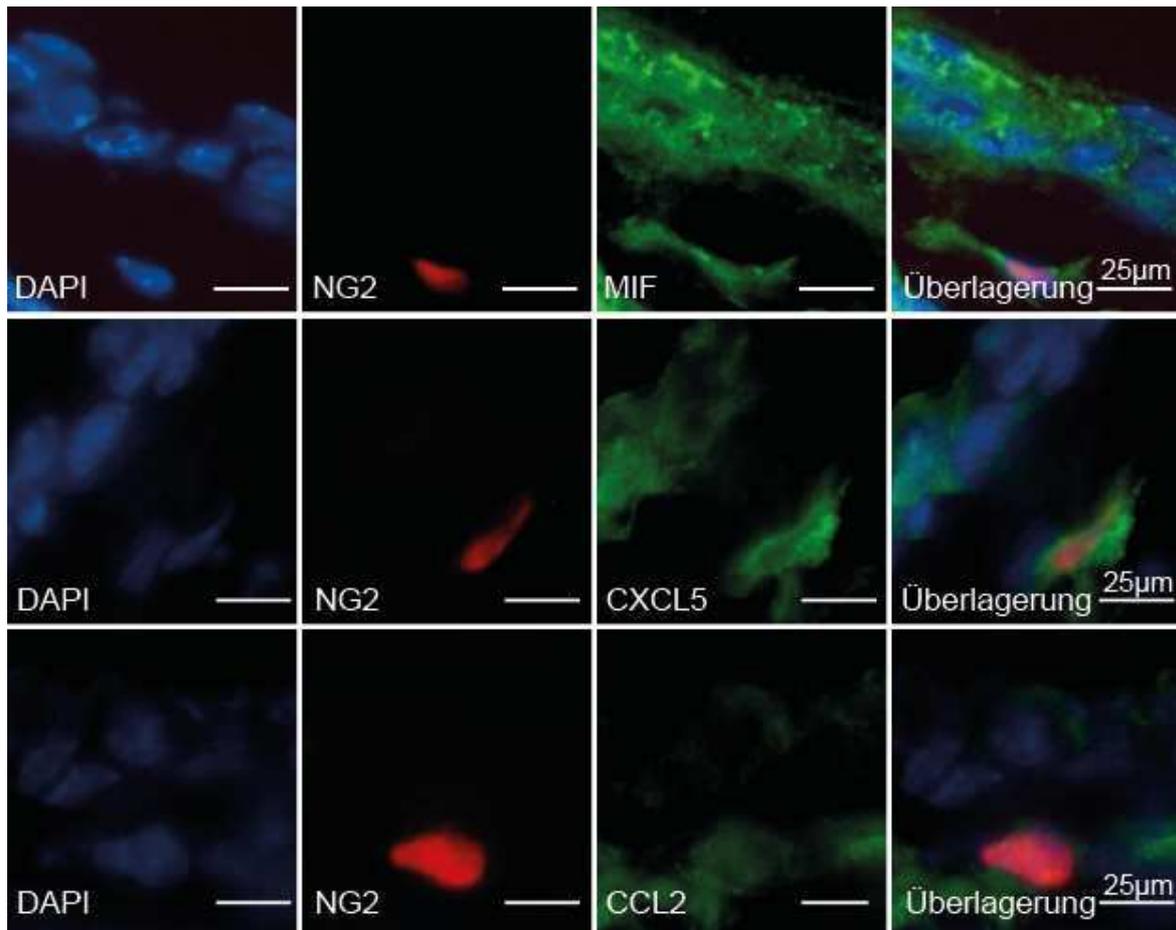


Abbildung 29: Immunhistochemische Darstellung von Chemokinen in murinem Ohrgewebe

Übersicht über die immunhistologischen Färbungen von murinem Ohr nach Injektion von TNF- α (100ng/ml, 6h) für die Chemokine MIF, CXCL5 und CCL2; Zellkernfärbung (DAPI), Fluoreszenz der NG2⁺ Perizyten (rot), Färbung für das jeweilige Chemokin (grün) und rechts Überlagerungen der Bilder; repräsentativ aus mindestens n=3 Färbungen

7 Interaktion von Perizyten mit myeloiden Zellen *in vivo*

7.1 Ungerichtete Migration bei Injektion von fMLP bzw. TNF- α

Da die *in vitro* Versuche gezeigt haben, dass Perizyten über eine Vielzahl von Chemokinen die Migration von myeloiden Leukozyten beeinflussen, Adhäsionsmoleküle exprimieren und eine anti-apoptotische sowie aktivierende Wirkung auf neutrophile Granulozyten haben, wurde zuletzt untersucht, ob es zur Interaktion von Perizyten und Leukozyten auch *in vivo* kommt. Visualisiert wurde dies in NG2DsRed-LysMeGFP und NG2DsRed-CX₃CR1eGFP Knochenmarks-Chimären, bei denen im Ohr eine sterile Inflammation induziert wurde. Diese

beiden Knochenmarks-Chimären dienen der Darstellung von Entzündungszellen (grün fluoreszierend) und Perizyten (rote Fluoreszenz).

Mittels des Ohrmodells und des 2-Photonen Mikroskops ist eine genaue Analyse der Zellmigration *in vivo* über einen längeren Zeitraum möglich. Dabei wurde untersucht, ob es *in vivo* zu einer Interaktion von myeloiden Leukozyten mit Perizyten kommt. Hierfür wurde eine sterile Inflammation durch Injektion von fMLP (5mM, siehe Abbildung 30) bzw. TNF- α (600 ng, siehe Abbildung 31) in das Ohr an fünf bis sechs Lokalisationen subkutan induziert, um die ungerichtete Migration myeloider Leukozyten und den Einfluss der Perizyten auf die interstitielle Migration dieser Zellpopulation zu untersuchen.

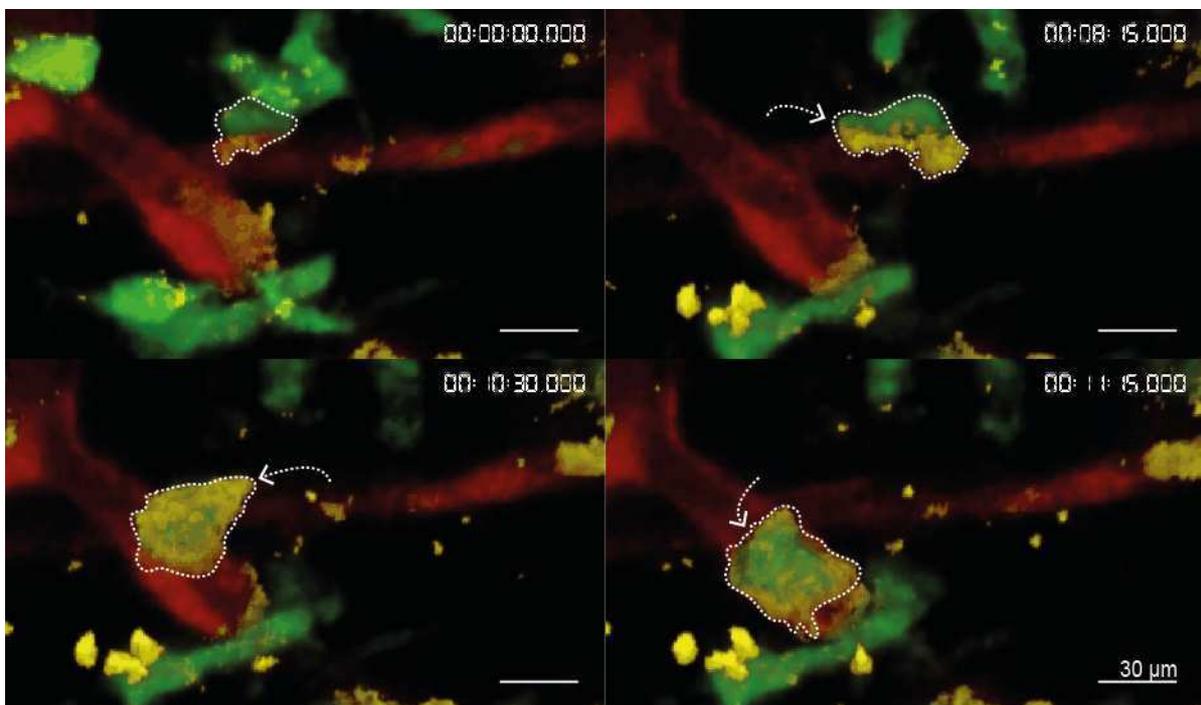


Abbildung 30: Ungerichtete Migration von neutrophilen Granulozyten nach fMLP-Injektion im Ohrgewebe der Maus *in vivo*

Migration und Interaktion eines neutrophilen Granulozyten mit Perizyten nach fMLP-Injektion (30 μ l, 5mM) im Ohrgewebe aufgenommen durch intravitale 2-Photonen Mikroskopie; Zeitserie der Interaktion eines neutrophilen Granulozyten (grün, weiß umrandet) mit Perizyten (rot); Kolokalisation (gelb) der Zellen, jeweils oben rechts die Zeitangabe; repräsentativ für mind n=3 Experimenten

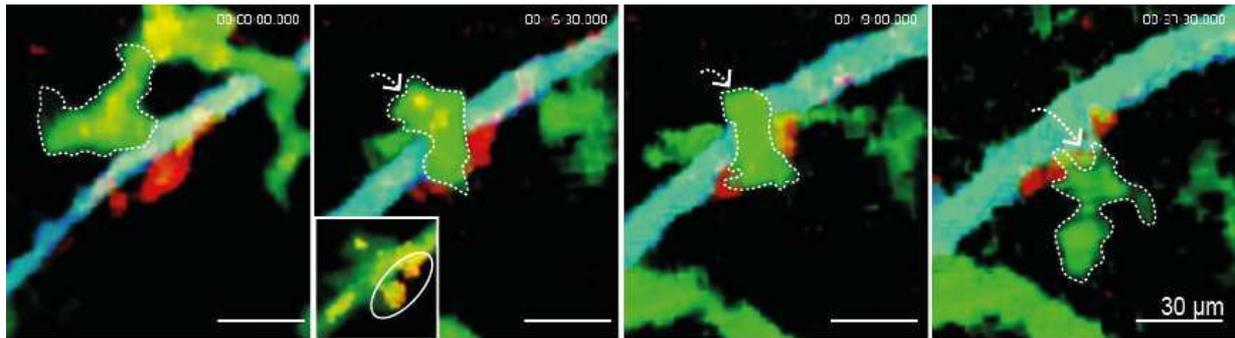


Abbildung 31: Ungerichtete Migration von Monozyten nach TNF- α -Injektion im Ohrgewebe der Maus

Interaktion eines Monozyten mit Perizyten nach TNF- α -Injektion (600 ng; 30 μ l) aufgenommen mittels intravitraler 2-Photonen Mikroskopie; Zeitserie der Interaktion eines Monozyten (grün, weiß umrandet) mit einem Perizyten (rot), Kolokalisation (gelb); farblich abgesetzt Blutgefäß (türkis); repräsentativ für n=3 Experimente

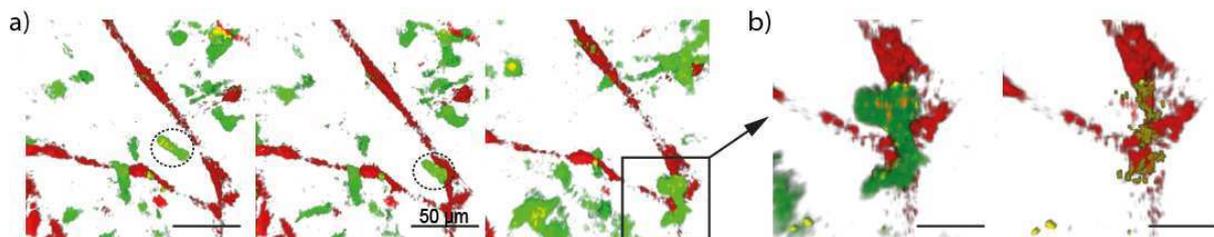


Abbildung 32: Polarisierte Migration und Interaktion eines neutrophilen Granulozyten mit einem Perizyten

Migration und Interaktion eines neutrophilen Granulozyten aufgenommen mittels intravitraler 2-Photonen Mikroskopie im Ohrgewebe **a)** Polarisierung eines neutrophilen Granulozyten (umrandet) bei der Migration in Richtung des Perizyten; **b)** Interaktion eines neutrophilen Granulozyten mit einem Perizyten, daneben exakte Darstellung der Kolokalisationsfläche (gelb); repräsentativ für n=3 Experimente

In den Abbildungen 30 bis 32 wird verdeutlicht, dass es sowohl zwischen Monozyten als auch neutrophilen Granulozyten und Perizyten *in vivo* zu dynamischen Interaktionen kommt, die teilweise mehrere Minuten andauern. Außerdem fällt auf, dass die neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei der Interaktion sehr polarisiert sind, was auf einen haptotaktischen Stimulus hinweist (Abbildung 32).

Weiterhin wurde analysiert, ob die Interaktion der Perizyten mit myeloiden Leukozyten das Geschwindigkeitsprofil der interstiellen Migration beeinflusst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

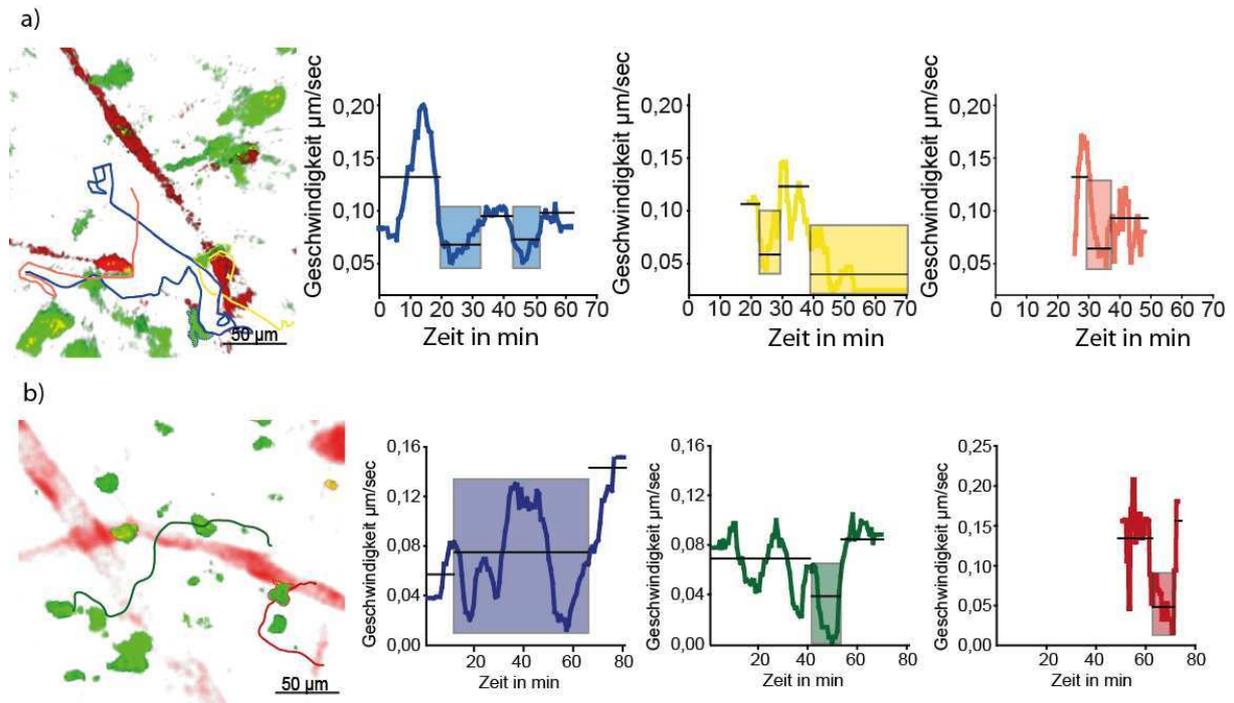


Abbildung 33: Migrationsmuster und Geschwindigkeitsprofil migrierender myeloider Zellen

Ungerichtete Migration von **a)** neutrophilen Granulozyten nach fMLP-Injektion (30 µl, 5mM) und **b)** Monozyten nach TNF- α -Injektion 30 µl, 600ng); jeweils links Verfolgen (Tracking) der Migration von neutrophilen Granulozyten bzw. Monozyten; rechts: Darstellung der Geschwindigkeitsprofile dieser Zellen; dabei sichtbar die Geschwindigkeiten vor, während und nach Interaktion mit Perizyten. Die neutrophilen Granulozyten (a) erhöhen zunächst ihre Geschwindigkeit, werden bei Interaktion (farblich unterlegte Fläche) langsamer und erhöhen ihre Geschwindigkeit erneut nach Interaktion, allerdings nicht auf den Wert vor Interaktion. Treten sie in Kontakt mit einem weiteren Perizyt verlangsamt sich ihre Geschwindigkeit erneut. Bei den Monozyten (b) ist die Geschwindigkeit nach Interaktion leicht erhöht. Die Durchschnittswerte dieser Geschwindigkeiten ist durch die schwarzen Balken markiert; repräsentativ für mindestens n=3

Hier ist erkennbar, dass es während der Interaktion der myeloiden Zellen mit den Perizyten zu einer Verlangsamung der Migration kommt, was auf eine adhäsive Interaktion dieser Zelltypen schließen lässt. Außerdem weist der Verlauf der Geschwindigkeit eine deutliche Beschleunigung vor der Interaktion mit den Perizyten auf. Da es vor Interaktion auch zu einer deutlichen Polarisierung der Leukozyten kommt, lässt dies auf einen chemotaktischen und haptotaktischen Stimulus durch die Perizyten schließen.

7.2 Gerichtete Migration bei Laser-Verletzung

Nachdem sich gezeigt hatte, dass es bei ungerichteter Migration zur Interaktion von myeloiden Leukozyten mit Perizyten kommt, wurde nachfolgend untersucht, ob es auch bei gerichteter interstitieller Migration zu einer Interaktion kommt. Dabei wird mittels des integrierten Lasers eine sterile Verletzung gesetzt (siehe Abbildung 34). Die entstehende fokale Nekrose spiegelt die physiologischen Prozesse bei einer sterilen Inflammation wider und führt zu einer gerichteten Migration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten zum Ort der Entzündung.

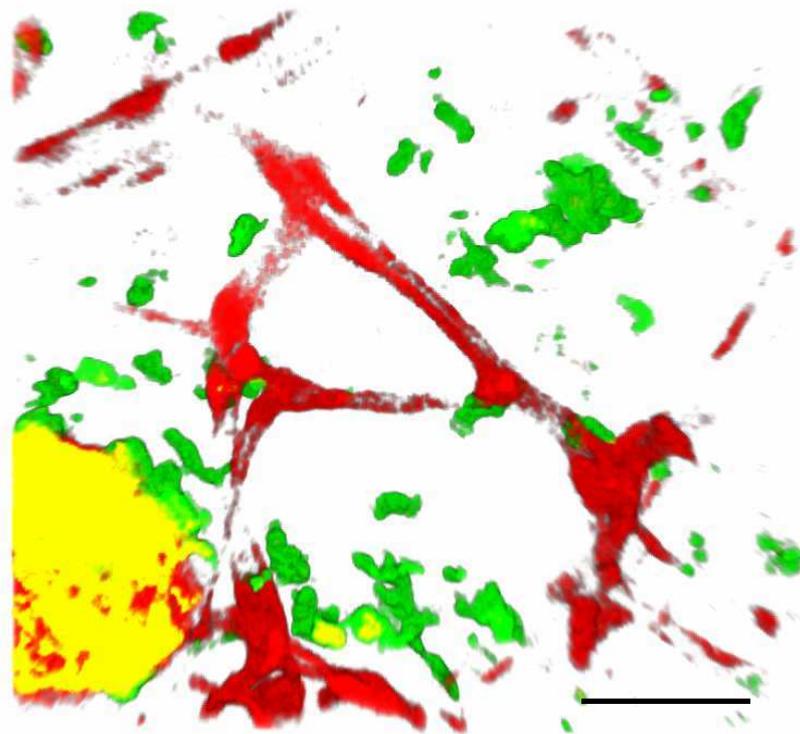


Abbildung 34: Laser-Verletzung bei einer NG2DsRed-LysMeGFP Chimären *in vivo*

2-Photonen-Aufnahme zur Darstellung der Situation nach Generierung einer lokalen Nekrosezone (gelb) mittels des Laser des 2-Photonen-Mikroskops; in diesem Standbild aus einem dreidimensionalen Video ist die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (grün) nachfolgend auf eine sterile Inflammation visualisiert; Entzündungszellen bahnen sich ihren Weg durch das Interstitium zur Nekrose (gelb); einige Zellen interagieren mit Perizyten (rot), nachfolgend sammeln sich diese Zellen um den Nekroseherd an. Maßstab = 100µm; repräsentativ aus mindestens n=3 Experimenten

Hierbei zeigt sich, dass es zu einer Interaktion der myeloiden Leukozyten mit Perizyten kommt und dass die Leukozyten teilweise entlang der Perizyten zur Nekrosezone migrieren. Auch hierfür wurden einzelne Zellen verfolgt, sowohl bei den neutrophilen Granulozyten als auch bei den Monozyten und daraus Geschwindigkeitsprofile erstellt (siehe Abbildung 35).

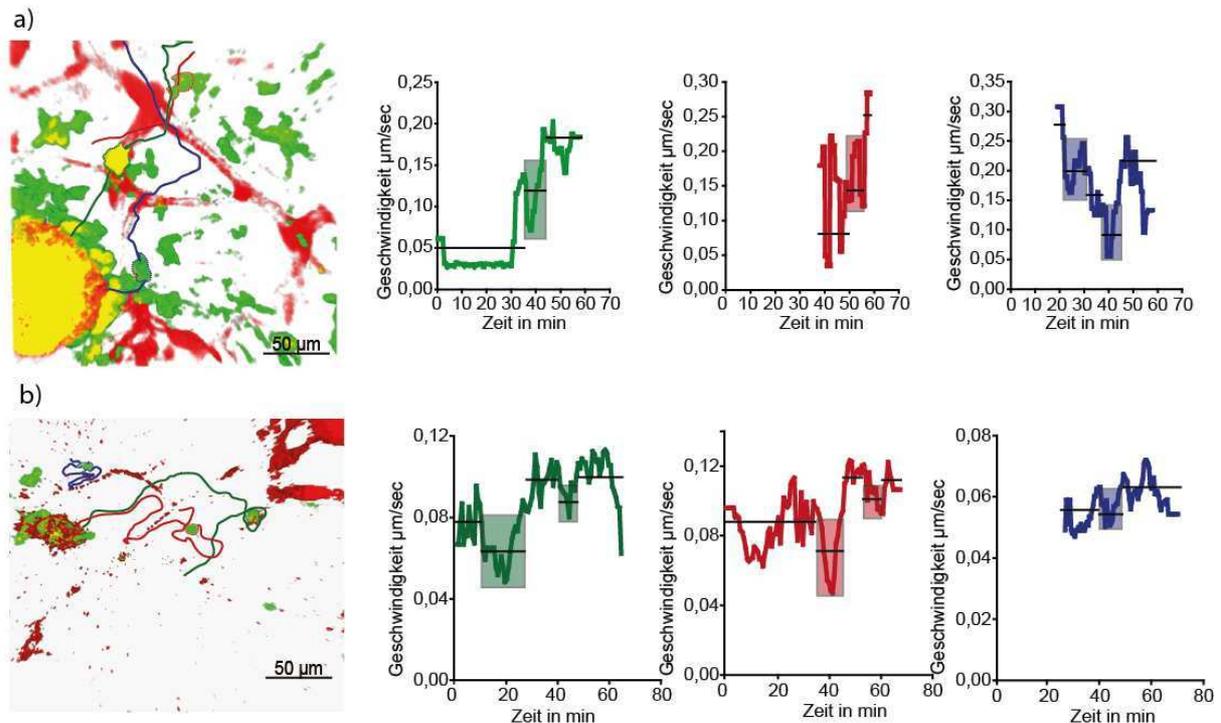


Abbildung 35: Geschwindigkeitsprofile neutrophiler Granulozyten und Monozyten nach Laser Verletzung

Darstellung der gerichteten Migration von **a)** neutrophilen Granulozyten und **b)** Monozyten nach einer Laser Verletzung; jeweils links: Tracking der Migration von 3 neutrophilen Granulozyten bzw. Monozyten; rechts: Darstellung der Geschwindigkeitsprofile dieser Zellen; dabei sichtbar die Geschwindigkeiten vor, während (farblich unterlegte Flächen) und nach Interaktion mit Perizyten. Die Zellen weisen zunächst eine niedrige Geschwindigkeit auf und werden nach Interaktion schneller. Treten sie in Kontakt mit einem weiteren Perizyten verlangsamt sich ihre Geschwindigkeit erneut. Die Durchschnittswerte dieser Geschwindigkeiten ist durch die schwarzen Balken markiert; repräsentativ für mindestens $n=3$ Experimenten

Im Geschwindigkeitsprofil fällt zum einen auf, dass die Zellen während der Interaktion langsamer sind als während der freien Migration. Zum anderen sind die Leukozyten nach Interaktion schneller als vor Interaktion, was auf eine Aktivierung durch die Interaktion mit den Perizyten schließen lässt.

Dieses Geschwindigkeitsprofil unterscheidet sich also von dem bei ungerichteter Migration.

Zusammenfassend kann hier mittels intravitaler 2-Photonen Mikroskopie gezeigt werden, dass es zu einer Interaktion zwischen Perizyten und myeloiden Leukozyten kommt. Diese Interaktion beeinflusst die interstitielle Migration abhängig davon, ob ein Stimulus für gerichtete oder ungerichtete Migration vorliegt. Bei letzterer ist eine chemotaktische Orientierung der Leukozyten zu den Perizyten zu beobachten. Bei der gerichteten Migration ist zudem eine Beschleunigung der Migrations-Geschwindigkeit nach Interaktion zu sehen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es während der interstitiellen Migration *in vivo* zu adhäsiven Interaktionen zwischen Perizyten und myeloiden Leukozyten kommt und dass diese Interaktion das Geschwindigkeitsprofil der Leukozyten beeinflusst.

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden als Poster mit dem Titel „Pericytes sense and react to sterile inflammation“ beim Scientific Retreat des SFB 914 auf Schloß Ringberg vorgestellt (26.-29.02.2012).

VI Diskussion

1 Wahl der Mauslinien

Für diese Arbeit wurde die Maus als Versuchstier verwendet, sowohl für die *in vivo* Versuche als auch *ex vivo* für die immunhistologischen Untersuchungen. Die Maus eignet sich vor allem aufgrund der Verfügbarkeit transgener Tiere sowie der möglichen Kombination ihrer Eigenschaften durch die Generierung von Knochenmarks-Chimären. Diese finden Anwendung in der Intravitalmikroskopie mittels des 2-Photonen Mikroskops. Ebenso sind die schnellen Generationszeiten, kostengünstige Haltung und meist problemlose Aufzucht von Vorteil. Da die 2-Photonen Mikroskopie durch die Dicke des zu untersuchenden Gewebes begrenzt ist, ist die Maus durch ihre geringe Größe sehr gut geeignet.

Bei den NG2DsRed-Mäusen exprimieren die NG2 (Proteoglycan Neuron-Glial Antigen 2) positiven Zellen DsRed und fluoreszieren in rot. NG2 wird entlang aller Arteriolen und Kapillaren, nicht jedoch entlang von Venolen exprimiert. Dort wird es ausschließlich bei Angiogenese exprimiert⁶². Diese Tatsache erschwert die *in vivo* Darstellung der Perizyten, da nur die NG2⁺ Perizyten der Arteriolen und Kapillaren darstellbar sind und keine Aussage über das Verhalten der Perizyten auf Venolen und Venen getroffen werden kann.

Um die myeloiden Zellen mittels grüner Fluoreszenz darstellen zu können, wurden die transgenen Linien LysM-eGFP²⁶ und CX₃CR1-eGFP⁴⁶ verwendet. Bei LysM-eGFP Mäusen ist bekannt, dass 98% der grün-fluoreszierenden Zellen neutrophile Granulozyten ausmachen und es sich nur bei 2% um Monozyten handelt²⁶. Damit ist sichergestellt, dass es sich bei den betrachteten Zellen nahezu ausschließlich um neutrophile Granulozyten handelt, der geringe Anteil an Monozyten ist vernachlässigbar klein. Bei den CX₃CR1-eGFP Mäusen fluoreszieren alle Zellen, die den Rezeptor CX₃CR1 exprimieren, in grün. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Monozyten aber es fluoreszieren auch einige wenige dendritische Zellen⁴⁶.

2 Wahl des Ohrmodells für die 2-Photonen Mikroskopie

Um eine sterile Inflammation zu generieren und dies mittels Intravitalmikroskopie visualisieren zu können, wird ein Gewebe benötigt, das bei geringer Gewebedicke leicht zugänglich und immobilisierbar ist. Dafür bietet sich zum einen das Cremastermodell an zum anderen das Ohrmodell. Bei ersterem wird der Musculus cremaster für Untersuchungen frei präpariert. Allerdings ist dieser Eingriff wesentlich invasiver und nicht ganz ohne

begleitende Entzündungsreaktionen durchzuführen⁵⁰. Da eine sterile Inflammation induziert werden sollte, fiel die Entscheidung auf das Ohrmodell. Dabei wird das Ohr an nur wenigen Stellen durch kleine Nadeln fixiert, eine größere oder generalisierte Entzündungsreaktion bleibt aus. Die Mikrozirkulation am Ohr ist leicht darstellbar, da das Ohr der Maus sehr dünn ist und keine anderen Gewebe entfernt werden müssen. Um lokal begrenzt eine sterile Entzündungsreaktion hervorzurufen, wurden zum einen mittels des Lasers eine fokale Nekrose generiert und zum anderen an mehreren Lokalisationen chemotaktisch wirkende Substanzen (fMLP und TNF- α) ins Ohr injiziert.

Unter Verwendung dieser Methoden kann sowohl die gerichtete als auch die ungerichtete interstitielle Migration myeloider Zellen *in vivo* untersucht werden. Dies ist für die intravitale Untersuchung der Leukozytenmotilität besser geeignet als die systemische Gabe proinflammatorischer Substanzen. Hierbei würde eine generalisierte Entzündung entstehen und nicht der gewünschte lokal begrenzte Gradient zwischen Blut und Gewebe.

3 Wahl der humanen Perizyten für die *in vitro* Versuche

Für die *in vitro* Versuche wurden humane Perizyten verwendet, wodurch zusätzlich zu den Daten des murinen Modells, auch Aussagen über das humane System getroffen werden können. Zudem ist es sehr schwierig, Perizyten aus murinem Gewebe in ausreichender Reinheit und Quantität zu isolieren und zu kultivieren. Ein weiterer Entscheidungsgrund für die Wahl der humanen Perizyten war die Tatsache, dass dabei auch mit humanen neutrophilen Granulozyten und Monozyten gearbeitet werden kann. Eine Isolation aus humanem Blut ist wesentlich einfacher durchzuführen und die benötigte Zellzahl ist leichter zu gewinnen. Eine Isolation von murinen myeloiden Zellen ist weitaus aufwändiger, da das zirkulierende Blutvolumen zu gering ist und die darin enthaltenen Zellen für die Versuche nicht ausreichen würden. Die Isolierung humaner myeloider Zellen ist aus diesen Gründen zu bevorzugen.

4 Diskussion der Ergebnisse

An akuten Entzündungsreaktionen sind eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen beteiligt. Gegenstand intensiver Untersuchungen war bisher vor allem die Interaktion von Endothelzellen mit unterschiedlichen Subpopulationen von Leukozyten. Die Abläufe nach der Transmigration durch die Endothelschicht und vor allem die interstitielle Migration wurden allerdings bisher kaum untersucht. Ebenso ist weitgehend unbekannt, welche Rolle

mesenchymale Zellen wie Perizyten bei akuten Entzündungsreaktionen spielen und ob sie mit Immunzellen in Kontakt treten. Die vorliegende Arbeit untersuchte daher die Rolle von Perizyten bei steriler Inflammation anhand verschiedener *in vitro* Assays und darüber hinaus mittels intravitaler 2-Photonen Mikroskopie in der Maus. Dabei zeigte sich, dass Perizyten ein umfangreiches Repertoire an Rezeptoren für inflammatorische Reize exprimieren. Auf Stimulation dieser Rezeptoren reagieren sie mit der vermehrten Expression von NLRP3, was die Ausschüttung von Chemokinen und die Präsentation von Adhäsionsmolekülen auf ihrer Oberfläche zur Folge hat. Dadurch werden neutrophile Granulozyten und Monozyten *in vitro* und *in vivo* aktiv zu Perizyten rekrutiert und interagieren mit diesen. Diese Interaktion wiederum führt einerseits zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und hat andererseits eine anti-apoptotische Wirkung auf myeloide Zellen. Damit kann hier erstmalig *in vivo* gezeigt werden, dass Perizyten aktiv zur Entzündungsreaktion beitragen und die Rekrutierung sowie interstitielle Migration von Zellen des angeborenen Immunsystems beeinflussen.

4.1 Perizyten detektieren Reize steriler Inflammation

Die Versuche zeigten, dass Perizyten Rezeptoren für die Erkennung von Inflammationsreizen exprimieren und somit auf Entzündungsmediatoren sowohl bei infektiöser als auch bei steriler Inflammation reagieren können. Dies wurde bisher noch nicht für Perizyten beschrieben, sondern ist vor allem für Immunzellen charakteristisch.

Um die Rezeptorenausstattung der Perizyten zu untersuchen, wurden rt-PCRs für Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs) durchgeführt, welche damage-associated molecular patterns (DAMPs) detektieren⁹¹. Unter den positiven Resultaten sind die Rezeptoren für fMLP (FPR2), TNF- α (TNFR1) und ATP (NLRP3) zu finden. Ebenso werden die beiden Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 von Perizyten exprimiert, welche auf mehrere DAMPS, wie HMGB1 und HSPs, und LPS reagieren. Auch können Reize von nekrotischen Zellen durch diese PRRs erkannt werden. Bei den rt-PCRs wurden negative Ergebnisse bei TLR9, FPR1 und FPR3 gefunden.

Diese Ergebnisse belegen, dass nicht nur Immun- und Endothelzellen, sondern auch Perizyten auf sterile inflammatorische Reize reagieren können, da sie die dafür benötigten Rezeptoren besitzen. Von Brandau et al. wurde gezeigt, dass bei mesenchymalen Stammzellen die Expression von Chemokin-Rezeptoren bei Stimulation mit Endotoxinen induziert wird¹³. Da Perizyten aus diesen Zellen hervorgehen können, deckt sich diese Aussage mit den vorliegenden Ergebnissen.

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sind die typischen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und können sowohl durch exogene als auch durch endogene Stimuli zu einer sterilen Inflammation führen³⁷. Als Liganden für TLR4 sind LPS und HMGB-1 bekannt, welche wichtige Mediatoren bei sterilen wie nicht-sterilen Entzündungsprozessen sind³⁷. Durch eine Aktivierung von TLR4 wird die Produktion der Zytokine TNF- α und IL6 sowie des Zytokins IL8 durch Monozyten und Makrophagen stimuliert^{40,92}. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit interessanterweise auch für Perizyten gezeigt werden, wobei keine Expression von TNF- α nachgewiesen wurde. TLR2 kann neben HMGB-1 auch Heat Shock Proteine binden, was zur Sekretion diverser proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen und dendritischen Zellen führt⁹¹. Reize, die von fMLP ausgehen, werden für gewöhnlich über den Rezeptor FPR1 wahrgenommen. Dieser wird allerdings, wie aus den vorliegenden Ergebnissen ersichtlich, nicht von den Perizyten exprimiert. Positive Ergebnisse wurden dagegen für den Rezeptor FPR2 gefunden, der ebenfalls fMLP als Ligand erkennt.

Ebenso wird durch die Ergebnisse belegt, dass das Inflammasom NLRP3 in Perizyten hochreguliert wird. Dies ist in diesem Zusammenhang ein neu detektierter Mechanismus auf sterile Inflammationsreize zu reagieren. NLRP3 wird durch diverse DAMPs wie etwa ATP aktiviert und kann anschließend über Caspase-1 eine Signalkaskade auslösen, die zur Produktion proinflammatorischer Zytokine führt^{9,30}. Perizyten können dadurch Gewebeschädigung erkennen und darauf reagieren.

Zusammenfassend wird durch die Versuche belegt, dass Perizyten (1) Rezeptoren für sterile Stimuli (DAMPs) besitzen und dass deren Expression durch Stimulation erhöht werden kann; (2) durch Entzündungsmediatoren auf inflammatorische Reize sensibilisiert werden und einen proinflammatorischen Phänotyp annehmen; (3) Perizyten Toll-like Rezeptoren exprimieren, was bisher vor allem für Immunzellen beschrieben war.

4.2 Perizyten reagieren auf inflammatorische Reize mit Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen

In den darauf folgenden Versuchen wurde nachgewiesen, dass Perizyten im Anschluss an die Stimulation der oben genannten Rezeptoren mit der vermehrten Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen reagieren. Auch zeigte sich, dass murine NG2⁺ positive Zellen *in situ* nach Stimulation mit TNF- α eine Vielzahl von Chemokinen und das Adäsionsmolekül ICAM-1 an ihrer Oberfläche exprimieren, also einen proinflammatorischen Phänotyp annehmen. Dieses Adhäsionsmolekül ermöglicht es Perizyten mit myeloiden Zellen während

der interstitiellen Migration zu interagieren⁵⁰. Somit tragen Perizyten als Teil der Adhäsionskaskade zur Rekrutierung von Entzündungszellen bei.

Im Hinblick auf die Chemokine lässt sich anhand der ELISA-Ergebnisse ableiten, dass die für neutrophilen Granulozyten spezifischen Chemokine, wie CXCL1 schon nach sechs Stunden, die Monozyten-spezifischen Chemokine, wie CCL2, erst nach 24 Stunden hochreguliert bzw. sezerniert werden. Somit werden die Chemokine für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zeitlich vor den monozyten-rekrutierenden Chemokinen ausgeschüttet. Dies passt zur Theorie des „second wave“, wonach Monozyten erst nachfolgend auf neutrophile Granulozyten am Ort der Entzündung eintreffen^{86,87}. Auch sichtbar ist, dass fMLP zunächst die Bildung der neutrophilen-spezifischen Chemokine CXCL1 und IL8 sowie MIF fördert, während es später deren Expression inhibiert. Dies könnte dazu beitragen, dass bei akuten Entzündungsreaktionen zunächst neutrophile Granulozyten und erst verzögert Monozyten in das betroffene Gewebe rekrutiert werden und die dafür benötigten Chemokine demnach zunächst für neutrophile Granulozyten und später für Monozyten hochreguliert werden.

Für die Stimulation der Perizyten wurde im Zuge dieser Arbeit zusätzlich nekrotisches Zelllysate verwendet. Dieses enthält ein komplexes Gemisch diverser Signalstoffe und wirkt direkt stimulierend auf die proinflammatorische Zytokin- und Chemokin-Produktion der Monozyten und Makrophagen. Nekrotisches Zelllysate führt bei diesen Zelltypen zur erhöhten Sekretion von TNF- α , IL-6 und IL-8⁵⁴. Mezayen et al. zeigten, dass die DAMPs HMGB1 und HSP70 in nekrotischem Zelllysate vorhanden sind und für die signifikante Induktion der proinflammatorischen Zytokinexpression verantwortlich sind²⁴. HSPs und HMGB1 können die Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch die Rezeptoren TLR2 und TLR4 induzieren⁹³. Die Untersuchungen von Mezayen et al. zeigten auch, dass der Zelluntergang während einer Inflammation endogene Signale für das Immunsystem zugänglich macht, die eine inflammatorische Antwort amplifizieren und verlängern²⁴. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass nicht nur Zellen des Immunsystems, sondern auch Perizyten auf Faktoren aus nekrotischen Zellen reagieren und so zur sterilen Entzündungsreaktion beitragen.

4.3 Perizyten sezernieren Faktoren, die chemotaktisch, anti-apoptotisch und aktivierend auf myeloide Zellen wirken

Darauf aufbauend stellte sich im Anschluss die Frage, ob diese von den Perizyten exprimierten Chemokine einen chemotaktischen Reiz auf myeloide Zellen ausüben und somit zu deren Rekrutierung beitragen können. Darüber hinaus wurde die anti-apoptotische und aktivierende Wirkung von Perizyten auf myeloide Zellen analysiert.

Die Chemotaxis Assays zeigten, dass die von den Perizyten sezernierten Chemokine zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten führen, was vor allem über IL-8, MIF und CCL2 vermittelt wird. Daraus kann geschlossen werden, dass Perizyten einen verstärkenden Zwischenschritt für die Rekrutierung von myeloiden Zellen darstellen, indem sie auf proinflammatorische Reize reagieren und nachfolgend durch die Sekretion von Chemokinen zu einer Rekrutierung von Entzündungszellen führen. Die Perizyten nützen ihre strategische Lage zwischen dem Interstitium und der Mikrozirkulation und vermitteln zwischen den zirkulierenden myeloiden Zellen und interstitiellen Inflammationsreizen. Für mesenchymale Stammzellen ist bereits beschrieben, dass diese nach Stimulation mit dem Endotoxin LPS die Motilität von neutrophilen Granulozyten induzieren und neutrophile Granulozyten auf eine IL-8 und MIF-abhängige Art *in vitro* rekrutieren können¹³. Die Abgrenzung von mesenchymalen Stammzellen und Perizyten ist allerdings fließend, sodass diese Ergebnisse die gezeigten Befunde unterstützen.

Die Ergebnisse belegen ebenfalls, dass sowohl bei neutrophilen Granulozyten als auch bei Monozyten die Neutralisation von MIF durch den MIF-Antagonisten ISO-1 zu einer signifikanten Verminderung der Chemotaxis führt. Daraus lässt sich schließen, dass MIF eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung der myeloiden Zellen zum Ort der Entzündung spielt. Dies wurde schon bei Bernhagen et al. beschrieben, wo MIF eine Hauptrolle bei akuter Inflammation zugesprochen wird¹². Zudem fällt auf, dass MIF konstitutiv auf einem hohen Niveau von Perizyten exprimiert und in zytoplasmatischen Vesikeln gespeichert wird. Viele Zelltypen bilden konstitutiv MIF aber nur sehr wenige Zelltypen, wie Makrophagen und einige Endothelzellen, sind in der Lage MIF zu sezernieren¹⁰. Hier kann gezeigt werden, dass auch Perizyten nach Stimulation mit inflammatorischen Reizen in der Lage sind, MIF zu sezernieren und an ihrer Oberfläche zu präsentieren. Dies geschieht über zwei unterschiedliche Mechanismen: zum einen bindet der Rezeptor CD74 MIF an der Oberfläche von Perizyten, zum anderen wird MIF über die Exozytose von Vesikeln zugänglich gemacht, die mit der äußeren Zellmembran assoziiert sind. Dies führt zur chemotaktischen (durch

Sekretion von MIF) und haptotaktischen (durch Präsentation von MIF an der Zelloberfläche) Wirkung von MIF auf myeloide Zellen. Letzteres wird durch die Bindung von MIF an CXCR2 und CXCR4 auf Leukozyten vermittelt, was die Adhäsion von myeloiden Zellen auf Perizyten zur Folge hat¹². Weiterhin bewirkt MIF die Aktivierung myeloider Zellen, die Produktion proinflammatorischer Zytokine und besitzt eine anti-apoptotische Wirkung¹⁵. Diese Effekte konnten hier auch für von Perizyten sezerniertes MIF gezeigt werden. Folglich lassen die Resultate darauf schließen, dass Perizyten durch die Sekretion und Präsentation von MIF sowohl einen chemotaktischen als auch einen haptotaktischen Einfluss auf Leukozyten ausüben können. Des Weiteren haben sie eine funktionelle Wirkung auf diese Zellen.

Brandau et al. beschreiben einen komplexen, funktionellen Zusammenhang zwischen gewebeansässigen mesenchymalen Stammzellen und neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes. In der Arbeit wird eine Rolle der mesenchymalen Stammzellen in der frühen Phase der Entzündungsreaktion vermutet, zu einem Zeitpunkt also, an dem klassische Immunzellen noch nicht rekrutiert wurden¹³. Einige Studien stellen die Behauptung auf, dass mesenchymale Stammzellen Funktionen mit angeborenen Immunzellen teilen⁸⁸. Diese Funktionen beinhalten die Sekretion von Chemokinen und immunmodulatorischen Mediatoren, chemokin-regulierte Migration und die Expression von Oberflächenmolekülen für die Interaktion mit verschiedenen Leukozytensubtypen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ubiquitär vorkommenden Perizyten genau diese Aufgaben erfüllen, also als Sensoren für entzündliche Reize im Interstitium dienen und dadurch zu Entzündungsreaktion beitragen (siehe Abbildung 37).

Da Perizyten chemotaktisch auf myeloide Zellen wirken, wurde weiterhin untersucht, ob die von Perizyten sezernierten Faktoren einen Einfluss auf die Lebensdauer myeloider Zellen besitzen. Dabei zeigte sich, dass die Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten verlängert wird, nicht aber die der Monozyten. Dies wurde bisher von Raffaghello et al. nur für mesenchymale Stammzellen beschrieben. Sie beschreiben, dass die kurzlebigen neutrophilen Granulozyten durch Migration an die Stelle der Verletzung bzw. Infektion Überlebenssignalen ausgesetzt werden, die deren Lebensspanne verlängern⁷⁰. Auch ist von Makrophagen bekannt, dass sie über TNF- α die Apoptose von neutrophilen Granulozyten beeinflussen, wobei niedrige Konzentrationen an TNF- α die Zellen vor dem Absterben bewahren, wohingegen höhere Konzentrationen ihre Apoptose fördern⁹⁴. Da neutrophile Granulozyten aus dem interstitiellen Gewebe nicht mehr in das Blutsystem übertreten können,

ist ihre Funktionsdauer im extravaskulären Raum von anti-apoptischen Signalen abhängig, welche unter anderem von Perizyten sezerniert werden. Deshalb ist es möglich, dass über Zytokine die Lebensdauer erhöht wird und sie somit länger zur Phagozytose und Pathogenklärung beitragen können. Bei Monozyten zeigte sich jedoch kein Einfluss auf die Lebensdauer *in vitro*. Dies könnte daran liegen, dass Monozyten von sich aus wieder aus dem Gewebe zurück in das Blut- oder Lymphsystem wandern können und keine Reize oder Signale zur längeren Überlebensdauer benötigen.

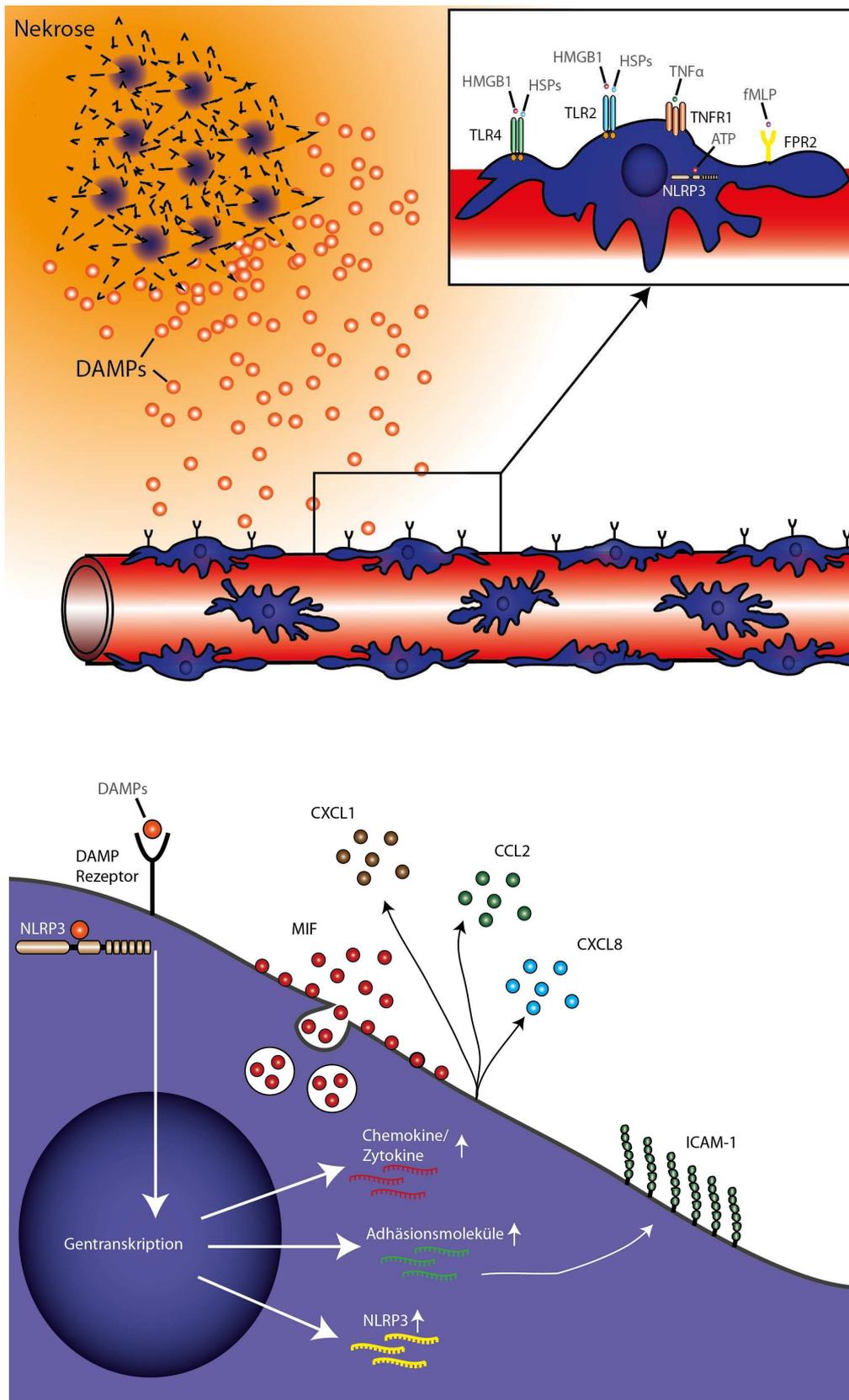


Abbildung 36: Übersicht über die zellulären und molekularen Mechanismen der Reaktion von Perizyten auf sterile Inflamationsprozesse

Schematische Darstellung der Rolle der Perizyten bei sterilem Inflammationsgeschehen. Die obere Abbildung zeigt die aus nekrotischen Zellen freigesetzten DAMPs und die von Perizyten exprimierten Rezeptoren; die untere Abbildung zeigt die im Anschluß daran sezernierten Chemokine und Adhäsionsmoleküle.

4.4 Perizyten interagieren *in vivo* mit myeloiden Zellen

Anschließend an diese Ergebnisse wurde untersucht, ob Perizyten auch *in vivo* mit myeloiden Zellen interagieren und zu deren Rekrutierung beitragen. Hier wurde nachgewiesen, dass es nach einem Entzündungsreiz, induziert durch die Injektion einer chemotaktisch wirkenden Substanz oder durch Generierung einer fokalen Nekrose durch Laser-Verletzung, zu einer Beeinflussung der interstitiellen Migration myeloider Zellen sowie zur Interaktion mit Perizyten kommt. Durch immunhistologische und konfokale Untersuchungen wurde gezeigt, dass Perizyten auf ihrer Oberfläche MIF präsentieren. Diese Präsentation könnte ganz entscheidend sein für die Interaktion der Zellen, da sowohl neutrophile Granulozyten als auch Monozyten von MIF angelockt werden. Ebenso spielen ICAM-1 und die sezernierten Chemokine einen entscheidenden Beitrag zu dieser Interaktion.

Bei den Versuchen mit lokaler Injektion chemotaktisch wirkender Substanzen erkennt man eine ungerichtete Migration der myeloiden Zellen. Fehlt ein zweiter Stimulus, wie z.B. eine zusätzliche Laser Verletzung, so bewegen sich die Zellen ungerichtet entlang der Perizyten und bevorzugt innerhalb des perivaskulären Compartments. Dabei wirkt fMLP als starkes Chemoattraktans auf neutrophile Granulozyten⁶⁹ und TNF- α auf Monozyten. FMLP wird aus den Mitochondrien nekrotischer Zellen freigesetzt und wirkt als starkes Endziel auf neutrophile Granulozyten und kann andere chemoattraktive Signale überragen²⁹. In den Versuchen wird deutlich, dass es zwischen den myeloiden Zellen und den Perizyten zu dynamischen Interaktionen kommt, die über einen längeren Zeitraum andauern. Ebenso fällt die Polarisierung der neutrophilen Granulozyten und Monozyten auf, was auf einen haptotaktischen Reiz durch die Perizyten schließen lässt.

In den Untersuchungen zu gerichteter Migration *in vivo* ist zu sehen, wie sich myeloide Zellen nachfolgend auf einen nekrotischen Reiz durch eine Laser-Verletzung den Weg zur Entzündung suchen. Da am Ort der Laser-induzierten Verletzung nekrotischer Zelluntergang entsteht, sind diese Aussagen stimmig mit McDonald et al., die zeigten, dass nekrotische Zellen zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führen⁵⁸. Dies konnte in unseren Versuchen auch für Monozyten gezeigt werden.

Dabei interagieren sie vor Eintreffen am Entzündungsherd mit den Perizyten. Sie verlangsamen ihre Geschwindigkeit und treten in Kontakt mit den Perizyten, was anhand der Kolokalisation dargestellt werden kann. Nachfolgend lösen sie sich wieder ab und setzen ihren Weg in Richtung Entzündung fort, wobei sie eine höhere Geschwindigkeit als vor der

Interaktion aufweisen. Perizyten tragen durch diese Interaktion zur Aktivierung der myeloiden Zellen bei und beschleunigen ihre Migration, was es diesen Immunzellen erlaubt schneller an den Ort der Gewebsverletzung zu gelangen.

Aus den angefertigten Geschwindigkeitsprofilen lässt sich erkennen, dass die myeloiden Zellen auf ihrem Weg unterschiedliche Geschwindigkeiten aufweisen, wie dies schon bei Friedl et al. beschrieben wurde³². Vor der Interaktion weisen sie eine niedrigere Geschwindigkeit als nach der Interaktion auf. Sie verlangsamen ihre Geschwindigkeit bei direktem Kontakt mit den Perizyten und weisen nachfolgend eine höhere Geschwindigkeit auf, was darauf schließen lässt, dass sie sich zielgerichteter bewegen.

Ebenso wird in den Experimenten deutlich, dass die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten in Wellen verläuft, was bereits in der Literatur beschrieben ist^{67,52}. Die vorliegenden Ergebnisse decken sich mit diesen Aussagen, dass zu Beginn eine kleine Anzahl an neutrophilen Granulozyten direkt zur Gewebsverletzung migrieren und sich dort in kleinen Clustern zusammenlagern. Nach dieser Phase, die circa 15 Minuten dauert, folgt eine Amplifikationsphase, in der eine große Anzahl an neutrophilen Granulozyten rekrutiert wird. Nach 30 bis 60 Minuten nach der Laser-Verletzung ist die Stabilisationsphase erreicht, in der die Anzahl der Zellen in dem Cluster relativ konstant bleibt⁶⁷. Diese Clusterbildung ist auch bei Kreisel et al. beschrieben⁵².

Bei den Knochenmarks-Chimären zur Untersuchung der Monozytenmigration fällt auf, dass diese erst nach vier bis sechs Stunden am Ort der Entzündung eintreffen. Dies passt mit den *in vitro* Ergebnissen überein, dass die Monozyten-spezifischen Chemokine erst später hochreguliert werden. Man erkennt *in vivo*, dass zunächst keine Zellmigration beobachtet werden kann. Erst nach mindestens vier Stunden sind die ersten Monozyten am Ort der Entzündung eingetroffen.

Die Migrationsmuster myeloider Zellen *in vitro* wurden bereits von Foxman et al. beschrieben²⁹. Darin findet man, dass sich Entzündungszellen ihren Weg durch komplexe chemotaktische Felder bahnen können. Sie reagieren zunächst auf einen chemotaktischen Reiz, können allerdings nachfolgend auf einen weiteren Reiz reagieren. Dies ist ebenfalls in den *in vivo* Untersuchungen zu sehen. Dort reagieren die Zellen zunächst auf die Chemotaxis durch die sezernierten Chemokine der Perizyten, setzen aber anschließend ihren Weg zur Laser-Verletzung fort, da diese ebenfalls einen Entzündungsreiz darstellt. Im Unterschied dazu sieht man, dass in den Versuchen, in denen keine Laser-Verletzung gesetzt wurde, die Zellen in der Nähe der Perizyten verharren oder entlang der Perizyten migrieren, wodurch

Perizyten ihre anti-apoptotische und aktivierende Wirkung auf neutrophile Granulozyten entfalten können. Die *in vivo* Versuche zeigen also, dass Perizyten eine Chemokin-Quelle darstellen und die Orientierung der Leukozyten im interstiellen Gewebe beeinflussen.

5 Ausblick

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass Perizyten mit der Ausschüttung von Chemokinen auf inflammatorische Reize reagieren, wäre es interessant auch *in vivo* zu untersuchen, wie sich der Einfluss inhibierender Moleküle, wie z.B. Antikörper, auf die Migration myeloider Zellen äußert. Um den Einfluss des Moleküls MIF weiter zu untersuchen, bietet sich hier die Verwendung von ISO-1 im Tiermodell an. Auch könnte die Erstellung transgener Tiere, bei denen MIF spezifisch in NG2⁺ Zellen ausgeknockt wurde, die intravitalen Mechanismen weiter aufklären.

Ebenso gilt es näher zu charakterisieren, ob Perizyten Leitstrukturen für myeloide Zellen darstellen, denen folgend myeloide Zellen ihren Weg zur Nekrose schneller finden. Dafür ist eine genauere Analyse der interstitiellen Interaktionsmuster notwendig. Weiterhin gilt es das Zusammenspiel von Perizyten mit Zellen des adaptiven Immunsystems genauer zu untersuchen.

VII Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Rolle der Perizyten bei steriler Inflammation. Bisher war in diesem Zusammenhang der Einfluss der Perizyten nicht bekannt, ebenso wenig ob und wie sie zu Entzündungsreaktionen beitragen. Weiterhin war der Einfluss der Perizyten auf die interstitielle Migration myeloider Zellen *in vivo* unerforscht.

Hier konnte gezeigt werden, dass Perizyten durch eine Vielzahl von Rezeptoren wie TLR2, TLR4, TNFR1, FPR2 in der Lage sind inflammatorische Reize zu detektieren und daraufhin einen proinflammatorischen Phänotyp annehmen. Dieser ist durch die vermehrte Expression von NLRP3 sowie des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und die Sekretion von Chemokinen wie CXCL1, IL8 und CCL2 gekennzeichnet. Weiterhin wird das Chemokin-ähnliche Molekül MIF von aktivierten Perizyten sowohl sezerniert als auch an der Oberfläche präsentiert. Die ausgeschütteten Chemokine beeinflussen wiederum Monozyten und neutrophile Granulozyten durch ihre chemotaktische Wirkung. Auch konnte ein anti-apoptotischer sowie aktivierender Effekt der Perizyten auf neutrophile Granulozyten gezeigt werden, was die Überlebensdauer dieser Zellen im interstitiellen Gewebe signifikant verlängert.

Anhand eines Mausmodells und der 2-Photonen Mikroskopie wurde gezeigt, dass Perizyten auch *in vivo* einen entscheidenden Beitrag zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten zur Inflammation leisten. Zum ersten Mal wurde die Interaktion myeloider Zellen mit Perizyten *in vivo* visualisiert und genauer charakterisiert. Diese Interaktion beeinflusst die interstitielle Migration neutrophiler Granulozyten und Monozyten abhängig davon, ob ein Stimulus für gerichtete oder ungerichtete Migration vorliegt. Es wurde deutlich, dass Perizyten sowohl einen chemotaktischen als auch einen haptotaktischen Reiz auf myeloide Leukozyten ausüben, was an einer Polarisierung der Zellen zu erkennen ist. Ebenso tragen sie durch die Interaktion zur Aktivierung der myeloiden Zellen *in vivo* bei.

Diese Arbeit leistet demnach einen Beitrag zur genaueren Definition der Rolle von Perizyten bei steriler Inflammation. Hierfür wurden die zellulären und molekularen Mechanismen *in vitro* und die *in vivo* ablaufenden Prozesse bei der interstitiellen Migration myeloider Zellen genauer charakterisiert. Dabei konnten Perizyten als neuer Zelltyp identifiziert werden, der Gewebeschäden detektiert und aktiv zur akuten Entzündungsreaktion beiträgt indem er die Rekrutierung und Funktionalität myeloider Leukozyten unterstützt.

VIII Summary

The role of pericytes in sterile inflammation

This dissertation examined the role of pericytes in sterile inflammation. So far it has not been investigated whether and how they contribute to sterile inflammatory processes. Similarly, the influence of pericytes on the interstitial migration of myeloid cells *in vivo* was unknown.

Here it is shown that pericytes are able to detect inflammatory stimuli by a variety of receptors such as TLR2, TLR4, TNFR1, FPR2 and to acquire a proinflammatory phenotype.

This phenotype is characterized by the increased expression of NLRP3, the adhesion molecule ICAM-1 and the secretion of chemokines such as CXCL1, IL8 and CCL2. Furthermore, the chemokine-like molecule MIF is both secreted by activated pericytes and presented on their surface. The secreted chemokines affect monocytes and neutrophils through its chemotactic effect. In addition, an anti-apoptotic and activating effect of pericytes on neutrophils could be demonstrated, which significantly prolongs the survival of these cells in the interstitial tissue.

Using the mouse model and the 2-photon microscopy it could be demonstrated that pericytes also provide a significant contribution to the *in vivo* recruitment of neutrophils and monocytes to inflammation. For the first time the interaction of myeloid cells with pericytes was visualized *in vivo* and characterized in more detail.

This interaction affects the pattern of interstitial leukocyte migration depending on whether a stimulus for directed or undirected migration exists. It became clear that pericytes exert both a chemotactic as well as a haptotactic stimulus to myeloid leukocytes, which is evidenced by a polarization of the cells before and during interaction with pericytes. Moreover, pericytes contribute to the activation of the myeloid cells *in vivo*.

Thus, this work provides a more accurate definition of the role of pericytes in sterile inflammation. For this, the cellular and molecular mechanisms *in vitro* and the processes during interstitial migration of myeloid cells *in vivo* have been characterized in more detail.

Together, we identified pericytes as a novel cell type, which detects tissue injury and actively participates in the inflammatory response by supporting the recruitment and functionality of myeloid cells.

IX Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Amino-Actinomycin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fa.	Firma
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
g	Erdschwerebeschleunigung
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HBSS	Hanks' Balanced Salt solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPA	High-Efficiency Particulate Air
ICAM-1	intrazelluläres Adäsionsmolekül-1
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IVC	individually ventilated cages

kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
kond.	konditioniert
LPS	Lipopolysaccharide
M.	Musculus (lat.)
mg	Milligramm
min	Minuten
mind.	mindestens
mM	millimolar
mm/s	Millimeter pro Sekunde
ml	Milliliter
ms	Millisekunde
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
µm	Mikrometer
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MHC	Major Histocompatibility Complex
NaCl	Natriumchlorid
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NZL	Nekrotisches Zelllysate
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PMN	Polymorphkernige neutrophile Leukozyten
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand 1
RNA	Ribonucleic Acid
rt-PCR	real-time PCR
s	Sekunde
s.c.	subkutan
Tab.	Tabelle
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor alpha

V.	Vena (lat.)
VAA	vollständig antagonisierbare Anästhesie
VLE RPMI	very low endotoxin RPMI-Medium
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

X Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammensetzung der Blutkapillaren	S. 09
Abbildung 2: Mechanismus der sterilen Inflammation	S. 13
Abbildung 3: Adhäsionskaskade	S. 14
Abbildung 4: Entwicklungsreihe der myeloiden Zellen	S. 16
Abbildung 5: Subtypen der Monozyten	S. 18
Abbildung 6: Übersicht über die bekannten Chemokine	S. 20
Abbildung 7: Migrationsmuster myeloider Zellen	S. 21
Abbildung 8: Energieniveaus von Elektronen	S. 51
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Erzeugung dreidimensionaler Videos	S. 52
Abbildung 10: Mikrochirurgisches Instrumentarium und benötigte Materialien zur Platzierung des Femoraliskatheter	S. 55
Abbildung 11: Operationsschritte zur Platzierung des Femoraliskatheter	S. 56
Abbildung 12: Strukturformel FITC-Dextran	S. 57
Abbildung 13: Vorrichtung für das Ohrmodell	S. 58
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbungen von Perizyten	S. 63
Abbildung 15: Expression von DAMP-Rezeptoren durch Perizyten	S. 64
Abbildung 16: Expression von Chemokinen durch Perizyten	S. 66
Abbildung 17: Expression des Adhäsionsmolekül ICAM-1 durch Perizyten	S. 67
Abbildung 18: Sekretion von Chemokinen durch Perizyten	S. 69
Abbildung 19: Präsentation von MIF an der Zelloberfläche von Perizyten	S. 71
Abbildung 20: Mobilisierung von MIF durch Perizyten nach Stimulation durch TNF- α	S.72
Abbildung 21: Expression der MIF-Rezeptoren CXCR4 und CD 74 durch Perizyten	S. 73
Abbildung 22: Chemotaktische Wirkung von Perizyten auf Monozyten und neutrophile Granulozyten	S. 75
Abbildung 23: Abbildung 23: Chemotaktische Wirkung von Perizyten durch IL-8, CCL2 und MIF	S. 77
Abbildung 24: Anti-apoptotische Wirkung von Perizyten auf Monozyten und neutrophile Granulozyten	S. 79
Abbildung 25: Aktivierende Wirkung von Perizyten auf neutrophilen Granulozyten	S. 80
Abbildung 26: Expression von NG2 und α -SMA durch mikrovaskuläre Perizyten	S. 81
Abbildung 27: Lokalisation der Perizyten am Blutgefäß	S. 82
Abbildung 28: Expression von ICAM-1 durch NG2 ⁺ Perizyten	S. 83

Abbildung 29: Expression von Chemokinen durch NG2 ⁺ Perizyten	S. 84
Abbildung 30: Ungerichtete Migration von neutrophilen Granulozyten nach fMLP-Injektion im Ohrgewebe der Maus	S. 85
Abbildung 31: Ungerichtete Migration von Monozyten nach TNF- α -Injektion im Ohrgewebe der Maus	S. 86
Abbildung 32: Polarisierte Migration und Interaktion eines neutrophilen Granulozyten mit Perizyten	S. 86
Abbildung 33: Migrationsmuster und Geschwindigkeitsprofil migrierender neutrophiler Granulozyten und Monozyten	S. 87
Abbildung 34: Laser Verletzung bei einer NG2DsRed-LysMeGFP Chimären <i>in vivo</i>	S. 88
Abbildung 35: Geschwindigkeitsprofile neutrophiler Granulozyten und Monozyten nach Laser Verletzung	S. 89
Abbildung 36: Übersicht über die zellulären und molekularen Mechanismen der Reaktion von Perizyten auf sterile Inflamationsprozesse	S. 99

XI Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper zur Immunfluoreszenz	S. 33
Tabelle 2: Antikörper für die konfokale Mikroskopie	S. 34
Tabelle 3: Verwendete Entzündungsmediatoren zur Herstellung Pellets stimulierter Perizyten	S. 36
Tabelle 4: Verwendete Entzündungsmediatoren zur Herstellung von konditionierten Medien und zur Gewinnung von Mediumüberstand für ELISA	S. 37
Tabelle 5: Verwendete Primer für real-time PCR	S. 39
Tabelle 6: Inhibitorische Antikörper und Antagonisten für Chemotaxis Assays	S. 43
Tabelle 7: Antikörper für Immunhistologie	S. 49
Tabelle 8: Dosierungen der vollständig antagonisierbaren Narkose (VAA)	S. 54
Tabelle 9: Antikörper für Whole Mount Staining	S. 60

XII Literaturverzeichnis

- 1 Data Sheet FITC Dextran. <http://www.piercenet.com/instructions/2162081.pdf>, Zugriff: 20.01.2012.
- 2 Andreeva ER, Pugach IM, Gordon D, Orekhov AN. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue Cell* 1998; 30: 127–135.
- 3 Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005; 97: 512–523.
- 4 Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu M, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson B, Betsholtz C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 2010; 468: 557–561.
- 5 Auffray C, Sieweke M, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 669–692.
- 6 Baez S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res* 1973; 5: 384–394.
- 7 Balabanov R, Beaumont T, Dore-Duffy P. Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. *J Neurosci Res* 1999; 55: 578–587.
- 8 Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000; 12: 1539–1546.
- 9 Bauernfeind F, Horvath G, Stutz A, Alnemri E, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks B, Fitzgerald K, Hornung V, Latz E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009; 183: 787–791.
- 10 Baugh JA, Chitnis S, Donnelly SC, Monteiro J, Lin X, Plant BJ, Wolfe F, Gregersen PK, Bucala R. A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2002; 3: 170–176.
- 11 Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 2005; 7: 452–464.
- 12 Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory J, Zerneck A, Koenen R, Dewor M, Georgiev I, Schober A, Leng L, Kooistra T, Fingerle-Rowson G, Ghezzi P, Kleemann R, McColl S,

- Bucala R, Hickey M, Weber C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 2007; 13: 587–596.
- 13 Brandau S, Jakob M, Hemedda H, Bruderek K, Janeschik S, Bootz F, Lang S. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J Leukoc Biol* 2010; 88: 1005–1015.
- 14 Bortz J, Lienert GA, Boehnke K. Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. Mit 247 Tabellen. 3 Springer, Heidelberg 2008.
- 15 Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 791–800.
- 16 Campagnola P, Loew L. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 1356–1360.
- 17 Carter RA, O'Donnell K, Sachthep S, Cicuttini F, Boyd AW, Wicks IP. Characterization of a human synovial cell antigen: VCAM-1 and inflammatory arthritis. *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 419–428.
- 18 Chen G, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 826–837.
- 19 Collett GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res* 2005; 96: 930–938.
- 20 Daneman R, Zhou L, Kebede A, Barres B. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 2010; 468: 562–566.
- 21 DeRuiter MC, Poelmann RE, VanMunsteren JC, Mironov V, Markwald RR, Gittenberger-de G. Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circ Res* 1997; 80: 444–451.
- 22 Drobizhev M, Makarov N, Tillo S, Hughes T, Rebane A. Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nat Methods* 2011; 8: 393–399.
- 23 Egginton S, Hudlicka O, Brown MD, Graciotti L, Granata AL. In vivo pericyte-endothelial cell interaction during angiogenesis in adult cardiac and skeletal muscle. *Microvasc Res* 1996; 51: 213–228.
- 24 El M, El G, Seeds M, McCall C, Dreskin S, Nicolls M. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol Lett* 2007; 111: 36–44.

- 25 Evans H, Gullick N, Kelly S, Pitzalis C, Lord G, Kirkham B, Taams L. In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 6232–6237.
- 26 Faust N, Varas F, Kelly LM, Heck S, Graf T. Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* 2000; 96: 719–726.
- 27 Felger J, Abe T, Kaunzner U, Gottfried-Blackmore A, Gal-Toth J, McEwen B, Iadecola C, Bulloch K. Brain dendritic cells in ischemic stroke: time course, activation state, and origin. *Brain Behav Immun* 2010; 24: 724–737.
- 28 Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di V. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med* 1997; 185: 579–582.
- 29 Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol* 1997; 139: 1349–1360.
- 30 Franchi L, Eigenbrod T, Nunez G. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol* 2009; 183: 792–796.
- 31 Friedl P, Brocker EB. T cell migration in three-dimensional extracellular matrix: guidance by polarity and sensations. *Dev Immunol* 2000; 7: 249–266.
- 32 Friedl P, Weigelin B. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol* 2008; 9: 960–969.
- 33 Gautho K. Intro. BOOK.
http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med_80691.pdf, Zugriff: 20.01.2012.
- 34 Geissmann F, Jung S, Littman D. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; 19: 71–82.
- 35 Geissmann F, Manz M, Jung S, Sieweke M, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010; 327: 656–661.
- 36 GV Solas. Tiergerechte Haltung: Labormäuse.
- 37 Hayashi F, Means T, Luster A. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003; 102: 2660–2669.
- 38 Heintz N. BAC to the future: the use of bac transgenic mice for neuroscience research. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 861–870.

- 39 Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2005; 2: 932–940.
- 40 Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 847–855.
- 41 Hol J, Wilhelmssen L, Haraldsen G. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *J Leukoc Biol* 2010; 87: 501–508.
- 42 Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 2001; 21: 1975–1982.
- 43 Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 2011; 17: 796–808.
- 44 Imhof B, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 432–444.
- 45 Iyer S, Pulskens W, Sadler J, Butter L, Teske G, Ulland T, Eisenbarth S, Florquin S, Flavell R, Leemans J, Sutterwala F. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 20388–20393.
- 46 Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4106–4114.
- 47 Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88: 3259–3287.
- 48 Khandoga A, Khandoga A, Reichel C, Bihari P, Rehberg M, Krombach F. In vivo imaging and quantitative analysis of leukocyte directional migration and polarization in inflamed tissue. *PLoS One* 2009; 4: e4693.
- 49 Kim M, Carman C, Springer T. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* 2003; 301: 1720–1725.
- 50 Erhardt, W. Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen ; Schattauer, Stuttgart 2004.
- 51 Kono H, Rock K. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 279–289.
- 52 Kreisel D, Nava R, Li W, Zinselmeyer B, Wang B, Lai J, Pless R, Gelman A, Krupnick A, Miller M. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil

- extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 18073–18078.
- 53 Ley K, Laudanna C, Cybulsky M, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 678–689.
- 54 Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F, Medzhitov RM, Beg AA. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* 2001; 166: 7128–7135.
- 55 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402–408.
- 56 Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436–445.
- 57 Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 907–918.
- 58 McDonald B, Pittman K, Menezes G, Hirota S, Slaba I, Waterhouse C, Beck P, Muruve D, Kubes P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 2010; 330: 362–366.
- 59 McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest* 1997; 100: S97-103.
- 60 Mogensen C, Bergner B, Wallner S, Ritter A, d'Avis S, Ninichuk V, Kameritsch P, Gloe T, Nagel W, Pohl U. Isolation and functional characterization of pericytes derived from hamster skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 2011; 201: 413–426.
- 61 Mohler W, Millard A, Campagnola P. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods* 2003; 29: 97–109.
- 62 Murfee W, Rehorn M, Peirce S, Skalak T. Perivascular cells along venules upregulate NG2 expression during microvascular remodeling. *Microcirculation* 2006; 13: 261–273.
- 63 Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 145–176.
- 64 Nahrendorf M, Swirski F, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo J, Libby P, Weissleder R, Pittet M. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007; 204: 3037–3047.
- 65 Nakatani K, Yoshimoto S, Iwano M, Asai O, Samejima K, Sakan H, Terada M, Hasegawa H, Nose M, Saito Y. Fractalkine expression and CD16+ monocyte

- accumulation in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299: F207-16.
- 66 Ng L, Hsu A, Mandell M, Roediger B, Hoeller C, Mrass P, Iparraguirre A, Cavanagh L, Triccas J, Beverley S, Scott P, Weninger W. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000222.
- 67 Ng LG, Qin JS, Roediger B, Wang Y, Jain R, Cavanagh LL, Smith AL, Jones CA, de V, Grimbaldeston MA, Meeusen EN, Weninger W. Visualizing the Neutrophil Response to Sterile Tissue Injury in Mouse Dermis Reveals a Three-Phase Cascade of Events. *J Invest Dermatol* 2011.
- 68 Nourshargh S, Hordijk P, Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 366–378.
- 69 Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 2011; 17: 1381–1390.
- 70 Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 2008; 26: 151–162.
- 71 Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 1999; 11: 753–761.
- 72 Renkawitz J, Sixt M. Mechanisms of force generation and force transmission during interstitial leukocyte migration. *EMBO Rep* 2010; 11: 744–750.
- 73 Roediger B, Ng L, Smith A, Fazekas d, Weninger W. Visualizing dendritic cell migration within the skin. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 1131–1146.
- 74 Romeis B (Hrsg. 2008). *Mikroskopische Technik*. 18 Urban u. Schwarzenberg, München, Wien , Baltimore, 2008.
- 75 Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115–126.
- 76 Rot A, von A. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 891–928.
- 77 Rouhiainen A, Tumova S, Valmu L, Kalkkinen N, Rauvala H. Pivotal advance: analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant HMGB1 (amphoterin). *J Leukoc Biol* 2007; 81: 49–58.
- 78 Saha P, Geissmann F. Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunol Cell Biol* 2011; 89: 2–4.

- 79 Santiago-Raber M, Amano H, Amano E, Baudino L, Otani M, Lin Q, Nimmerjahn F, Verbeek J, Ravetch J, Takasaki Y, Hirose S, Izui S. Fc γ receptor-dependent expansion of a hyperactive monocyte subset in lupus-prone mice. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2408–2417.
- 80 Scaffidi P, Misteli T, Bianchi M. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418: 191–195.
- 81 Schumann K, Lammermann T, Bruckner M, Legler D, Polleux J, Spatz J, Schuler G, Forster R, Lutz M, Sorokin L, Sixt M. Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity* 2010; 32: 703–713.
- 82 Schymeinsky J, Sperandio M, Walzog B. The mammalian actin-binding protein 1 (mAbp1): a novel molecular player in leukocyte biology. *Trends Cell Biol* 2011; 21: 247–255.
- 83 Serbina N, Jia T, Hohl T, Pamer E. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 421–452.
- 84 Serbina N, Pamer E. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 2006; 7: 311–317.
- 85 Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 427–439.
- 86 Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood* 2009; 114: 4613–4623.
- 87 Soehnlein O, Zerneck A, Eriksson E, Rothfuchs A, Pham C, Herwald H, Bidzhekov K, Rottenberg M, Weber C, Lindbom L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 2008; 112: 1461–1471.
- 88 Stagg J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue Antigens* 2007; 69: 1–9.
- 89 Sumen C, Mempel T, Mazo I, von A. Intravital microscopy: visualizing immunity in context. *Immunity* 2004; 21: 315–329.
- 90 Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 5191–5196.
- 91 Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140: 805–820.
- 92 Thorley A, Ford P, Giembycz M, Goldstraw P, Young A, Tetley T. Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated

- primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages. *J Immunol* 2007; 178: 463–473.
- 93 Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, Wagner H. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 31332–31339.
- 94 Van d, Weyer S, Weening JJ, Roos D, Kuijpers TW. Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 467–473.
- 95 Varol C, Landsman L, Fogg D, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, Kalchenko V, Geissmann F, Jung S. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 2007; 204: 171–180.
- 96 Walter RJ, Marasco WA. Localization of chemotactic peptide receptors on rabbit neutrophils. *Exp Cell Res* 1984; 154: 613–618.
- 97 Yang XW, Model P, Heintz N. Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 859–865.
- 98 Zhu X, Bergles D, Nishiyama A. NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development* 2008; 135: 145–157.

XIII Danksagung

Zu allererst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Steffen Massberg für die Betreuung meiner Arbeit, sowie die kompetente Hilfestellung, Diskussionsbereitschaft und Motivation.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Konstantin Stark für die interessante Themenstellung und die kompetente wissenschaftliche Betreuung, sowie sein umfassendes Wissen und seine stetigen neuen Ideen für dieses Projekt. Ebenso für die Einarbeitung in diverse Methoden und schließlich seiner Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. med. vet. Rüdiger Wanke für die Übernahme und Durchsicht dieser Arbeit, sowie deren Einreichung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Ebenso gilt mein Dank Herrn PD Dr. Reese für die Hilfestellung bei der Erstellung der Statistik.

Bei Herrn Dipl.-Biologe Michael Lorenz und Frau Dr. Anca Laura Tirniceriu bedanke ich mich für die Einarbeitung in die Zellkultur sowie die FACS-Technik. Außerdem für die gute Zusammenarbeit und dafür dass sie durch ihr großes Wissen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich meiner Arbeitsgruppe, Dr. Marie-Luise von Brühl, Dr. Susanne Sauer, Sue Chandraratne, Selgai Haidari, Dr. Alexander Steinhart, Anne-Maria Suhr und Raffaele Coletti für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die hervorragende Betreuung sowie kompetente Hilfestellung und Unterstützung.

Für Pflege und Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei den TierpflegerInnen Frau Tanja Irl, Frau Nicole Blount und Herrn Sebastian Helmer.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mir Studium und Promotion ermöglichten, immer an mich glaubten und mich allzeit unterstützten. Mein Dank geht ebenso an meinen Bruder und meine Großeltern für deren liebevolle Unterstützung und Motivation.