

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

Interaktionen Monozyten/ Makrophagen,
neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten
bei steriler Inflammation im Gewebe

von Meike Elisabeth Miller
aus Waiblingen

München 2015

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

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

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

Mentor: Univ. -Prof. Dr. med. Steffen Massberg

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann
Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger
Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

„You don` t cure the disease by only looking at the disease.

Very often cures come out of the field.“

Klaus Ley, M.D.

Professor Division of Inflammation
Biology

La Jolla Institute for Allergy &
Immunology (La Jolla, CA, USA)

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht	2
1. Pathophysiologie der sterilen Inflammation.....	2
1.1. Morphologie und Funktion von Monozyten und Makrophagen.....	7
1.2. Morphologie und Funktion von neutrophilen Granulozyten	11
1.3. Morphologie und Funktion von Thrombozyten	12
2. Mechanismen der Immunzellrekrutierung	14
2.1. Intravaskuläre Rekrutierung und Transmigration von Leukozyten.....	14
2.2. Interstitielle Migration	19
3. Modelle der sterilen Inflammation.....	25
III. Zielsetzung	27
1. Charakterisierung des Zusammenspiels von neutrophilen Granulozyten, Monozyten/ Makrophagen und Thrombozyten bei der sterilen Inflammation	27
2. Analyse der intravaskulären und interstitiellen Interaktionen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten.....	28
3. Untersuchung der Rolle des Chemokins Fraktalkin bei der sterilen Inflammation	28
4. Bestimmung der Bedeutung von HMGB1 für die Immunzellrekrutierung bei der sterilen Entzündung	28
IV. Material und Methoden	29
1. Tiere.....	29
1.1. Haltung, Zucht und Hygienemanagement.....	29
1.2. Tierstämme	30
1.3. Applikationsmöglichkeiten.....	31
2. Anästhesie.....	35
2.1. Durchführung der Narkose	35
2.2. Narkosemanagement und – überwachung.....	36
2.3. Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen	37
3. Zwei-Photonen Intravitalmikroskopie	39
3.1. Grundlagen der Zwei-Photonen Mikroskopie	39
3.2. Aufbau des Zwei- Photonen Mikroskops	41
3.3. Auswertung mittels 2-Photonen-Technik	42

4.	Ohrmodell mit Laserverletzung	46
4.1.	Laserverletzung	47
4.2.	Zelldepletion	47
4.3.	Inhibitorischer Faktor	49
4.4.	Färbung der Thrombozyten mit eFluor670	49
5.	Whole Mount Staining.....	50
5.1.	Durchführung des Whole Mount Stainings	50
5.2.	Auswertung des Whole Mount Stainings mittels 2-Photonentechnik.....	51
6.	Zellkultur.....	52
6.1.	Humane Fibroblasten	52
6.2.	Gewinnung von nekrotischem Zelllysate.....	52
6.3.	Stimulation von humanen Fibroblasten	52
6.4.	ELISA.....	54
6.5.	Durchführung der real-time PCR	55
7.	Aggregationsassay.....	57
7.1.	Turbimetrisches Verfahren nach Born	57
8.	Versuchsplanung und Durchführung	59
9.	Statistische Auswertung	62
V.	Ergebnisse.....	63
1.	Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten bei der Laserverletzung.....	63
2.	Interaktion von Thrombozyten mit myeloiden Leukozyten.....	72
3.	Interaktionen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/ Makrophagen im intravaskulären, perivaskulären und interstitiellen Raum.....	74
4.	Abhängigkeit der Rekrutierung von myeloiden Zellen von Thrombozyten	78
5.	Abhängigkeit der Monozytenrekrutierung von neutrophilen Granulozyten	87
6.	Bedeutung von Fraktalkin für die Monozyten- und neutrophilen Granulozytenrekrutierung	94
7.	Bedeutung von HMGB1 für die Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten	112

VI. Diskussion	124
1. Wahl der Mauslinie.....	124
2. Verwendung des Ohrmodells in der Zwei- Photonentechnik	124
3. Wahl der humanen Fibroblasten für die <i>in-vitro</i> Versuche.....	125
4. Diskussion der Ergebnisse.....	126
4.1. Das Zusammenspiel der neutrophilen Granulozyten, Monozyten/ Makrophagen und Thrombozyten bei der sterilen Inflammation.....	126
4.2. Beeinflussung der Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten durch Fraktalkin bei der sterilen Inflammation	131
4.3. Selektive Regulation der Monozytenakkumulation durch HMGB1 für die Immunzellrekrutierung bei der sterilen Entzündung.....	132
5. Ausblick.....	135
VII. Zusammenfassung	136
VIII. Summary	137
IX. Abkürzungsverzeichnis	138
X. Abbildungsverzeichnis	142
XI. Tabellenverzeichnis	146
XII. Literaturverzeichnis	148
XIII. Anhang	163
XIV. Danksagung	164

I. EINLEITUNG

Die sterile Inflammation ist eine elementare Gewebsreaktion, welche die pathophysiologische Grundlage vieler Erkrankungen, wie etwa dem Ischämie/Reperfusionsschaden, der Arteriosklerose, dem Trauma oder dem Myokardinfarkt bildet¹. Trotz der hohen klinischen Relevanz dieser pathologischen Prozesse ist wenig über die zellulären Abläufe bekannt. In dieser Arbeit soll vor allem auf die Interaktion von Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten *in vivo* eingegangen werden, da diese Zellpopulationen sehr schnell zum geschädigten Gewebe rekrutiert werden. Wie das Zusammenspiel dieser Zelltypen zur sterilen Inflammation beiträgt, ist kaum erforscht. Insbesondere neutrophile Granulozyten führen häufig zu einer beträchtlichen zusätzlichen Gewebsschädigung, die es zu vermeiden gilt. Publikationen der Arbeitsgruppe um Professor Massberg haben zudem gezeigt, dass Inflammation und Thrombose eng verknüpfte Prozesse sind^{2,3}. Dies soll nun bei der sterilen Inflammation genauer untersucht werden.

In dieser Arbeit soll mittels intravitaler 2-Photonen Mikroskopie *in vivo* die sterile Inflammation am Mausmodell untersucht werden. Die Arbeitsgruppe um Professor Massberg verfügt über transgene Tiere, die es ermöglichen sowohl Monozyten als auch neutrophile Granulozyten *in vivo* zu visualisieren und die Mechanismen ihrer Rekrutierung und Interaktion zu klären. Weiterhin sollen mittels Whole Mount Staining Faktoren identifiziert werden, die den frühen zellulären Mechanismen der sterilen Inflammation steuern. Ebenso soll die Interaktion von myeloiden Leukozyten und Thrombozyten *in vivo* genauer analysiert werden, da der Beitrag letzterer zur sterilen Entzündungsreaktion weitgehend unbekannt ist. Aus der Analyse dieser zellulären Vorgänge *in vivo* könnten sich neue therapeutische Ansatzpunkte für eine Vielzahl von Erkrankungen ergeben, die auf der sterilen Inflammation basieren.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Pathophysiologie der sterilen Inflammation

Unser Immunsystem ist ständig Einflüssen aus unserer Umwelt, aber auch inneren Reizen ausgesetzt, auf die es mit einer Entzündungsreaktion antworten kann. Nach der „Gefahr-Hypothese“ von Matzinger et al. können nicht nur Infektionserreger eine Immunantwort auslösen, sondern auch ein Gewebsschaden, Zellstress oder der Zelltod⁴. So können Zellen Faktoren freisetzen, die zu einer Inflammation führen. Diese Faktoren werden auch DAMPs (damage- associated molecular patterns) genannt, auf die später in diesem Kapitel eingegangen wird. Dabei handelt es sich um intrazelluläre Moleküle, die erst bei Schädigung der Zelle in den extrazellulären Raum gelangen und dort über spezifische Rezeptoren auf Immunzellen eine Entzündungsreaktion initiieren^{4,5}.

Die Gesamtheit der Abwehzellen des Immunsystems differenziert sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten der Differenzierung: die myeloische Reihe, aus der sich die Zellen der unspezifischen Abwehr entwickeln, sowie die lymphatische Reihe, mit den Zellen der spezifischen Abwehr⁶. Die myeloischen Leukozyten spielen eine bedeutende Rolle bei der Initiierung, dem Ablauf und der Beendigung einer Entzündungsreaktion⁷. Bedingung hierfür ist eine gerichtete Bewegung auf den entzündungsauslösenden Insult hin, um schnell und gezielt das schädigende Agens zu bekämpfen.

Eine Entzündung, die ohne Beteiligung von klassischen Krankheitserregern, wie bspw. Bakterien oder Viren verursacht wird, bezeichnet man als sterile Entzündung¹. Sie ist eine physiologische Reaktion auf eine Schädigung oder einen Gewebsuntergang, der verschiedene Ursachen haben kann. Zu nennen sind Traumata, Verbrennungen, Minderversorgungen von Geweben mit Blut wie beispielsweise bei Herzinfarkten und Schlaganfällen⁸. Bei Gewebsuntergang werden intrazelluläre Botenstoffe freigesetzt, die im Immunsystem eine Entzündungskaskade in Gang setzen und zur Eliminierung des Gewebeschadens führen sowie zur Beendigung der Entzündungsreaktion. In manchen Fällen kommt es aber zu einer überschießenden Reaktion, die zu einer zusätzlichen Gewebeschädigung führt⁹. Diese Schädigung ist bedingt durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), Proteasen und Wachstumsfaktoren, die neutrophile Granulozyten und Makrophagen bei der

Entzündungsreaktion freisetzen⁵. Die sterile Inflammation ist gekennzeichnet durch eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen, deren Produktion proinflammatorischer Cytokine und Chemokine, insbesondere Tumor- Nekrose Faktor (TNF) und Interleukin 1 (IL-1), die Induktion der T-Zell Immunantwort vermitteln^{9,10}.

Es gibt verschiedene Krankheitsbilder, die durch eine unkontrollierte sterile Entzündung verursacht werden können. Zu nennen sind beispielsweise der Herzinfarkt⁸, Arteriosklerose⁸, Gicht⁸, Tumore¹¹ und die Alzheimer Erkrankung¹². Bei der Arteriosklerose beispielsweise nehmen die Makrophagen Cholesterin auf, das zur Aktivierung von Entzündungszellen, Endothelzell dysfunction und Plaqueformation führt¹³. Die Wiederherstellung des Blutflusses verursacht beim Herzinfarkt eine weitere Gewebszerstörung durch die Infiltration von neutrophilen Granulozyten, die auf die Gewebsnekrose mit der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) reagieren⁸.

Die Mechanismen sind bei der sterilen Entzündung ähnlich wie bei der klassischen durch Pathogene verursachte Entzündungsreaktion und werden über spezifische Rezeptoren v.a. auf Immunzellen vermittelt⁹. Diese Rezeptoren, auch PRR (Pattern Recognition Receptor) genannt, beinhalten verschiedene Rezeptorgruppen, die je nach Lokalisation intra- und extrazellulär liegen können¹⁴. Zu nennen sind: die Toll-like-Rezeptoren (TLR), die als Transmembranrezeptor auf Immunzellen sitzen und die intrazellulären NOD-like Rezeptoren (NLR)^{15,16}. Beide spielen nach Aktivierung eine zentrale Rolle beim Entzündungsgeschehen durch Induktion einer vermehrten Expression von proinflammatorischen Cytokinen und Chemokinen.

Klassischerweise binden an die PRR die PAMPs (Pathogen associated molecular Pattern), welches molekulare Strukturen von Pathogenen wie Bakterien, Viren und Pilze darstellen, die vom Wirt als fremd erkannt werden und mit einer zellulären Immunantwort reagieren¹⁷. Je nach Bindung dieser PAMPs an die verschiedenen Rezeptoren (TLR) kann zwischen den verschiedenen Pathogenen unterschieden und zielgerichtet auf den Stimulus reagiert werden¹⁸. An diese Rezeptoren können aber ebenfalls so genannte DAMPs (Damage associated molecular Patterns) binden. Darunter versteht man eine Gruppe unterschiedlicher proinflammatorischer Faktoren, die sowohl exogen als auch endogen zugeführt eine Entzündungsreaktion, vergleichbar mit der von PAMPs, auslösen können^{5,9}. DAMPs für die sterile Inflammation können Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und Bestandteile der extrazellulären Matrix sein, sowie exogene Stimuli wie z.B. Asbest¹⁹. Unter

physiologischen Bedingungen liegen sie intrazellulär vor und stellen keinen Entzündungsreiz für das Immunsystem dar. So werden Autoimmunerkrankungen und unkontrollierte Entzündungen verhindert. Gelangen DAMPs aber aus dem intrazellulären Raum in den extrazellulären Raum, so findet eine Bindung der DAMPs an den zugehörigen Rezeptor statt und es werden verschiedene Signalwege induziert, die unter anderem eine Cytokin- und Chemokinfreisetzung bewirken. Damit wird die Entzündungskaskade in Gang gesetzt, die in der Rekrutierung von Leukozyten mündet.

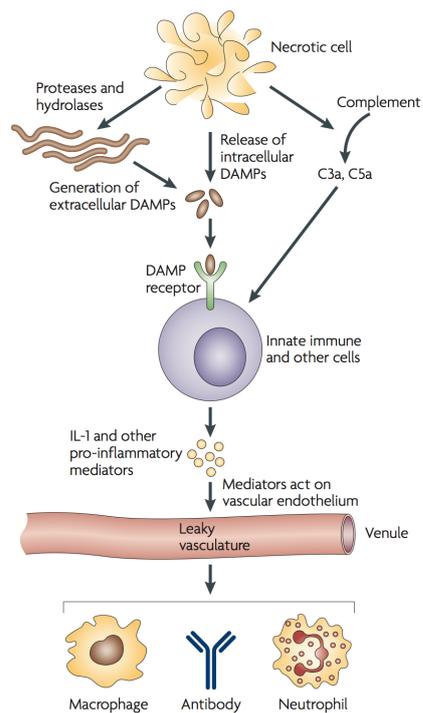


Abbildung 1: Nekrose mit der daraus resultierenden Entzündungsantwort

Darstellung der Faktoren, die bei dem Zelltod freigesetzt werden, wie z.B. DAMPs und Faktoren, die Komplementfaktoren aktivieren. Die Bindung an Rezeptoren führt zur Ausschüttung von Botenstoffen wie bspw. Cytokinen, die zur Rekrutierung der Immunzellen und zur Steigerung der Gefäßpermeabilität führen.

mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology⁵, Copyright (2008)

Bei der Nekrose (siehe Abbildung 1) findet eine weitreichende Freisetzung an unterschiedlichsten DAMPs durch den Verlust der Zellintegrität statt²⁰. Die Nekrose ist eine Form des unkontrollierten Zelltods, der durch externe Faktoren verursacht wird. Gekennzeichnet ist dieser durch die Vakuolisierung des Zytoplasmas und dem Aufquellen der Mitochondrien sowie des Zellkerns, was zur Ruptur der Plasmamembran führt. Daraufhin folgt die Freisetzung der Zellbestandteile, die nun

sowohl vom angeborenen, als auch vom erworbenen Immunsystem als nicht mehr körpereigen erkannt werden. Der Körper reagiert darauf mit einer Entzündungsantwort⁵. Als klassische sterile Entzündungsmediatoren, die bei der Nekrose freigesetzt werden, sind HMGB1 (high- mobility group box 1)²⁰⁻²³, Purinmetabolite wie z.B. ATP²⁴ und Harnsäure²⁵ zu nennen.

HMGB1 ist ein nukleäres Protein, das aus zwei DNA- bindenden Domänen (HMG BoxA und B; siehe Abbildung 2) und einem negativ geladenen Säureendstück besteht²⁶. BoxA, als isoliertes Molekül, hat eine spezifische hemmende Wirkung auf das HMGB1²⁷.

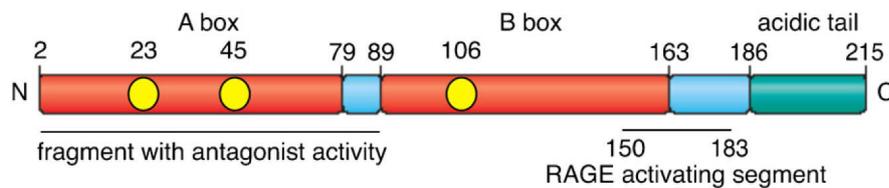


Abbildung 2: Struktur von HMGB1 mit seinen zwei DNA- bindenden Domänen BoxA und B und dem negativ geladenen Säureendstück

Hier sind in rot die zwei DNA-bindenden Domänen BoxA und B abgebildet, die bei dem vorderen Endstück als isoliertes Molekül inhibitorischen Charakter aufweist (BoxA). Des Weiteren enthält HMGB1 noch ein negativ geladenes Endstück (grün) mit dem es nach Bindung zur Aktivierung des RAGE-Rezeptors führt, der in der Hochregulierung der Gene für pro-inflammatorischer Cytokine resultiert.

mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: *Molecular Immunology*²⁶, Copyright (2013)

Im Zellkern befindliches HMGB1 fungiert als Stabilisator für Nukleosomen und als Regulator für die Genexpression²⁸. Das bei der Nekrose in das extrazelluläre Milieu freiwerdende HMGB1 triggert über verschiedene Rezeptorbindungen (RAGE, TLR2/4) die Inflammation^{26,29} und aktiviert das angeborene, wie auch das erworbene Immunsystem³⁰. Außerdem kann es zusätzlich von stimulierten Immunzellen aktiv sezerniert werden³¹.

Die Gruppe um Marco Bianchi postuliert, dass verschiedene Redox- Formen des HMGB1 vorkommen und dass daraus unterschiedlichen Wirkungsweisen während einer Entzündungsreaktion resultieren (siehe Abbildung 3). Diese Formen unterscheiden sich durch ihren Oxidationszustand an jeweils drei Cysteinresten. Im Cytosol und Zellkern liegt ein stark negatives Redox-Potential vor, weshalb das intrazelluläre HMGB1 in reduzierter Thiolform vorliegt, welche für die Bindung an den TLR4- Rezeptor und somit für die Zellrekrutierung verantwortlich ist^{27,32,33}. Im extrazellulären Milieu unter entzündlichen Bedingungen herrscht ein vorwiegend

oxidierendes Potential vor. Dadurch entsteht eine disulfurierte HMGB1-Form, die bei Leukozyten die Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen und Chemokinen induziert. Die dritte Form wird durch freie Sauerstoffradikale (ROS) gebildet, die das HMGB1 vollständig oxidieren, so dass eine inaktive Form entsteht und die Entzündungsreaktion beendet wird²⁷.

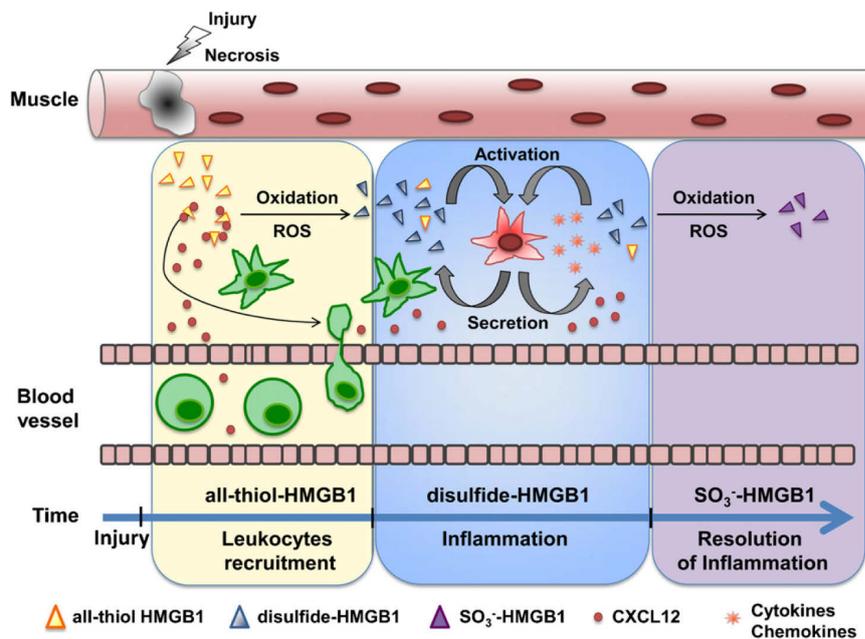


Abbildung 3: HMGB1 während der Entzündungsreaktion verursacht durch eine Nekrose

HMGB1 spielt in unterschiedlichen Stufen der Entzündungsreaktion eine Rolle. Dabei kommt es in drei verschiedenen Stufen vor: zu Beginn die all-thiol Form (△) mit einer Zell-rekrutierenden Funktion, dann die disulfid-Form (△) mit einer aktivierenden/sekretorischen Funktion bei den Leukozyten und zuletzt die vollständig oxidierte und damit inaktive Form (△)

mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Molecular Immunology²⁶, Copyright (2013)

Die Blockierung der Freisetzung von HMGB1 und deren Rezeptoren stellt einen anti-inflammatorischen Therapieansatz für Erkrankungen dar, die mit einem erhöhten HMGB1-Level und unkontrollierter Inflammation einhergehen^{30,34}. Beispielhaft zu nennen ist der protektive Effekt von BoxA bei der Behandlung der kollagen-induzierten Arthritis³⁵.

1.1. Morphologie und Funktion von Monozyten und Makrophagen

Die Nekrose führt vor allem zur Rekrutierung myeloider Leukozyten, wobei hier Monozyten eine zentrale Stellung zukommt, worauf im Folgenden näher eingegangen wird. Monozyten sind hochkonservierte Zellen, die in allen Wirbeltieren vorkommen und sogar als ähnlich anzusehende Population bei *Drosophila melanogaster* in der Hämolymphe nachgewiesen werden kann³⁶. Der Anteil der im Blut zirkulierenden Monozyten liegt bei der Maus bei 4% und beim Menschen bei 10%^{37,38}.

Aus den im Knochenmark lokalisierten Vorläuferzellen³⁹ der myeloïden Zellreihe bilden sich sowohl die Granulozyten, die je nach Färbeverhalten nochmals unterteilt werden in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, als auch die Monozyten (Abbildung 4)⁷. Nach Übertritt der letztgenannten Zellpopulation ins Gewebe differenzieren sich diese zu Makrophagen und dendritischen Zellen. Sie gehören sowohl dem angeborenen, als auch dem erworbenen Immunsystem an. Zum einem können sie zur lokalen Auflösung einer Entzündung beitragen, zum anderen besitzen sie die Fähigkeit, dendritische Zellen auszubilden und so als antigenpräsentierende Zellen zu fungieren⁴⁰⁻⁴³.

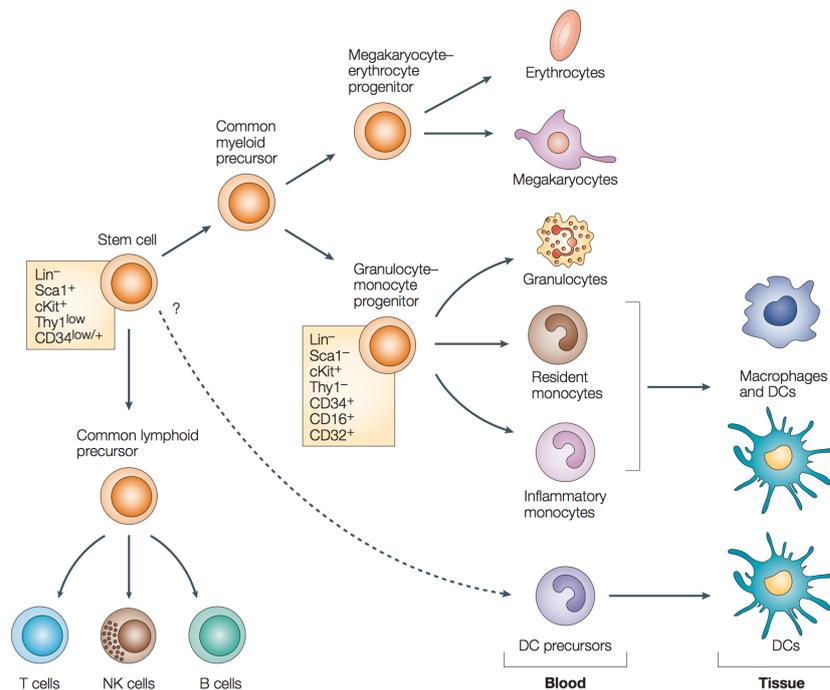


Abbildung 4: Ursprung und Differenzierungsschema der myeloïden Zellen

Darstellung der Differenzierung der myeloïden Zellen aus der Stammzelle über verschiedene Vorläuferzellen bis zur ausdifferenzierten Zellen im Blut oder Gewebe

mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology⁷, Copyright (2004)

Die unterschiedlichen Subtypen der Monozyten unterscheiden sich in ihrer Größe, dem Migrationsverhalten (trafficking), der Rezeptor- Ausstattung auf deren Zelloberfläche und der Fähigkeit, sich je nach Stimulation durch Cytokine in unterschiedliche Subtypen zu differenzieren³⁷. Monozyten stellen als Teil des angeborenen Immunsystems einen maßgeblichen Anteil an der Entzündungsantwort unseres Körpers gegen die Abwehr äußerer mikrobieller Einflüsse dar^{44,45}, sind aber genauso beteiligt an Gewebszerstörung während entzündlicher Erkrankungen, wie z.B. bei der Arteriosklerose^{46,47}. Darüber hinaus spielen sie eine Rolle in der Tumorummunologie, wo ihnen inhibitorische Effekte zugesprochen werden⁴⁸.

Die Monozyten werden aufgrund ihrer Zelloberflächenrezeptoren und Funktionen in verschiedene Untergruppen gegliedert^{43,49}. Beim Menschen basiert die Unterteilung auf der Expression der Oberflächenmoleküle CD14 und CD16 aufgrund derer drei Klassen unterschieden werden: klassische, intermediäre und nicht klassische Monozyten^{50,51}. Bei der Maus findet die Untergliederung in zwei Subpopulationen statt: Die größere Gruppe exprimiert auf der Zelloberfläche den Marker Ly6C - der durch den Antikörper GR1 erkannt wird - sowie CD11b, zusammen mit dem Chemokinrezeptor CCR2 und einem niedrigen Level des Fraktalkinrezeptors (CX3CR1). Diese Population wird oft auch als inflammatorische oder Ly6C^{high}- Monozyten bezeichnet und repräsentiert 2-5% der zirkulierenden Leukozyten, die sehr schnell bei einer Infektion oder Entzündung rekrutiert werden^{43,44}. Sie besitzen im Blut eine Halbwertszeit von 20 Stunden^{39,52}. Das Äquivalent beim Menschen sind die CD14⁺⁺CD16⁻ (klassischen) Monozyten. Die zweite Untergruppe der zirkulierenden murinen Monozyten weist eine hohe Expression des Chemokinrezeptor CX3CR1 und eine geringe Expression von CCR2 und Ly6C auf der Zelloberfläche auf. Sie werden als Ly6C^{low}- Monozyten, patrouillierende/residierende oder im humanen System als nicht-klassische Monozyten bezeichnet, da intravitalmikroskopische Studien gezeigt haben, dass diese Population entlang der luminalen Gefäßwand migriert und dabei einen patrouillierenden Charakter besitzt^{43,53}. Diese Unterart besitzt eine längere Überlebensdauer *in vivo* (Halbwertszeit von 5 Tagen)⁵⁴, eine CX3CR1-abhängige Rekrutierung in nicht- entzündetes Gewebe. Zudem fördert diese Subpopulation die Wundheilung sowie Angiogenese^{55,56} und sie ist an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt^{55,57}. Obwohl die Subpopulationen zwischen Maus und Mensch nicht identisch sind, ist die Differenzierung und das Verhalten der Monozyten in der Immunabwehr sehr ähnlich und somit vergleichbar⁵⁸⁻⁶⁰.

Monozyten werden auch im Falle eines sterilen Stimulus angelockt, wie bspw. bei der Arteriosklerose und dem Herzinfarkt^{46,61}. Bei letzteren kommt es zu einer biphasischen Monozyten-Rekrutierung, bei der in der ersten Welle der Monozyten anflutet, um die abgestorbenen Myozyten/ Herzmuskelzellen zu eliminieren. In der späteren Phase unterstützen sie die Auflösung der Entzündung und fördern die Gewebsreparatur^{55,62}.

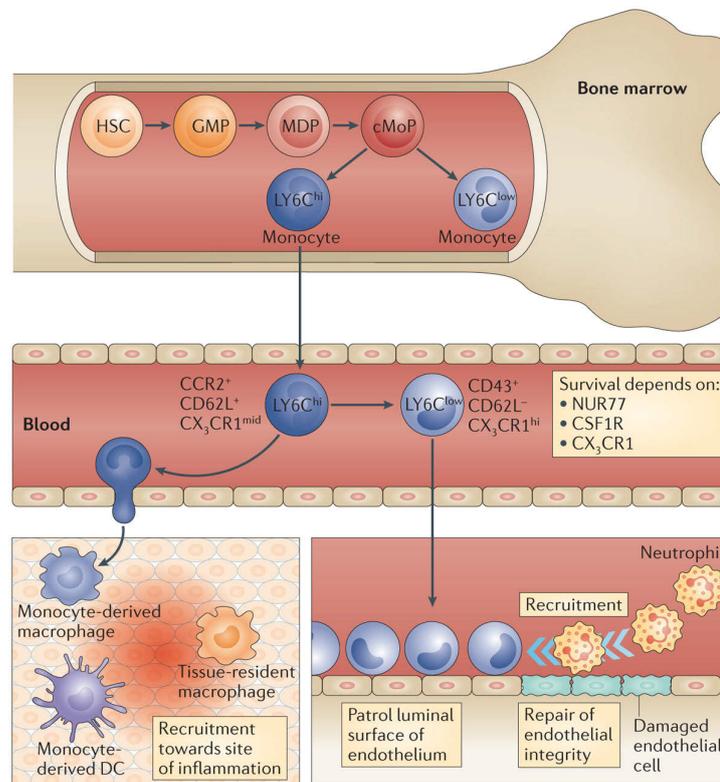


Abbildung 5: Das murine Monozyten- Kontinuum

Darstellung des Differenzierungsmusters der Monozyten aus dem Knochenmark in die Blutbahn, in der sie als Wächterzellen im Gefäßsystem patrouillieren oder bei einem Stimulus dieses verlassen, um zum Entzündungsherd im Gewebe zu wandern. Außerdem können patrouillierende Monozyten im Falle eines Endothelschadens neutrophile Granulozyten anlocken.

mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology⁵⁴, Copyright (2014)

In der Abbildung 5 ist der Lebenszyklus eines Monozyten zusammengefasst dargestellt. Die Monozyten werden kontinuierlich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet und über verschiedene Differenzierungsstufen ins Blut als LY6C^{high} Monozyten abgegeben. LY6C^{high} Monozyten bilden die Vorläuferzelle für LY6C^{low} Monozyten in der Blutzirkulation. Im Grundzustand haben die beiden Zellen unterschiedliche Funktionen. LY6C^{high} Monozyten werden schnell zum Ort einer Entzündung rekrutiert, indem sie aus dem Gefäß austreten und zu Makrophagen bzw. dendritischen Zellen ausdifferenzieren. LY6C^{low} Monozyten patrouillieren im Gefäß und

im Falle eines Endothelschadens koordinieren sie die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zu dessen Reparatur^{53,56}.

Da in dieser Arbeit der Fokus auf der Zellmigration in der Haut liegt, soll das Immunsystem der Haut im Speziellen näher erörtert werden. Die Haut, als äußere Schutzbarriere zur Außenwelt, besitzt ein präzises aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel der unterschiedlichen Immunzellen⁶³. Dabei haben besonders die Gewebsmakrophagen eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase. Ihre Fähigkeit, auf einen Entzündungsstimulus zu reagieren und die auch darauf folgende Auflösung der Inflammation machen sie zu wertvollen Zellen im Interstitium.

Der anatomische Aufbau der Haut besteht aus zwei Einheiten, der Epidermis und Dermis. Sie werden von der Basalmembran voneinander abgegrenzt. In der Epidermis spielen die Langerhans- Zellen die Hauptrolle als antigenpräsentierende Zelle. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Dermis im Besitz immunologischer Zellen (dendritische Zellen und Makrophagen) ist und nicht nur aus kollagenen Fasern und Blutgefäßen besteht⁶⁴. Das im Jahre 1968 von van Furth entwickelte Konzept des mononukleären Phagozyten- System (MPS)³⁹ fasst die Leukozyten mit den Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen in eine Untergruppe zusammen, die zur Phagozytose und Speicherung von Stoffen und Partikeln fähig ist. Dabei war die jahrzehntelange Annahme, dass Gewebsmakrophagen aus kontinuierlich rekrutierten Blutmonozyten ins Gewebe rekrutiert werden der Status quo. Neueste Studien widersprechen diesem Dogma³⁹. Sie zeigen, dass diese Zellen aus embryonischen Vorläuferzellen im Dottersack schon vor der Geburt ins Gewebe auswandern und schließlich sich selbst aus adulten Gewebsmakrophagen erneuern können⁵⁴.

Aufgrund des Beitrags der Monozyten in der protektiven Immunität, der Erhaltung des immunologischen Gleichgewichts und der Rolle in pathologischen Prozessen, besteht ein großes Interesse, diese Zellen für therapeutische Zwecke zu manipulieren.

1.2. Morphologie und Funktion von neutrophilen Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten, eine Untergruppe der Leukozyten, sind die ersten Zellen des angeborenen Immunsystems, die bei einem Entzündungsgeschehen rekrutiert werden und imstande sind durch unterschiedliche Mechanismen Pathogene zu bekämpfen oder auf Gewebsverletzungen zu reagieren. Dazu gehören die Fähigkeit zur Phagozytose^{65,66}, die Freisetzung von intrazellulär gelagerten pro-inflammatorischen Stoffen (Degranulation)^{66,67} und der Ausbildung von „neutrophil extracellular traps“ (NETs)⁶⁸. Bei dem zuletzt genannten Vorgang wird die DNA der neutrophilen Granulozyten als Netz ausgestoßen und kann dadurch Pathogene binden und abtöten⁶⁹.

Die neutrophilen Granulozyten werden kontinuierlich aus myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark gebildet (siehe Abbildung 4) und über verschiedene Reifungsprozesse differenzieren sie zu polymorphkernigen segmentierten Zellen die im Körper zirkulieren. Dabei werden sie unter physiologischen Bedingungen in Knochenmark, Milz, Leber und Lunge gespeichert^{70,71} und stehen somit bei einem gesetzten Entzündungsreiz schnell zur Verfügung. Die tägliche Produktion im Menschen kann bei diesen Zellen bei bis zu 2×10^{11} Zellen liegen⁷². Als kurzlebige Zellen besitzen sie eine Halbwertszeit von 12,5 (Maus) und 5 Tagen (Mensch)^{67,73}. Der Mensch unterscheidet sich in der Anzahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten (50-70% der Leukozyten) deutlich von der Maus (10-20% der Leukozyten)⁷⁴.

Bei der sterilen Entzündung wird die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten u.a. durch die Freisetzung von DAMPs vermittelt. Die Leukozyten wandern über die klassische Adhäsionskaskade mit ihren verschiedenen Schritten (Margination, Rollen, Aktivierung, Adhäsion und Transmigration) ins Gewebe aus (siehe Abbildung 6), um an den Ort des Insults zu gelangen⁷⁵. Dabei setzen die neutrophilen Granulozyten unterschiedlichste Mediatoren und Enzyme frei. Es findet auch ein Zusammenspiel mit anderen Leukozyten statt. So fördert die Freisetzung von bspw. Cathepsin G⁷⁶ und α -Defensins⁷⁷ die Rekrutierung von Monozyten.

Bei der Degranulation kann auch das umgebende Gewebe geschädigt werden und zu sowohl akuten als auch chronischen Erkrankungen führen⁷⁸⁻⁸⁰. Die neutrophilen Granulozyten besitzen in ihren Granula nicht nur schädigende Substanzen. So befinden sich darin auch pro-angiogene Moleküle, wie der VEGF-A⁸¹ und die Metallopeptidase-9⁸², welche die Gewebsreparatur und Gefäßneubildung fördern.

1.3. Morphologie und Funktion von Thrombozyten

Thrombozyten sind kleine (durchschnittlich 2 μm groß), bei Säugetieren kernlose Zellen, die aus Megakaryozyten des Knochenmarks stammen. Dabei bildet ein Megakaryozyt Abschnürungen von bis zu tausenden Plättchen, die in die Zirkulation freigesetzt werden^{83,84}. Die Halbwertszeit eines humanen Thrombozyten liegt bei 8- 10 Tagen und pro Liter Blut zirkulieren 150- 400 x 10⁹ Plättchen durch den Organismus. Bei der Maus liegen die Werte bei 900- 1600 x 10⁹ Thrombozyten pro Liter Blut und somit höher als beim Menschen⁸⁵.

Die wichtigste Funktion der Plättchen liegt in der Hämostase, sie können zudem an Monozyten und neutrophilen Granulozyten binden und nehmen somit auch eine Rolle bei der angeborenen Immunantwort ein⁸⁶. Sie exprimieren eine Vielzahl von Immunrezeptoren, Adhäsionsmolekülen und enthalten große Mengen an Granula. Es gibt drei Arten von Granula. Als erstes sind die α -Granula zu nennen, die nach Aktivierung schnell freigesetzt werden und die Hämostase und Entzündungsantwort unterstützen. Ein wichtiger Mediator ist das P-Selektin, welches die Interaktion zwischen Plättchen, Leukozyten, Plasmaproteinen und der Gefäßwand vermittelt⁸⁷. Selektine sind Zelladhäsionsmoleküle, die auf unterschiedlichen Zellen nach Aktivierung externalisiert werden und Interaktionen zwischen Zellen und der Gefäßwand vermitteln⁸⁸. Es werden drei Untergruppen gebildet, die nach ihrem Expressionsort auf den Zellen eingeteilt werden. Die L- Selektine sind auf Lymphozyten, aber auch Monozyten und neutrophilen Granulozyten zu finden. Das E-Selektin wird auf aktivierten Endothelzellen gefunden und vermittelt die Rekrutierung von Leukozyten. Die dritte Gruppe ist das P- Selektin, welches auf Plättchen, aber auch auf Endothelzellen zu finden ist. Es ist in den Granula gespeichert und kann nach Stimulation innerhalb von Sekunden ausgeschüttet werden. In den Endothelzellen werden diese Granula als Weibel-Palade Körperchen bezeichnet⁸⁸. Die Bindung von P-Selektin an seinen Liganden PSGL-1(P- Selektin- Glykoprotein- 1), der sich auf Leukozyten und Endothelzellen befindet, leitet die klassische Adhäsionskaskade ein, auf die weiter unten (Kapitel 2.1) näher eingegangen wird⁸⁶.

Die beiden anderen Granula sind zum einen die δ - Granula (dense bodies), deren enthaltene Substanzen (z.B. ADP, Serotonin) bei der Aggregation, Vasokonstriktion und Produktion von proinflammatorischen Cytokinen⁸⁹ beteiligt sind. Zum anderen sind die Lysosomen- Granula zu nennen, die antimikrobiellen Charakter aufzeigen⁸⁷. Zusätzlich vermittelt die Bindung von Plättchen an neutrophilen Granulozyten, dass diese NETs freisetzen und somit die Eliminierung von Pathogenen unterstützen⁹⁰.

In einer Studie wurde bei Mäusen mit erhöhten Blutfettwerten eine vermehrte CX3CR1- Rezeptorenzahl auf den Plättchen nachgewiesen, was zu einer Bildung von Plättchen- Monozyten- Aggregate führt⁹¹. Somit wurde gezeigt, dass auch Plättchen den Fraktalkin- Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche externalisieren können, mit dem sie in Interaktionen mit anderen Immunzellen sowie dem Endothel treten können⁹².

In der Literatur wurde über die Rolle der Plättchen bei Infektionen mit Pathogenen viel publiziert⁹³⁻⁹⁵. Über die Rolle während der sterilen Entzündung ist bisher noch wenig bekannt. Durch die ähnlichen Faktoren und Mechanismen liegt die Vermutung nahe, dass diese auch bei der sterilen Entzündung eine Rolle spielen können. So wurde bspw. bei der Schocklunge (ARDS) gezeigt, dass Plättchen über P-Selektin neutrophile Granulozyten rekrutieren^{96,97}. Auch bei der Arthritis konnte demonstriert werden, dass Thrombozyten die Extravasation von neutrophilen Granulozyten fördern⁹⁸. Außerdem konnte in der Arbeitsgruppe um Professor Massberg gezeigt werden, dass bei der tiefen venösen Thrombose (DVT) auch Komponenten einer sterilen Entzündung vorhanden sind³. So werden bei der DVT die Endothelzellen aktiviert und setzen P-Selektin aus den Weibel- Körperchen frei, was eine Immunzellrekrutierung initiiert⁹⁹. Diese Rekrutierung der Immunzellen bei DVT läuft in ähnlichen Stufen ab, wie sie in der klassischen Adhäsionskaskade bei einer Entzündung beschrieben wird⁷⁵. Bei der Plättchenaggregation während der DVT konnte intravitalmikroskopisch gezeigt werden, dass die Entzündungsantwort und hauptsächlich die Interaktion zwischen Plättchen mit den neutrophilen Granulozyten oder den Monozyten bei der Formierung eines Thrombus ausschlaggebend ist⁹⁹.

2. Mechanismen der Immunzellrekrutierung

Die Rekrutierung myeloider Zellen aus der Blutbahn in das Interstitium erfordert ein detailliertes Zusammenspiel zwischen den myeloiden Zellpopulationen und der Gefäßwand mit dem anschließenden Übertritt ins Gewebe. Nach Überwindung der Gefäßbarriere erfolgt die Wanderung im Interstitium in Richtung des Entzündungsfokus.

Die Monozyten und neutrophile Granulozyten unterscheiden sich in dem Zeitpunkt an dem sie am Ort der Inflammation aktiv werden. So kann man die Zellrekrutierung in verschiedene Phasen untergliedern. Die erste Phase, in der die Entzündung von patrouillierenden Monozyten wahrgenommen wird und diese darauf mit einer Cytokinausschüttung reagieren. In der zweiten Phase werden die neutrophilen Granulozyten aufgrund der freigesetzten Cytokine angelockt und schütten wiederum ihre Granula aus. Diese bewirken eine Extravasation von inflammatorischen Monozyten. Die Lebensdauer der migrierenden neutrophilen Granulozyten ist relativ kurz und wird durch pro- oder anti-apoptotische Signale von Makrophagen beeinflusst, die dann auch in der letzten Phase das Gewebgleichgewicht wieder herstellen indem sie den Entzündungsprozess begrenzen.

2.1. Intravaskuläre Rekrutierung und Transmigration von Leukozyten

Damit Abwehrzellen, sowohl bei der sterilen als auch bei der klassischen Entzündung, ins interstitielle Gewebe gelangen können müssen die Zellen das Gefäßsystem zunächst verlassen. Zu Beginn benötigen diese ein aktiviertes Endothel, so dass die über verschiedene Stufen laufende Adhäsionskaskade in den postkapillären Venolen in Gang gesetzt wird. Die Kaskade beinhaltet initial ein Selektin-vermitteltes „loses Binden“ (tethering) und Rollen entlang der Gefäßwand. Darauf folgt ein chemokinvermitteltes langsames Rollen, die Arretierung und die anschließende feste Adhäsion (firm adhesion/ spreading), welche über Integrine vermittelt wird. Das folgende intravaskuläre Kriechen (crawling) ermöglicht den Leukozyten entlang des aktivierten Endothels mit dem Blutfluss zu wandern, als auch gegen diesen. Darauf folgt der letzte Schritt der Transmigration ins Interstitium, welcher entweder transzellulärer oder parazellulärer in Bezug auf Endothelzellen durch diese, sowie durch Lücken zwischen den Perizyten ablaufen kann^{100,101}.

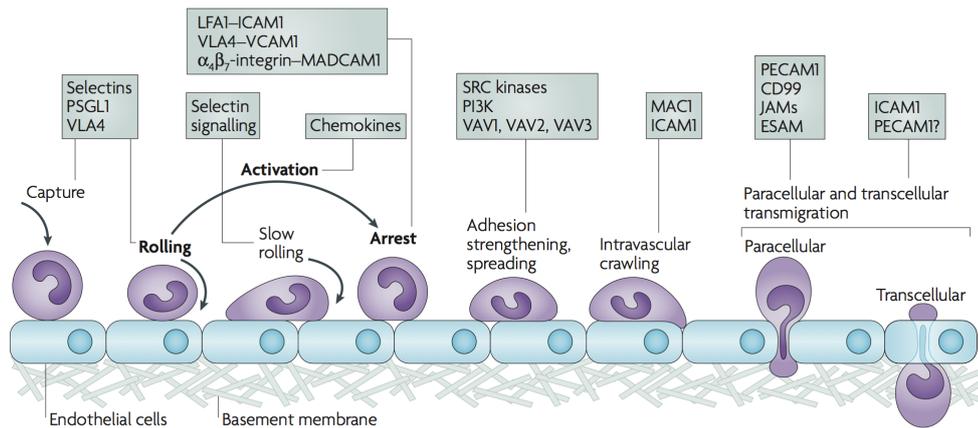


Abbildung 6: Leukozyten Adhäsionskaskade während der Inflammation

Darstellung der verschiedenen Stufen der vaskulären Adhäsionskaskade der Leukozyten, die zu Beginn über das Selektin-vermittelte Rollen, der Arretierung der Zelle (Integrin vermittelt) und anschließend zum Übertritt der Zellen ins Gewebe führt.

mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology⁷⁵, Copyright (2007)

Zusätzlich zu den oben erwähnten Selektinen (siehe 1.3) spielen weitere wichtige Adhäsionsmoleküle bei der Zellkommunikation zwischen den Zellen untereinander und der extrazellulären Matrix mit den Zellen eine wichtige Rolle. Zum einen gehören dazu die Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie, wie z.B. ICAM-1, zum anderen sind die Integrine zu nennen, die aus 2 Untergruppen (α - und β - Untereinheit) bestehen⁸⁸. Es gibt 18 α - Untereinheiten und 8 β - Untereinheiten, die durch unterschiedliches Kombinieren zu insgesamt 24 verschiedenen Integrinen zusammengesetzt werden können¹⁰². Integrine sind bidirektionale Rezeptoren, das bedeutet, dass Signaltransduktion nach Bindung eines Liganden in Richtung des Zellinneren verläuft (outside-in signaling), aber hat auch daraus folgend eine Wirkung aus der Zelle heraus (inside-out signaling)^{102,103}. Bei der Adhäsionskaskade sind die Integrine zunächst in einem inaktiven Zustand und werden durch Chemokine in die aktivierte Form versetzt. Nun können die Leukozyten über Interaktionen der Integrine an unterschiedlichen Schritten der Adhäsionskaskade mitwirken. So bindet das Integrin VLA-4 (very late antigen-4) nach Aktivierung an VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) und unterstützen den Schritt des Rollens in den postkapillären Venolen¹⁰⁴. Andere Integrine, die in den weiteren Schritten der Adhäsionskaskade eine Rolle spielen, sind auf der Endothelseite VCAM-1 und ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule 1). An diese können die β_2 - Integrine LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1)⁷⁵ und Mac-1 (macrophages-1 antigen)¹⁰⁵ binden. Ein Defekt der β_2 - Integrine

führt zu dem Krankheitsbild der LAD (leukocyte adhesion deficiencies), das durch die fehlende Adhäsion der Leukozyten gekennzeichnet ist und die damit einhergehende Infektanfälligkeit und Leukozytose¹⁰⁶. In der Veterinärmedizin gibt es auch ein Pendant zu diesem Krankheitsbild, die sogenannte BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency)¹⁰⁷. Die 1983 bei Holsteinrindern beschriebene, erblich bedingte, tödlich verlaufende Erkrankung, bei der es auch wegen eines Defekts der β_2 -Integrine zu einer fehlenden Adhäsionsfähigkeit kommt. BLAD-Tiere erkranken an unspezifischen chronischen Infektionen und sterben meist innerhalb der ersten Lebensjahre. Charakteristisch ist auch hier eine persistierende Leukozytose¹⁰⁸.

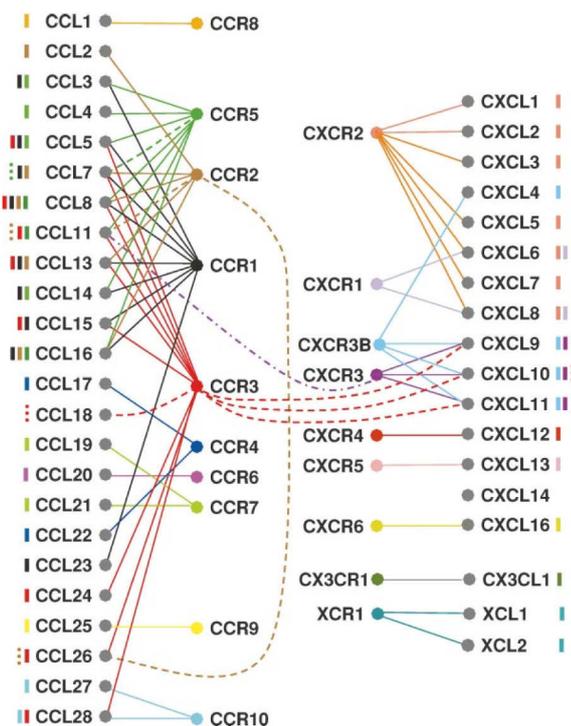


Abbildung 7: Chemokinklassen mit ihren unterschiedlichen Rezeptoren¹⁰⁹

In der linken Spalte sind die bisher bekannten Chemokine gelistet, die jeweils mit ihrem Rezeptor verbunden sind.

Wie schon beschrieben, werden die Integrine durch Chemokine aktiviert. Chemokine fallen unter die Cytokine und sind chemotaktische Proteine, die u.a. Migrationsverhalten fördern und Immunzellen, besonders Phagozyten und Lymphozyten, aktivieren^{88,110}. Hauptsächlich werden diese von Leukozyten, Endothelzellen und Bindegewebszellen gebildet¹⁰⁹. Sie binden an den jeweiligen Chemokinrezeptor, der zu den G-Protein- gekoppelten Transmembran- Rezeptor¹¹¹ gehört und nach Bindung eine Signaltransduktion in der Zelle auslösen, die bspw. zur Zellbewegung führt¹⁰⁹. Die klassischen inflammatorischen Cytokine wie IL-1, TNF- α ,

IFN γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 und IL-17, die durch eine Verletzung oder Infektion freigesetzt werden, stimulieren wiederum über ihre Rezeptoren die Produktion vieler verschiedener Chemokine^{110,112-114}. Die Chemokine können in die beiden Kategorien inflammatorische und homöostatische Chemokine eingeteilt werden. Die inflammatorischen Chemokine, die Leukozyten aufgrund von Stressoren, wie oben genannt, rekrutieren. Dem gegenüber stehen die homöostatischen Chemokine, die verantwortlich sind für die Leukozytenwanderung im gesundem Gewebe und die Strukturierung in lymphoiden Organen^{115,116}.

Die weitere Einteilung der Chemokine in vier Klassen erfolgt aufgrund ihrer Struktur und Anzahl der Cysteinreste im Molekül. Die beiden Hauptgruppen sind zum einen die CC- Chemokine, bei denen die Cysteinreste direkt aneinander liegen. Wichtige Vertreter hierfür sind das CCL2 (MCP-1), CCL-3 (MIP-1) und CCL5 (RANTES), die alle in der Rekrutierung der Immunzellen eine Rolle spielen. Die andere Klasse ist die der CXC- Chemokine, welche noch eine Aminosäure zwischen den beiden Cysteinresten enthält. Darunter fällt das CXCL8 (IL-8). Die beiden letzten kleinen Unterklassen sind die C- Chemokine, die nur ein Cystein besitzen und die CXXXC (CX₃C)- Chemokine, die drei Aminosäuren zwischen den Cysteinresten enthalten^{88,113,117,118}. Sein bekanntester und bisher auch einziger Vertreter ist das Fraktalkin (CX3CL1)^{119,120}.

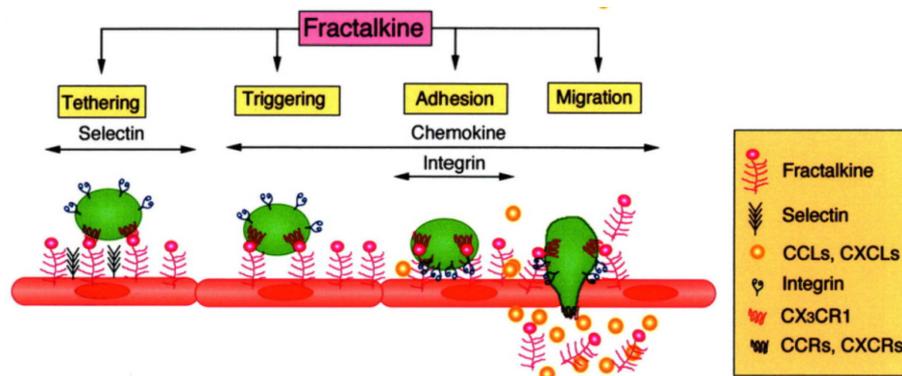


Abbildung 8: Rolle des Fraktalkins in der Adhäsionskaskade

Darstellung des Einflusses von Fraktalkin in allen Schritten der Adhäsionskaskade im Gefäßsystem und das Vorkommen zweier Formen des CX3CL1: die membrangebundene und die lösliche Form.

mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: ATVB¹²¹, Copyright (2004)

Das Fraktalkin kommt in zwei Formen vor, einer membrangebundenen Form, als Adhäsionsmolekül¹¹⁹, und in einer löslichen Form, mit einer chemotaktischen Wirkung¹²². Die membrangebundene Form wird erst durch ein mit inflammatorischen Cytokinen (TNF- α , IL-1 und IFN γ) aktiviertes Endothel externalisiert¹¹⁹. Die lösliche Form

entsteht durch proteolytische Abspaltung der membrangebundenen Form durch TNF- α - converting enzyme (TACE) und ADAM10^{123,124} und hat eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten, natürliche Killerzellen (NK) und T- Zellen¹¹⁹. Die membrangebundene Form bewirkt eine schnellere und vor allem Selektin-unabhängige Bindung von Fraktalkin-Rezeptor-bildenden Zellen (Monozyten, Lymphozyten) und damit eine feste Adhäsion am Endothel^{122,125}. Durch Bindung von zytotoxischen T- Zellen an den Fraktalkin-Rezeptor schütten diese Zellen ihre Granula, die mit Perforin und Granzym B gefüllt sind, aus und wirken zerstörend auf die umliegenden Endothelzellen. So fungieren diese als vaskuläre Eintrittspforte für die zytotoxischen Effektorzellen, die so leichter ins Gewebe einwandern können. Über IFN γ wird die Th1- Antwort in Gang gesetzt und weiteres Fraktalkin freigesetzt. Membrangebundenes Fraktalkin vermittelt auch die Transmigration von Fraktalkin-Rezeptor exprimierenden Zellen ins Gewebe¹²¹. In verschiedenen Studien wurde auch ein Effekt auf die Monozyten-Migration beschrieben. Die CD14^{low}CD16⁺- Monozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den Fraktalkin-Rezeptor und gehen Bindungen mit Fraktalkin-bildenden Zellen ein. Außerdem bewirkt eine Fraktalkin- Freisetzung für diese Zellen eine transendotheliale Migration^{43,126}. CX3CL1 spielt in einigen Erkrankungen eine Rolle: so wird bspw. bei der rheumatischen Arthritis in den Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und dendritischen Zellen Fraktalkin exprimiert und trägt zu dem Krankheitsbild bei. Das Ziel ist den genauen Wirkmechanismus des Fraktalkins zu erforschen, um geeignete Therapieformen zu entwickeln^{121,127}.

Um relativ schnell auf einen Entzündungsreiz bzw. ein pathogenes Agens reagieren zu können, zirkulieren die Immunzellen als Teil der kontinuierlichen Immunüberwachung im Grundzustand im Gefäßsystem. Die Haut, als größtes Organ, fungiert als äußere Schutzhülle zur Umwelt und setzt eine intakte Immunabwehr voraus. Gerade in der vaskulären Zirkulation der Haut (siehe Abbildung 9) besteht eine konstante Expression von E- und P- Selektin, die das basale Rollen von neutrophilen Granulozyten unterstützt¹²⁸. Damit ist ein sensibler Mechanismus zur Detektion von Infektionen oder sonstigen Ungleichgewichten in der Immunabwehr gewährleistet, der schnell auf einen Stimulus reagieren kann. Dabei interagieren die Integrine Mac-1 und LFA-1 auf den Leukozyten mit dem Rezeptor ICAM-1 auf der Endothelseite. Auch die Ly6C^{low}- Monozyten haben, wie unter 1.1 beschrieben, einen patrouillierenden Charakter und betreiben das intravaskuläre Kriechen (crawling) in der Mikrozirkulation auch ohne Stimulus einer Inflammation und tragen somit auch zur Immunüberwachung bei⁵³.

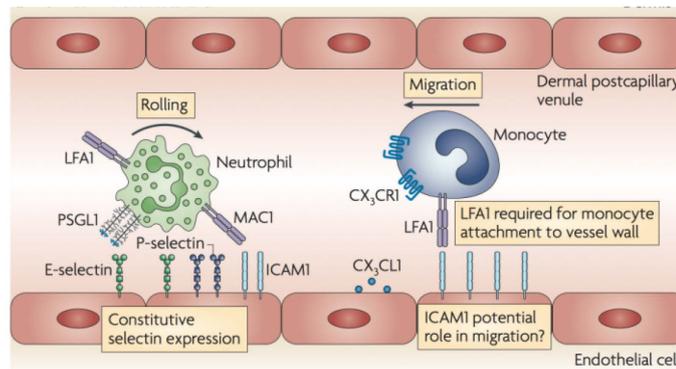


Abbildung 9: Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten und Monozyten in der postkapillären Venole der Haut

Darstellung des Grundzustandes in den postkapillären Venolen in der Haut. Dabei Rollen die neutrophilen Granulozyten über Selektin vermittelte Kontakt entlang des Endothels in der Venole. Zusätzlich exprimieren diese Zellen LFA1 und MAC1, die über ICAM1, welches stetig auf dem Endothel vorhanden ist, in Kontakt treten. Die Monozyten patrouillieren dabei über CX3CL1- Interaktionen. Zusätzlich besitzen Monozyten auch LFA1 auf ihrer Zelloberfläche, das mit ICAM1 auf dem Endothel in Kontakt tritt.

mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology¹²⁹, Copyright (2009)

Carlin et al konnte zeigen, dass patrouillierende Monozyten bei einem Entzündungssignal über TLR-7 (Toll- like- Rezeptor-7) Fraktalkin exprimieren und eine Retention von Monozyten bewirken⁵⁶. Diese locken über TLR-7 und die Freisetzung von Chemokinen, wie CXCL1 und TNF- α , neutrophile Granulozyten an. Diese bewirken eine fokale Nekrose im Endothel durch die Freisetzung ihrer Granula, welche die Monozyten zur Beseitigung der Zellfragmente stimuliert. Der ganze Prozess findet vollständig intravaskulär statt, so dass den Ly6C^{low}- Monozyten auch eine Wächterfunktion im Gefäßsystem nachgesagt werden kann.

2.2. Interstitielle Migration

Um eine erfolgreiche Immunantwort aufrecht zu erhalten, müssen die Zellen nicht nur über die Adhäsionskaskade aus dem Gefäßsystem ins interstitielle Gewebe übertreten (siehe Kapitel 2.1), sondern auch anschließend gerichtet an den Ort der Inflammation gelangen. Die interstitielle Leukozyten-Navigation ist wichtig für die erfolgreiche Immunüberwachung im Gewebe, bei der Gewebsreparatur, der Pathogenbekämpfung und der Beseitigung von Tumorzellen im Organismus¹²⁸. Dabei wird die Wanderung im

Gewebe als interstitielle Migration bezeichnet, die abhängig von der Gewebeart und Zelltypus ist¹³⁰. Die Faktoren, die die Zellgestalt und die direkte Migration beeinflussen, wurden über die Zellkultur ermittelt. Gerade durch die Konfokalmikroskopie und 2-Photonentechnik konnten in den letzten Jahren das Verständnis über das Leukozytenverhalten im Gewebe von Nagern und Zebrafischen *in vivo* verbessert werden¹³¹⁻¹³³. Ihr Vorteil liegt in der 3-dimensionalen Darstellung und das Vorhandensein der vollständigen physiologischen Leitstrukturen, die eine Zellkultur nicht ersetzen kann.

Die Leukozyten migrieren im Gewebe in Form einer „amöboiden“ Bewegung. Dabei verändern expansive und kontraktile Kräfte die Zellform und bewirken daraus folgend eine Vorwärtsbewegung. Grundsätzlich kann die interstitielle Migration in Adhäsions-abhängig und Adhäsions- unabhängig unterteilt werden. Leukozyten wandern *in vivo* hauptsächlich über den Aktin-protrusiven (vorstülpenden) und Integrin-unabhängigen Migrationsmodus¹³⁴. Gerade durch ihre wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr wird über die neutrophilen Granulozyten und deren Migrationsmuster viel geforscht¹³⁵.

Die erste Hürde, die von den Leukozyten bei der Transmigration überwunden werden muss, wird als Perivaskuläre-Extravasations-Einheit (PVEU) zusammengefasst. Diese setzt sich aus Endothelzellen, Perizyten, perivaskulären Makrophagen, Mastzellen und der Basalmembran (BM) zusammen (siehe Abbildung 10). Die Basalmembran umhüllt die postkapillären Venolen und trägt zu deren Stabilität bei. Die Perizyten sind in die BM integriert¹³⁶ und variieren in ihrer Dichte abhängig von Gefäßtypus und Gefäßbett. In der Gefäßwand gibt es Bereiche mit einer geringeren Dichte an Matrixproteinen, die als low expression regions (LERs) bezeichnet werden. In diesen Lücken befinden sich auch Perizyten, die über ICAM-1, LFA-1 und MAC-1 die Migration von neutrophilen Granulozyten ins Interstitium vermitteln¹³⁷. Dabei bilden sie ein sogenanntes Uropod aus, welches über die Basalmembran und LFA-1 eine lose Bindung eingeht, bis die neutrophilen Granulozyten ins Gewebe übertreten¹³⁸. Perivaskuläre Makrophagen, die in der Haut¹³⁹ beschrieben sind, bedecken die PVEU von außen. Bisher ist noch wenig über ihre Funktion bekannt. Eine Studie beschreibt bei einer bakteriellen Hautinfektion mit *Staphylococcus aureus*, dass die perivaskulären Makrophagen die feste Adhäsion bis zur Transmigration von neutrophilen Granulozyten regulieren¹⁴⁰. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die neutrophilen Granulozyten bevorzugt in der Nähe dieser Makrophagen austreten, da diese nach Aktivierung Chemokine (CXCL1 und CXCL2) ausschütten¹⁴⁰. Dies erklärt auch die Beobachtung weshalb neutrophile Granulozyten

an bestimmten Stellen (Hotspots) entlang der postkapillären Venole austreten¹⁴¹. Zusätzlich gehören der PVEU noch die Mastzellen an. Diese fungieren als Sensoren für mikrobielle Invasionen, durch die Expression von TLRs auf ihrer Oberfläche. Nach deren Bindung sind diese aktiviert und können ihre Granula in das umgebende Gewebe freisetzen¹⁴². Die Granula enthalten proinflammatorische Cytokine wie TNF, IL-6, Chemokine (CXCL1 und CXCL2) und vasoaktive Faktoren, wie bspw. das Histamin, und tragen somit auch zur Anlockung und zum leichteren Übertritt von Immunzellen ins Gewebe bei¹⁴². Sobald die neutrophilen Granulozyten ins Gewebe übertreten, treffen sie auf eine Bandbreite an promigratorischen und antimigratorischen Faktoren, die noch unzureichend charakterisiert sind. Genauso sind Substanzen wie Chemokine, DAMPs von nekrotischen Zellen, z.B. fMLP (*N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin) und Peptide aus den Gewebsfasern, Lipide und Komplementfaktoren vorhanden. Hier muss sich die Zelle neu orientieren, um möglichst schnell an den Ort der Inflammation zu gelangen.

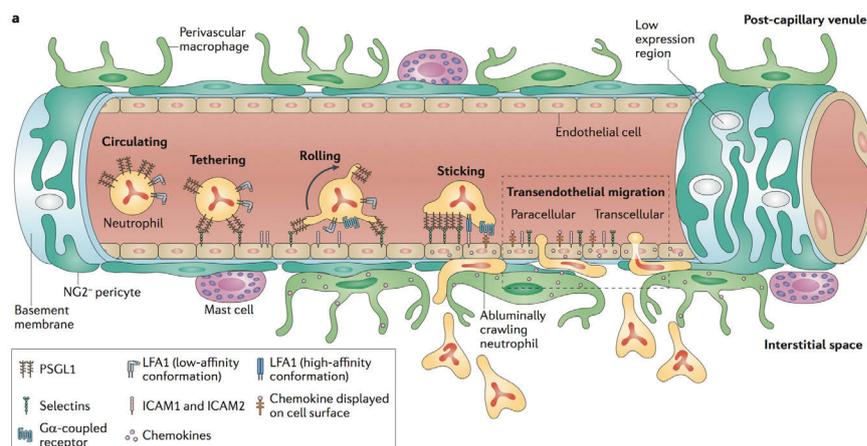


Abbildung 10: Die perivaskuläre Extravasation bei der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten

Darstellung der PVEU (Perivaskuläre Extravasations Einheit) bestehend aus Endothelzellen, Basalmembran, Perizyten, perivaskulären Makrophagen und Mastzellen sowie der klassischen Adhäsionskaskade mit ihren verschiedenen Stufen bis zum Übergang ins Gewebe. Der Übertritt ins Gewebe kann über den paracellulären oder transzellulären Weg von statten gehen. Zusätzlich können über LER (low expression regions) neutrophile Granulozyten gegen die Flussrichtung ins Gewebe übertreten. Die perivaskulären Makrophagen können den Zellen bei der Migration assistieren, so dass diese vor allem dort übertreten. Mastzellen dienen als Detektoren für inflammatorische Prozesse, da sie bei einer Stimulation den Inhalt ihrer Granula freisetzen.

mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology¹³⁵, Copyright (2014)

Dabei gibt es unterschiedliche Migrationsmuster und Geschwindigkeitsprofile myeloider Zellen, die sich im Gewebe in einem Gleichgewicht bewegen. So besitzen Zellen, die sich frei im Interstitium befinden, eine höhere Geschwindigkeit (3- 30 $\mu\text{m}/\text{min}$), als Zellen, die über Integrine mit ihrer Außenwelt oder anderen Zellen in Kontakt treten. Dabei werden nur noch Geschwindigkeiten von 1-3- $\mu\text{m}/\text{min}$ erreicht. Findet eine feste Adhäsion über Integrine statt, werden kaum noch Bewegungen registriert ($< 1\mu\text{m}/\text{min}$)¹³⁰.

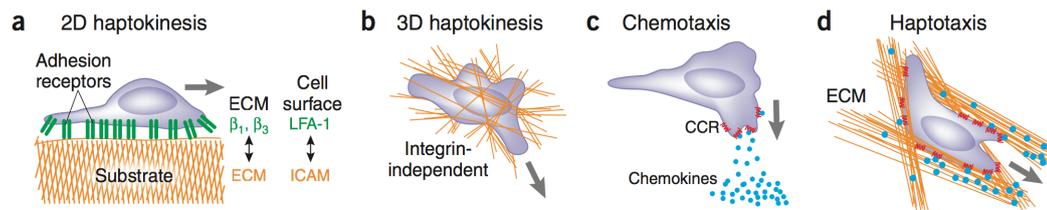


Abbildung 11: Prinzip der Leukozyten-Substrat Interaktion

Die beiden ersten Abbildungen stellen die zwei Formen der Haptokinese dar, die entweder Integrin-abhängig über Zelloberflächen verläuft **a)** oder durch die vorhandene Begrenzung im Gewebe integrin-unabhängig abläuft **b)**. Abbildung **c)** zeigt die Chemotaxis einer Zelle aufgrund eines Chemokingradienten auf den Stimulus zu. Die Haptotaxis verläuft gerichtet über Leitstrukturen, die mit chemoaktiven Substanzen versetzt sind. **d)**

mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Immunology¹³⁰, Copyright (2008)

Allgemein besteht die Annahme, dass migrierende Zellen verschiedene Möglichkeiten besitzen, sich fortzubewegen. Zum einen können sie einem löslichen Gradienten vom Ort der niedrig zur hohen Konzentration folgen. Dabei kann die Bewegung gerichtet sein (Chemotaxis, siehe Abbildung 11 c) oder ungerichtet (Chemokinese). Zum anderen kann die Migration an Leitstrukturen gebunden sein, wie sie in der extrazellulären Matrix oder auf Zellen vorkommt. Die Haptotaxis stellt dabei eine gerichtete Bewegung dar, die anhand von gebundenen chemoaktiven Lockstoffen sowohl Adhäsionsgebunden als auch -ungebunden sein kann. Die Gradienten, die hierfür aufgebaut werden sind entscheidend für die Migration der Leukozyten durch das Interstitium (siehe Abbildung 11 d).

Die Haptokinese verläuft ungerichtet entweder auf Zelloberflächen (2D) oder im dreidimensionalen (3D)-Raum. Dabei ist die Wanderung auf Zelloberflächen (2D) abhängig von Integrin-Bindungen (siehe Abbildung 11a). Im Gewebe (3D) wird die Beweglichkeit der Zelle nahezu adhäsionsunabhängig bewerkstelligt, da der räumlich-begrenzte Raum durch Strukturfasern im Gewebe den migrierenden Leukozyten

ausreichende Begrenzungen bietet, in denen sie sich ausrichten können (siehe Abbildung 11b).

Neutrophile Granulozyten navigieren durch das Interstitium mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 10 $\mu\text{m}/\text{min}$. Bevor sie am Ort des Stimulus ankommen, werden sie in ihrer Geschwindigkeit gedrosselt, so dass die Bildung von NETs und die Phagozytose möglich werden¹⁴³. Je nach dem auslösenden Agens zeigen neutrophile Granulozyten unterschiedliche Migrationsverhalten: So bilden sie bspw. bei einer Gewebsverletzung stabile Cluster mit einem Randsaum aus, um den Schaden zu begrenzen^{78,144,145}. Ist der Reiz durch eine Infektion verursacht, zeigen die neutrophilen Granulozyten ein schwärmendes Verhalten¹⁴⁶.

Gerade intravitalmikroskopische Beobachtungen haben verschiedene Konzepte hervorgebracht. Ein Modell in der Haut ist in Abbildung 12 dargestellt. Die mehrstufige Kaskade koordiniert die Clusterformationsbildung über die Schritte der Erkennungsphase (scouting), der Verstärkungs- (amplification) und der anschließenden Clusterstabilisierungsphase (stabilization).

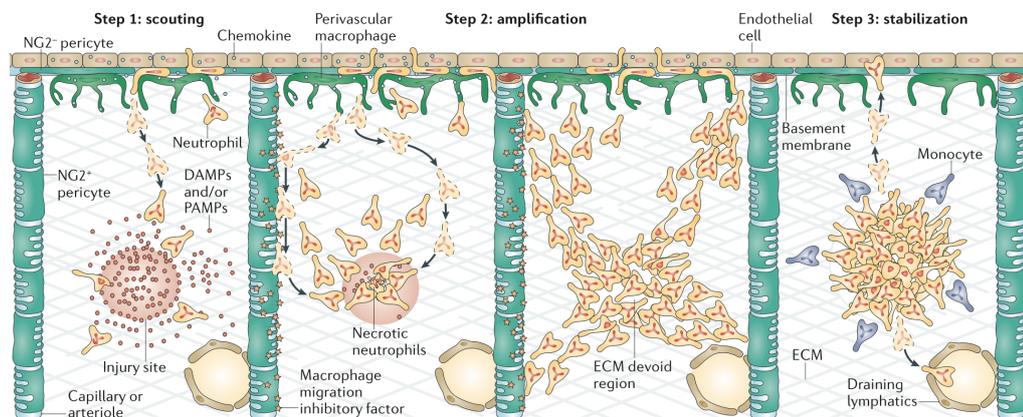


Abbildung 12: Die 3 Phasen der myeloiden Leukozytenrekrutierung in der Haut

Visualisierung der 3 Stufen bei der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in der Haut. Dabei umfasst die erste Stufe die Erkennungsphase, in der die ersten neutrophilen Granulozyten den Stimulus registrieren und mit der Freisetzung von Chemokinen reagieren. In der zweiten Stufe, der Verstärkerphase, werden immer mehr neutrophile Granulozyten angelockt. Zuletzt folgt die Stabilisierungsphase, in der auch Monozyten zum Stimulus folgen. Außerdem wird die Anlockung weiterer Zellen durch Clusterbildung verhindert.

mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology¹³⁵, Copyright (2014)

In der Erkennungsphase (scouting) erfassen eine kleine Anzahl an neutrophilen Granulozyten, die in der Nähe der Verletzung sind, den Schaden und migrieren, über die in Kapitel 2.1 beschriebene Adhäsionskaskade, ins Gewebe. Dabei werden sie von den freigesetzten DAMPs angezogen und bilden einen schmalen Ring (Cluster) um die Verletzung. Sie werden als „Wegbereiter-Zellen“ für die kommenden Schritte gesehen^{78,145}. Nachdem die ersten neutrophilen Granulozyten am Gewebeschaden angekommen sind, kommt es dort zu deren Zelltod, wodurch die zweite Phase eingeleitet wird, die Verstärkerphase (amplification). Nun werden durch die Freisetzung von Chemokinen, die bei der Apoptose der neutrophilen Granulozyten entstehen, weitere Zellen angezogen. Ein Schlüsselmolekül stellt dabei das Leukotriene B4 (LTB4) dar, das als parakrines Kommunikationssignal zwischen den neutrophilen Granulozyten andere neutrophile Granulozyten über längere Distanzen (200- 300 µm) rekrutieren kann und somit Integrin-unabhängig ist¹⁴⁵. Zusätzlich können die neutrophilen Granulozyten auch über Perizyten, welche die Gefäße umhüllen und das Chemokin Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) bei einem Entzündungsreiz freisetzen, angezogen werden¹⁰⁰. MIF spielt eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen und hat eine ähnliche Struktur zu IL-8¹⁴⁷. Ein weiteres Molekül ist das NAD (Nicotinamid- Adenin- Dinukleotid), welches von absterbenden Zellen freigesetzt wird und einen Einfluss auf die Migration von neutrophilen Granulozyten hat¹⁴⁸. Die Clusterbildung der neutrophilen Granulozyten bewirkt eine Umstrukturierung der Extrazellulären Matrix in eine Kollagenfaser-freie Zone, die eine abgeschwächte Anlockung weiterer Zellen bewirkt¹⁴⁵.

In der finalen Phase kommt es zu einer zirkulären Stabilisierung des Zellhaufens um den Entzündungsreiz. Integrine und verschiedene Rezeptoren, wie CXCR2, FPR2 und LTB4- Rezeptor, vermitteln dabei die Migration und Retention der neutrophilen Granulozyten in der kollagenfaserfreien Zone¹⁴⁵. Durch die späte Rekrutierung der Monozyten an den Rand des Clusters, wird die erneute Anlockung neuer neutrophiler Granulozyten verhindert und die Auflösungsphase eingeleitet¹⁴⁵.

Die Wanderung von Immunzellen stellt einen komplexen Prozess dar, den es gerade *in vivo* noch näher zu ergründen gilt, um Pathomechanismen und Autoimmunerkrankungen besser zu verstehen. Die Angriffspunkte herauszuarbeiten, sollte das Ziel für die Zukunft sein, um Einfluss auf verschiedene Krankheitsbilder zu nehmen.

3. Modelle der sterilen Inflammation

Es gibt zwei geeignete Modelle, um die sterile Entzündung *in vivo* in der Mikrozirkulation mit Hilfe des Zwei-Photonenmikroskops zu visualisieren. Zum einen ist das Cremastermodell nach Baez et al¹⁴⁹ zu nennen und zum anderen das Ohrmodell nach Ng et al¹⁵⁰. Bei beiden Modellen ist es möglich zelluläre Interaktionen zu beobachten, die aufgrund einer sterilen Entzündung hervorgerufen werden.

Das Cremastermodell wurde bei Khandoga et al¹⁵¹ eingesetzt, um *in vivo* die Leukozytenmigration im entzündeten Gewebe darzustellen und quantitativ auszuwerten. Dabei wurden chemotaktisch wirkende Substanzen, wie PAF injiziert, um einen Entzündungsreiz zu simulieren und das darauffolgende Migrationsmuster der verschiedenen Leukozytensubtypen (neutrophile Granulozyten und Monozyten) zu analysieren.

Eine weitere Möglichkeit die Leukozytenmigration in der Haut der Maus *in vivo* darzustellen, besteht mit dem Ohrmodell, das Ng et al¹⁵⁰ sowie Roediger et al¹⁵² etabliert haben und welches Langzeitaufnahmen von mehr als vier Stunden ermöglicht^{78,150}. Mit diesem Ansatz ist es möglich, bis zu fünf verschiedene zelluläre (Fluoreszenz- gefärbte Zellen) und strukturelle Bestandteile (Kollagenfasern, Blutgefäße) in der Haut zu untersuchen^{150,153,154}. Das Ohrmodell kann leicht auf viele biologische Fragenstellungen, wie der Dynamik der Zellmigration, Zell-Zell-Interaktionen und Wirtszell-Pathogen-Wechselwirkung, angewendet werden. Mit der Verfügbarkeit vieler fluoreszierender Reporter-Mäuse^{132,155} und dem schnellen Fortschreiten in der Entwicklung von *in vivo* zell- und gewebespezifische Markierungstechniken, hat man die Möglichkeit unterschiedliche Bereiche zu untersuchen. Die Methode wurde schon bei unterschiedlichen Fragestellungen herangezogen, wie bei der Visualisierung der Zellantwort von dendritischen Zellen bei *Leishmania major* Infektion¹⁵⁰. Eine weitere Studie untersuchte die T- Zell-Lymphom-Migration in der Haut¹⁵³. Außerdem wurde das T- Zellverhalten in der Haut charakterisiert¹⁵⁴ und die neutrophilen Granulozyten Funktion in Abhängigkeit einer sterilen Entzündung untersucht⁷⁸.

Die großen Vorteile der Methode sind die gute Erreichbarkeit des Ohres für die Mikroskopie und die schnelle, gut reproduzierbare Präparation für die Intravitalmikroskopie (IVM). Des Weiteren ist das Immunsystem der Haut durch immunhistochemische Untersuchungen, FACS-Analysen und Zellkultur weitreichend charakterisiert¹⁵⁶⁻¹⁵⁸, so dass auf dieser Grundlage die Interpretation der aus der IVM

gewonnenen Daten gestützt werden kann.

Die sterile Entzündung wird durch einen Laserstrahl induziert, der für eine kurze Zeit auf einen begrenzten Bereich (40 μm x 40 μm) fokussiert wird. Dieser Bereich ist durch Autofluoreszenz gekennzeichnet¹⁵⁹, so dass dieser bei der Erstellung der Videos gut sichtbar dargestellt werden kann. Die Laserverletzung entsteht durch die Hitzeeinwirkung auf das Gewebe und dem daraus resultierenden Gewebsuntergang, der einer sterilen Entzündung identisch ist. Nach dem Setzen des Stimulus ist es möglich, sowohl die einzelne Zelle in ihrem Migrationsmuster zu beobachten, als auch die Zelle im Gesamtkontext bezogen auf ihr Umfeld im Organismus zu analysieren⁷⁸.

III. ZIELSETZUNG

Der Mechanismus der Inflammation ist eine bedeutende Reaktion unseres Immunsystems und beinhaltet ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Immunzellen und deren Mediatoren⁹. Die sterile Entzündung stellt die pathophysiologische Grundlage einer Vielzahl an Erkrankungen dar, so dass der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung dieses Prozesse *in vivo* liegt. Das Wissen über die intravaskulären Zusammenhänge bei der Entzündungsreaktion ist bereits im Detail erforscht. Über das Verhalten der Zellen im Gewebe ist bisher immer noch wenig bekannt. So ist das Ziel der hier vorliegenden Arbeit, die Kommunikation der myeloiden Zellpopulationen in ihrer Wanderung im Gewebsraum näher zu betrachten und Interaktionen sowie Abhängigkeiten heraus zu arbeiten. Dies soll zuerst *in vivo* durch intravitalmikroskopische Untersuchungen erforscht und anschließend *in vitro* Quellen für wichtige Stimuli in dem Migrationsverhalten herausgearbeitet werden.

Folgende Punkte wurden in dieser Arbeit dabei näher betrachtet:

1. **Charakterisierung des Zusammenspiels von neutrophilen Granulozyten, Monozyten/ Makrophagen und Thrombozyten bei der sterilen Inflammation**

Hier soll das Zusammenspiel der Thrombozyten und myeloide Zellen als Immunzellen der angeborenen Immunabwehr bei einer sterilen Entzündung näher analysiert werden. Bisher ist viel über die Interaktionen im Gefäß und deren molekularen Mechanismen bekannt. Über das Verhalten der Zellen im Gewebe und auch deren Interaktion zwischen den einzelnen Populationen ist bisher noch wenig erforscht. Gerade auch in Hinblick wie sich die Zellpopulationen gegenseitig beeinflussen soll mit Hilfe der 2-Photonentechnik im Gewebe *in vivo* visualisiert und analysiert werden.

2. Analyse der intravaskulären und interstitiellen Interaktionen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten

Des Weiteren soll der Fokus der Arbeit in dem Zusammenspiel der neutrophilen Granulozyten mit den Monozyten im Gefäß und nach deren Austritt ins Gewebe sein. Eine Fragestellung wird die gegenseitige Beeinflussung der beiden myeloiden Zellpopulationen sein, die durch Depletion mittels eines Antikörpers die jeweiligen Zellpopulationen herauslösen und so beantwortet werden soll. Nicht nur im Gefäßsystem soll beobachtet werden inwiefern sich die Zellzahlen verändern, sondern es soll auch zwischen Gefäß und Interstitium differenziert werden. Durch Verfolgung der Zellen im Gewebe soll zusätzlich auch das interstitielle Bewegungsmuster der beiden Zellpopulationen jeweils betrachtet werden und gegenübergestellt werden zu der Gruppe die durch das Fehlen der einen Zellfraktion gekennzeichnet ist.

3. Untersuchung der Rolle des Chemokins Fraktalkin bei der sterilen Inflammation

Das Chemokin Fraktalkin spielt eine wichtige Rolle in der Transmigration von Monozyten. Ob Fraktalkin auch im Gewebe und bei der interstitiellen Migration eine Rolle spielt soll hier näher betrachtet werden. Dafür sollen hier weitere Quellen von Fraktalkin im Gewebe herausgearbeitet werden, die Zellen bei der Migration durch das Gewebe assistieren.

4. Bestimmung der Bedeutung von HMGB1 für die Immunzellrekrutierung bei der sterilen Entzündung

HMGB1 stellt als DAMP einen starken Stimulus für einen Entzündungsreiz bei der sterilen Inflammation dar. Da es auch zu überschießenden Reaktionen führen kann liegt ein Schwerpunkt darin in diesen Mechanismus eingreifen zu können. Der Effekt von BoxA als ein Inhibitor von HMGB1 auf das Verhalten der myeloiden Leukozyten im Gewebe soll analysiert werden.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Tiere

1.1. Haltung, Zucht und Hygienemanagement

Dieser Arbeit liegen in vivo Versuche an der Maus zugrunde. Die Wahl für die Maus als Versuchstier begründet sich durch die Verfügbarkeit transgener Linien, die einfache Haltung und deren Zucht mit kurzen Generationszeiten. Gerade durch ihre geringe Körpergröße ist die Handhabung mit der Maus einfach und für die Zwecke in der intravitalmikroskopischen Untersuchung ideal.

Die Tiere stammen für die gesamten Experimente aus der Eigenzucht in der Tierhaltung der Medizinischen Klinik und Poliklinik I in München. Im Tierhaltungsbereich erfolgt die Haltung und Zucht der Mäuse unter SPF- Bedingungen (spezifisch- pathogen- frei). Dies beinhaltet ein geschlossenes Barriersystem mit Personalschleuse, Materialschleuse, Durchreichautoklav, Wasserperoxidschleuse und einer Überdruckbelüftung. Der Käfigwechsel findet im wöchentlichen Turnus, mit 80°C heißem Wasser gewaschenen und anschließend bei 121°C autoklavierten Käfigen, statt. Die Haltung der Mäuse erfolgt in einem IVC-System THKB-M2V-M Polysulfonkäfigen Typ M II (Techniplast, Hohenpeißenberg) mit max. 3 Tieren/ Käfig. Die Käfige dürfen ausschließlich unter den Umsetzstationen geöffnet werden. Die Tiere erhalten Standardfutter für Labornager (Haltungsfutter V 1536) *ad libitum*, Wasser steht den Tieren aus Tränkeflaschen unbegrenzt zur Verfügung. Zuchttiere erhalten ein hochkalorisches Zuchtfutter. Futter, Einstreu und Wasser werden grundsätzlich in die Tierhaltung autoklaviert. Die Mäuse erhalten als Enrichment zertifiziertes, grobes Einstreu (Abbed Nestbaumaterial) und Mäusehäuschen aus rotem Kunststoff. Die Raumtemperatur beträgt 21°C und die Luftfeuchtigkeit 68%. Das Lichtprogramm erfolgt über einen 12h-Zeitschalter für die Beleuchtung im Tag-Nacht-Rhythmus.¹⁶⁰ Der SPF-Status der Tiere wird regelmäßig mit Hilfe von Sentinel Mäusen überprüft und nach den FELASA Empfehlungen durchgeführt. Der Tierstall ist von der Aufsichtsbehörde abgenommen und AAALAC-zertifiziert.

Das Versuchsvorhaben wurde von der Regierung Oberbayerns gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG. in der Fassung vom 18.Mai 2006) genehmigt (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-23-12).

1.2. Tierstämme

Für die Anfertigung der vorliegenden Dissertation wurden folgende Mäusestämme verwendet:

- C57BL/6J
- CX3CR1-eGFP ki/wt und ki/ki
- LysM-eGFP ki/wt

1.2.1. C57BL/6J

Der Wildtypstamm C57BL/6 ist der am häufigsten verwendete Inzuchtstamm und genetischer Hintergrund vieler transgener Linien.¹⁶¹

Der Stamm kam auch in dem Whole Mount Stainings zum Einsatz, um die Freisetzung des Chemokins Fraktalkins darzustellen.

1.2.2. LysM-eGFP

Um die Technik der Zwei-Photonenmikroskopie zu nutzen, sind in diesem Tierstamm myeloide Zellen mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) durch genetische Manipulation markiert. In dieser Linie des LysM Stammes ist es möglich, multipotente Vorläuferzellen zu untersuchen, in denen myelomonozytäre Zellen mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) markiert sind. Dies wird erzielt durch das Knock-In Gen für das grün fluoreszierenden Protein GFP (enhanced GFP) an die Stelle des murinen Lysozym M (LysM)-Locus. Untersuchungen zeigen, dass vor allem neutrophile Granulozyten die höchste Fluoreszenzintensität aufweisen. Die Tiere weisen eine normale Vitalität und Fertilität auf¹⁶².

In den hier gezeigten Experimenten werden heterozygote Tiere verwendet.

1.2.3. CX3CR1- eGFP

Diese Mauslinie wurde generiert, um die physiologische Funktion von Fraktalkin bei der sterilen Inflammation zu untersuchen. Das Chemokin Fraktalkin (FKN, Neuroactin bzw. CX3CL1) bindet an einen spezifischen Transmembranrezeptor (Fraktalkinrezeptor, CX3CR1), der bei Aktivierung des Endothels und auf Neuronen

exprimiert wird. Da Fraktalkin eine Rolle sowohl bei der Adhäsion als auch als Chemokin spielt, stellt der Rezeptor ein potentielles Ziel für therapeutische Interventionen bei steriler Inflammation dar.

Ein grün-fluoreszierendes (GFP)-Reportergen wurde anstelle des Fraktalkin-Rezeptors in diese Mauslinie transfiziert. Dies ermöglicht bei heterozygoten Tieren die Expression des Fraktalkin-Rezeptors auf Monozyten, Unterarten von natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen und der Mikroglia zu erforschen. In dieser Maus kann *in vivo* das Migrationsverhalten von Zellen mit dieser Rezeptorausstattung untersucht werden¹⁶³.

Bei homozygoten Tieren wird der Fraktalkin-Rezeptor nicht exprimiert, so dass die Bedeutung der CX3CL1-CX3CR1-Achse für die sterile Inflammation *in vivo* untersucht werden kann.

In dieser Arbeit werden heterozygote und homozygote Tiere verwendet.

1.3. Applikationsmöglichkeiten

Um die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Antikörper intravenös zu applizieren, können verschiedene Zugänge an der Maus angewendet werden, die im Folgenden näher beschrieben werden.

1.3.1. Schwanzvenenkatheter

Eine einfache Möglichkeit Substanzen intravenös zu applizieren ist die Schwanzveneninjektion. Zur Injektion eignen sich vor allem eine der beiden lateral verlaufenden Venen (*Venae coccygeae lateralis*), die in Abbildung 13 dargestellt werden.

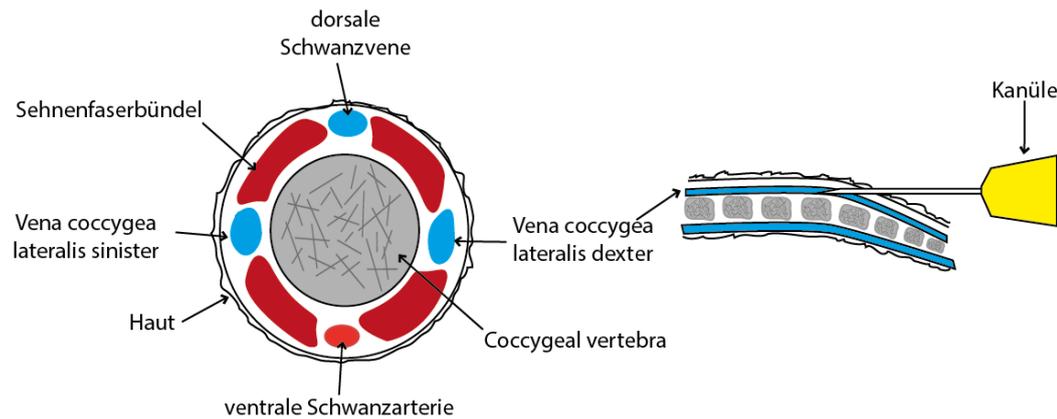


Abbildung 13: Darstellung der anatomischen Strukturen am Mäuseschwanz

Darstellung der anatomischen Strukturen bei dem murinen Schwanz und dem Aufzeichnen des Zuganges bei der Applikation von löslichen Substanzen beim Schwanzvenenkatheter

modifiziert nach „the laboratory mouse“ von Hans J. Hedrich

Zuvor wird ein Katheter hergestellt, der aus zwei Kanülen (30G, BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) und einem etwa 10 cm langen Polyethylenschlauch (Portex, Polythene Tubing, 0,28 mm ID 0,61 mm OD, Smiths Medical International, Hythe, USA) besteht. Dafür wird der Kanüle der Konus entfernt und die Spitze auf den Schlauch gesetzt. An das hintere Ende wird die zweite Kanüle eingefädelt. Nach dem Aufstecken einer 1mL Spritze (B.Braun, Melsungen) und einer Durchgängigkeitskontrolle kann der Katheter eingesetzt werden. Die Maus wird in einer Fixationsvorrichtung (Injektionskäfig, Typ Broome HAR-52-04, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim- Jugendheim) platziert, dabei bleibt der Schwanz der Maus freiliegend. So kann der Schwanz proximal an der Basis mit Hilfe des Zeige- und Mittelfingers gestaut werden. Durch Zuhilfenahme eines warmen Handschuhs werden die Gefäße geweitet. Die Injektionsstelle wird mit Octeniderm® (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) desinfiziert und der Katheter unter Zuhilfenahme eines Nadelhalters in die Schwanzvene platziert. Nun kann die gewünschte Substanz intravenös appliziert werden.

1.3.2. Femoraliskatheter

Da über einen langen Zeitraum Videos erstellt werden, muss wiederholt Fluoreszenzfarbstoff nachgegeben werden, da dieser, je nach gewähltem Farbstoff, oft ausbleicht (bleaching) und damit eine nicht gleichbleibende Qualität der Aufnahme gewährleistet werden kann. Dafür bietet sich ein Verweilkatheter, wie der Femoraliskatheter, an.

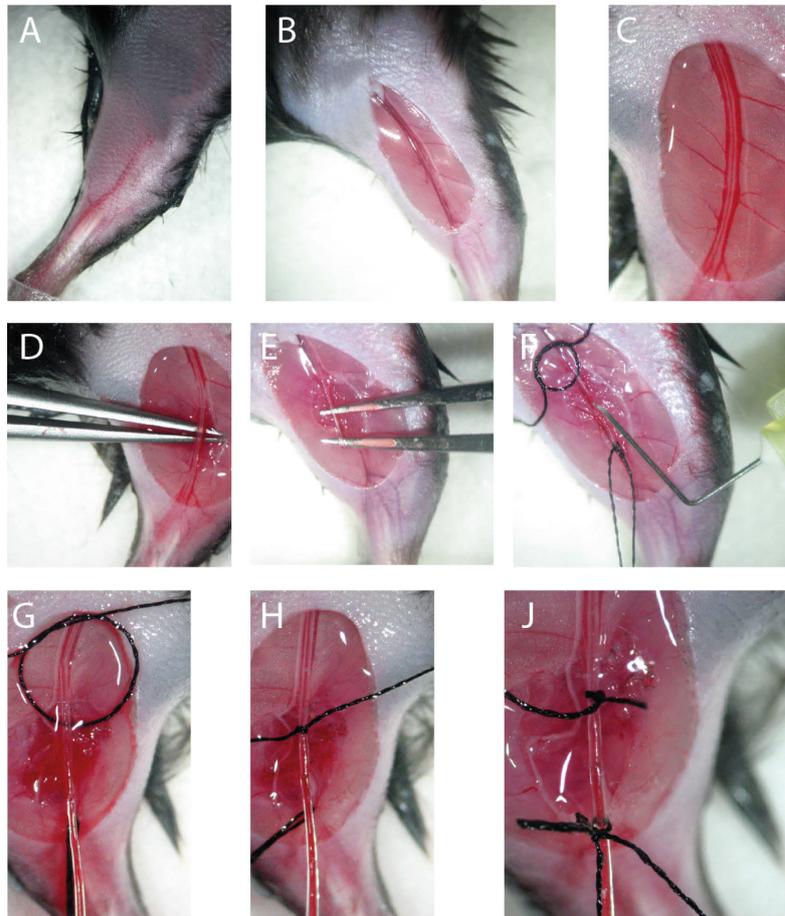


Abbildung 14: Durchführung des Femoraliskatheters mit seinen einzelnen Operationsschritten

A) Enthaarung und Desinfektion des OP-Feldes, B) Hautschnitt proximal des Kniegelenkes, C) Darstellung der A. und V. femoralis mit dem Nervus femoralis, D) und E) Freipräparation der Arteria femoralis durch vorsichtiges Öffnen und Schließen der Pinzette, F) Vorlegen zweier Fäden zur späteren Fixation des Katheters und nach Setzen des Aneurysmas Platzierung der Einstiegsöffnung proximal des distalen Haltezügels, G) Nach richtigem Sitz des Katheters, H) wird der proximal vorgelegte Knoten verschlossen, J) es folgt der Verschluss des distalen Haltezügels zur optimalen Fixation des Katheters mit einem Einzelheft

Die Operation wurde komplett unter einer Stereolupe (Stemi 2000, Zeiss, Jena) mit einer durch die Schwanenhalslampe (Schott Kaltlichtquelle KL200, Schwanenhals-

Lichtleiter, Zeiss, Jena) ausgeleuchteten OP- Feld durchgeführt. Es wurde mit einem sterilen mikrochirurgischen Besteck operiert (Micro 2000, Medicon, Tuttlingen).

Die, wie unter Punkt (IV.2) beschriebene, in Narkose gelegte Maus, wurde in Rückenlage auf einer Wärmematte (ThermoLux-Wärmematte, Fa. Dehner, Rain (Lech)) gelegt und das linke Bein seitlich mit Klebebändern (Transpore™, 3M Health Care, Neuss) fixiert. Es erfolgte eine großzügige Enthaarung des Operationfeldes durch Rasur und Enthaarungscreme (Plica® extra soft, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Bühl). Nach der anschließenden Desinfektion (Cutasept®F, Fa.Bode Chemie, Hamburg) wurde 2 cm proximal des Kniegelenks in der Oberschenkelinnenseite der Hautschnitt gesetzt, bis die Trias aus Arterie, Vene und Nerv sich gut darstellen lies. Es erfolgte die Freipräparation der *Arteria femoralis* mit Hilfe einer Pinzette durch Ablösen der *Vena femoralis* und des *Nervus femoralis*. Distal der späteren Zugangsstelle wurde ein Haltezügel gelegt und proximal davon ein Knoten (Pearsalls Limited, Taunton, England) vorgelegt. Durch die Pinzette wurde an der Arterie ein stumpfes Trauma gesetzt, so dass ein Aneurysma entstand und der Katheter später besser vorgeschoben werden konnte. Mit einer im 90° Winkel umgeknickten Kanüle wurde ein kleines Loch in die Arterie gesetzt, in das der Katheter vorsichtig vorgeschoben wurde. Der vorgelegte Knoten wurde nach Sitz des Katheters gesetzt und die Durchgängigkeit mittels einer mit physiologischer NaCl- Lösung gefüllten 1mL Spritze überprüft. Die Haut wurde darüber mit Einzelheften wieder verschlossen.

Während der Langzeitmessungen am Mikroskop ist nun eine andauernde Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe gewährleistet. Die Einsatzmöglichkeiten der verschiedenen Farbstoffe für die Gefäßdarstellung ist in Tabelle 2 gelistet.

2. Anästhesie

2.1. Durchführung der Narkose

Eine wichtige Voraussetzung für die über einen langen Zeitraum (bis zu sechs Stunden) stattfindende intravitalmikroskopische Untersuchung, ist die Durchführung einer sicheren Narkose unerlässlich.

Um die Stressbelastung für das Tier bei der Durchführung so gering wie möglich zu halten, wird die Narkose mit Isofluran (Forene® 100% AbbVie Deutschland GmbH, Wiesbaden) eingeleitet. Das Sauerstoff-Isoflurangemisch strömt über einen Verdampfer (Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen) in eine Plexiglasröhre ein, in die zuvor die Maus verbracht wurde. Der Vorteil des Isoflurans ist, dass es ein leicht flüchtiges Gas ist, welches sehr schnell an- und abflutet und kaum zu kardiovaskulären oder respiratorischen Beeinträchtigungen führt. Das Tier inhaliert ein 2-3%iges Isofluran-Sauerstoffgemisch bis zur Erlöschung der Stellreflexe ein. Danach wird die Maus der Kammer entnommen und die Triplenarkose intraperitoneal (i.p.) injiziert. Sie wird nach Applikation sofort in eine Einschlafbox verbracht, damit sie bis zur Erreichung des chirurgischen Toleranzstadiums III²¹⁶⁴ vor optischen und akustischen Reizen geschützt ist.

Die Anforderungen an eine Narkose sind charakterisiert durch die Ausschaltung der Empfindungs- und Sinneswahrnehmung (inklusive Schmerz), die durch Bewusstlosigkeit, Analgesie und Muskelrelaxanz herbeigeführt werden.

Bei der eingesetzten Triplenarkose werden verschiedene Anästhetika in sinnvoller Weise so kombiniert, dass erwünschte Wirkungen maximal genutzt werden (Reduktion der Einzeldosis) und die therapeutische Breite der Narkose erhöht wird (Minimierung der unerwünschten Nebenwirkungen).

Die folgenden Injektionsnarkotika kommen für die Triplenarkose zur Anwendung:

Medetomidin gehört in die Wirkstoffklasse der α_2 - Agonisten und wirkt als sedativ-hypnotisches Analgetikum¹⁶⁵. Es hat sowohl eine muskelrelaxierende als auch analgetische Wirkung. Als unerwünschte Begleiterscheinung tritt eine kardiovaskuläre und respiratorische Depression ein, sowie Hypothermie¹⁶⁶.

Midazolam gehört in die Gruppe der Benzodiazepine. Es wirkt muskelrelaxierend und trägt besonders zur Antikonvulsion bei.

Fentanyl, als ein synthetisch hergestellt, stark wirkendes Opioid, wird zum potenten Analgetikum (100-fach potenter als Morphin). Wie alle Opiode können stark atemdepressive Effekte auftreten¹⁶⁷.

Die Kombination aus allen drei Substanzen werden in einer Mischspritze wie in Tabelle 1 dosiert und mit einer steriler physiologischen NaCl (Isotonische Kochsalzlösung, Fresenius, Bad Homburg v.d.H.) auf ein Gesamtvolumen von 0,5 mL verdünnt und dann i.p. verabreicht.

Tabelle 1: Dosierung der vollständig antagonisierbaren Narkose bei der Maus¹⁶⁷

Injektionsanästhetika	Dosierung	Handelsname	Applikation
Medetomidin	0,5 mg/ kg KG	Dorbene vet 1 mg/mL, Pfizer GmbH, Karlsruhe	Intraperitoneal (i.p.)
Midazolam	5 mg/ kg KG	Midazolam-hamelN 5 mg/mL, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln	
Fentanyl	0,05 mg/kg KG	Fentanyl 0,5 mg Rotexmedica GmbH, Trittau	

Das chirurgische Toleranzstadium tritt erfahrungsgemäß nach etwa 10- 20 Minuten ein. Das Erreichen dieses Stadiums wird anhand des Flexorreflexes überprüft. Die Versuchsdurchführung am 2-Photonen-Mikroskop erfordert eine Narkosedauer von bis zu 6 Stunden. Nach 45- 60 Minuten sollte die oben beschriebene Triplenarkose für die weitere Erhaltung der Narkosetiefe um die halbe Dosis nachgegeben werden. Das Nachlassen der Narkosetiefe wird durch die regelmäßige Kontrolle des Flexorreflexes während des Versuchs getestet. Somit ist eine Narkosedauer um ca. 45 min verlängert.

2.2. Narkosemanagement und – überwachung

Während der Dauer des Experiments liegt die Maus in einem Wärmeinkubator, der konstant eine Temperatur von 37°C gewährleistet. Zudem wird regelmäßig auf das Fehlen des Flexorreflexes geachtet und die Atmung kontrolliert. Je nach Befund wird Narkose nachinjiziert oder ggf. Sauerstoff zugeführt.

2.3. Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen

Der für das Erstellen der Videos erforderliche Fluoreszenzfarbstoff kann über verschiedene Wege verabreicht werden. Gerade für längere Experimente bis zu 6 Stunden bietet sich der Femoraliskatheter an, da dort oft im Vergleich zum Schwanzvenenkatheter die Durchgängigkeit länger erhalten bleibt. Das Legen der beiden Katheter ist unter Punkt IV.1.3.1 für den Schwanzvenenkatheter und bei für den Femoraliskatheter unter Punkt IV.1.3.2 beschrieben.

Fluorochrome sind Moleküle, die Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren können und ein Teil des absorbierten Lichts als längerwelliges, energieärmeres Licht abgeben. Dabei sind Farbe und Intensität jeweils spezifisch für das einzelne Molekül. Es gibt verschiedene Klassen von Fluoreszenzfarbstoffen. Zu nennen sind die Fluoreszenzproteine, wie z.B. das GFP- Protein, die Nanokristalle (FITC, TRITC) und die sogenannten Quantum dots. Bei den letzteren handelt es sich um Nanokristalle aus Halbleitermaterial, die mit einer Hülle versehen sind. Sie zeichnen sich durch Ihre intensive Helligkeit aus, ohne zu verblassen.

Bei dem Einsatz von mehreren Fluoreszenzfarbstoffen liegt das Ziel in der richtigen Kombination der verschiedenen Anregungswellenlängen und deren Spektren. Der spektrale Überlappungsbereich der einzelnen Farbstoffe sollte so gering wie möglich gehalten werden, damit das Signal spezifisch wiedergegeben wird und es nicht zur ungenügenden Trennung der beiden Signale kommt (cross-talk/ cross-over).

Je nachdem wie die Zellen in der Maus markiert wurden, muss der Farbstoff für die Gefäßdarstellung so gewählt werden, dass sich die jeweiligen Emissionsspektren der Fluorochrome nicht zu stark überlappen. In dieser Arbeit wurden je nach Versuchsaufbau einer der in der Tabelle 2 genannten Fluorochrome verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe für die Gefäßdarstellung

Name	Konzentration	Anregung (nm)	Emission (nm)	Hersteller
TRITC	2 MDa	555	580	LifeTechnologie
FITC	2 MDa	495	519	Sigma-Aldrich
AngioSense® 750	2 µM	750	770	PerkinElmer
Qtracker®705	2µM	405-665	705	Invitrogen

Ein Beispiel eines in dieser Arbeit häufig verwendeten *in-vivo* Gefäßmarkers ist das

TRITC- Dextran (Tetramethylrhodamin-isothiocyanate, 2 Mega- Dalton, LifeTechnologies, Carlsbad, USA)¹⁶⁸. Es handelt sich bei TRITC um einen Fluorochrom, das sowohl an Proteine als auch an Makromoleküle gekoppelt werden kann und so in der Darstellung der Gefäße Anwendung findet. Durch die Größe kann das TRITC-Dextran das intakte Gefäß nicht verlassen. Das Makromolekül hat ein Anregungsmaximum bei 555 nm und den Emissionspeak bei 580 nm. Der einzige Nachteil ist die Fotoinstabilität, so dass entweder immer wieder nachinjiziert werden muss oder man für Langzeitexperimente die deutlich kostspieligeren Nanokristalle, wie Quantumdots verwendet.

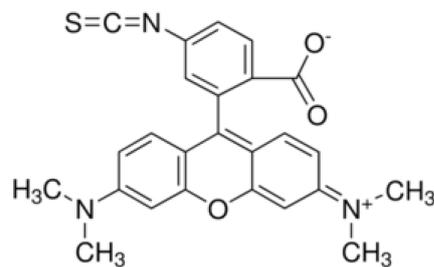


Abbildung 15: Strukturformel von TRITC

gezeichnet mit Hilfe von ChemBioDraw 11.0

3. Zwei-Photonen Intravitalmikroskopie

3.1. Grundlagen der Zwei-Photonen Mikroskopie

Die Kombination aus der Multiphotonentechnik und der Intravitalmikroskopie ermöglicht 3D *in-vivo*- Analysen in unterschiedlichen Geweben über die Zeit. Sie trägt dazu bei, intakte Organe und Zellinteraktionen zu visualisieren und somit unterschiedliche Fragestellungen in der Immunologie zu beantworten¹⁶⁹.

Das physikalische Phänomen des Zwei-Photonen- Effekts wurde schon in den 30iger Jahren durch Maria Goebbert-Mayer beschrieben¹⁷⁰, aber erst in den 90iger Jahren durch Denk und Stricker für die Mikroskopie umgesetzt¹⁷¹. Die Zwei-Photonenmikroskopie ähnelt der Technik der Konfokalen- Laser- Rastermikroskopie, bei der ein Laser in der eingestellten Ebene die Oberfläche abtastet und die Fluoreszenz mit einem Detektor (PMT, Photomultiplier tube) detektiert. Die dabei erzeugten digitalen Bilder werden dann in einem Computer zusammengesetzt und können in Echtzeit beobachtet werden¹⁷².

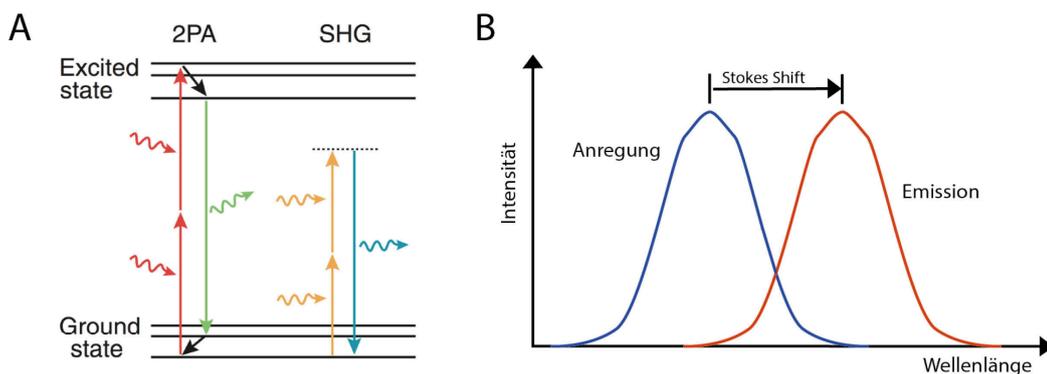


Abbildung 16: Jablonski Diagramm A) und der Stokes Shift B)

A) Darstellung der unterschiedlichen Energieniveaus der Photonen beim Zwei-Photoneneffekt und dem SHG **B)** Visualisierung des Stokes Shifts. Hier wird deutlich, dass sich die Wellenlänge des Anregungslichtes von dem des abgestrahlten Lichtes unterscheidet.

Abb. A: mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Methods¹⁷³, Copyright (2005)

In der Mikroskopietechnik macht man sich das Phänomen der Fluoreszenz zu Nutze, die als Marker in Organismen für unterschiedliche Proteine, Zellen und Zellbereiche eingesetzt werden kann. Dadurch können biologische Mechanismen in der Zelle dargestellt werden. Fluoreszenz entsteht, indem Farbstoffe, sogenannte Fluorochrome, emittierende Photonen aufnehmen und dann Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben werden, um dann nach einigen Nanosekunden auf

ein niedrigeres, energieärmeres Ausgangsniveau zurückzufallen¹⁷⁴. Dabei wird ein energieärmeres, langwelligeres Photon abgegeben, das auch als Stokes Shift (Wellenlängendifferenz) bezeichnet wird¹⁷⁵.

Ein weiterer Unterschied zu der klassischen Fluoreszenztechnik besteht darin, dass bei der Multiphotonenmikroskopie die Anregungsenergie auf zwei langwelligen Photonen aufgeteilt wird und nicht nur auf ein kurzwelliges Photon wie in der klassischen Fluoreszenzmikroskopie.

Das Prinzip der Zwei-Photonenmikroskopie beruht auf dem gleichzeitigen Eintreffen von zwei Photonen innerhalb von wenigen Femtosekunden (fs), um eine ausreichende Anregung der Elektronen der Fluorochrome zu erreichen¹⁷³. Dies ist mit gepulsten Lasern möglich, die hochfrequente, hochenergetische Impulse mit einer nahezu Infrarot-Wellenlänge erzeugen können. Die Frequenz zwischen zwei Pulsen liegt im picosekunden Bereich, die eine Energiedichte nur in der fokussierten Brennebene erzeugen, die zur Fluoreszenzemission durch Fluorochrome nur in der Brennebene führt. Damit können Schnittbilder des Gewebes *in vivo* erzeugt werden. Durch die Anregung in dem kleinen Brennpunktbereich entsteht kein „out-of Focus“-Licht, welches zur Unschärfe führen würde, und es wird ein sehr hoher Kontrast mit einer hohen Auflösung erzielt. Dadurch ergeben sich folgende Vorteile in der Mikroskopie. Zum einen wird die Fototoxizität im Gewebe durch die energieärmere Anregungswellenlänge gering gehalten¹⁷⁶ und das Fotobleichen (Photobleaching) durch Erzeugen der Fluoreszenz in Fokusebene reduziert. Außerdem entsteht eine geringe Streustrahlung durch die energiearme, lineare Anregungswellenlänge. Es können hohe Eindringtiefen von bis zu 1000 μm erreicht werden, wodurch das Imagen an lebendem Gewebe ermöglicht wird¹⁷⁷.

Ein positiver weiterer Nebeneffekt ist die Frequenzverdopplung (second harmonic generation, SHG) des eingestrahnten Lichts (siehe Abbildung 16A), welches zur Darstellung von Strukturproteinen, wie bspw. der Kollagenfaser, führt. (siehe Abbildung 16 A) Das Signal entsteht durch die Streuung der Photonen, die an den Strukturproteinen reflektiert werden. Dadurch wird ein Photon abgegeben, das exakt der Hälfte der angeregten Wellenlänge entspricht^{178,179}. In der hier vorliegenden Arbeit lag die Anregungswellenlänge bei 800 nm. Die Hälfte entspricht 400nm, was dem blauen Lichtspektrum entspricht. So werden anatomische Gegebenheiten dargestellt, die als Orientierungspunkte bei der Mikroskopie helfen.

Tabelle 3: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile der 2-Photonentechnik

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> ▪ geringe Phototoxizität/ Photobleaching ▪ simultane Anregung mehrerer Fluorochrome möglich ▪ sehr hohe Eindringtiefe ▪ Möglichkeit des Imagens über längere Zeiträume ▪ SHG ▪ minimierte Streustrahlung 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ sehr teure Laser notwendig ▪ schlechtere Auflösung als bei konfokalen Mikroskopen

3.2. Aufbau des Zwei-Photonen Mikroskops

Das in dieser vorliegenden Arbeit verwendete Zwei-Photonenmikroskop (LaVision Biotech, Bielefeld, Deutschland) besteht aus verschiedenen zusammengesetzten Komponenten, die in der Abbildung 17 die Bildgenerierung verdeutlichen soll. Das System besteht aus einem ultraschnellen Ti:Sa Laser (MaiTai, Spectra Physics, Darmstadt, Deutschland), der das Wellenlängenspektrum von 700-1000 nm abdeckt. Mit einem sogenannten optisch-parametrischen Oszillator (OPO) erweitert man die Anregungswellenlänge im Infrarotbereich (1100- 1600nm) und ermöglicht die gleichzeitige Darstellung von Fluorophoren mit weitgehend unterschiedlichen Anregungs- und Emissionsspektren. Ein weiterer Vorteil ist die höhere Eindringtiefe in Geweben (bis zu 80 μm) bei höherer Auflösung und mit reduziertem Photobleaching und Phototoxizität¹⁸⁰.

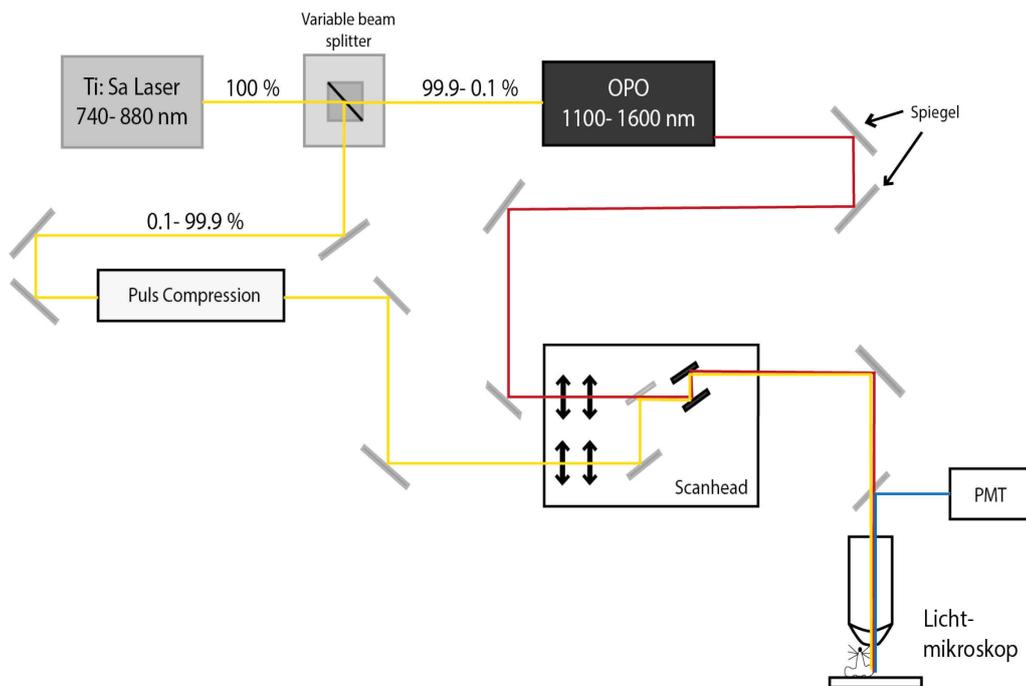


Abbildung 17: Schematischer Aufbau des 2-Photonenmikroskops mit OPO

Der gelbe Strahlengang zeigt den Weg des Lichts über die Pulskompression, um den 2-Photoneneffekt zu erreichen und geht weiter über den Scanhead, der über mehrere Spiegel die verschiedenen Ebenen absキャンen kann. Nach Auftreffen auf die Probe wird die Reflexion im PMT registriert und die Signale im Computer zusammengesetzt. Die rote Linie zeigt den Weg des Lichtes mit einer höheren Wellenlänge (OPO), wodurch das Spektrum an möglichen Fluorophoren erhöht wird.

modifiziert nach LaVisionBioTec GmbH.

Optische Filter können Wellenlängenbereiche spezifiziert festlegen. Außerdem ist das System an ein optisches Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit einem Wasserimmersions- Objektiv (16 fache Vergrößerung) mit der Numerischen Apertur (NA= 0,95) gekoppelt, welches hochaufgelöste kontrastreiche Bilder ermöglicht.

3.3. Auswertung mittels 2-Photonen-Technik

Die hier in der Arbeit gewonnenen Bilder/ Videos wurden mit dem unter IV.3 beschriebenen Zwei- Photonenmikroskop erstellt. Bei einer Anregungswellenlänge von 800 nm wurden 588 x588 μm große Bildausschnitte mit einer Pixelzahl von 515x515 gewählt. Weitere Parameter in dem Programm ImSpector (LaVision, Bielefeld) sind Frequenz, Laserpower, die Tiefe des Imagebereichs und die Zeitdauer, die gesetzt werden. Der insgesamt Scanbereich in der Z-Ebene wurde zwischen 30- 50 μm gewählt und es wurden alle 3 μm Stapelbilder/Schnittbilder, sogenannte z- Stacks, erzeugt.

Diese Stapel werden später im Auswertungsprogramm Volocity zu einem 3-dimensionalen Bild zusammengesetzt. Um möglichst lange Videos zu erstellen, wurde jeweils in einem Abstand von 30 Sekunden (wait time) der festgelegte Scanbereich durchgemessen. Dazwischen wurde eine Wartezeit eingehalten, um das Gewebe und die Fluoreszenzfarbstoffe zu schonen.

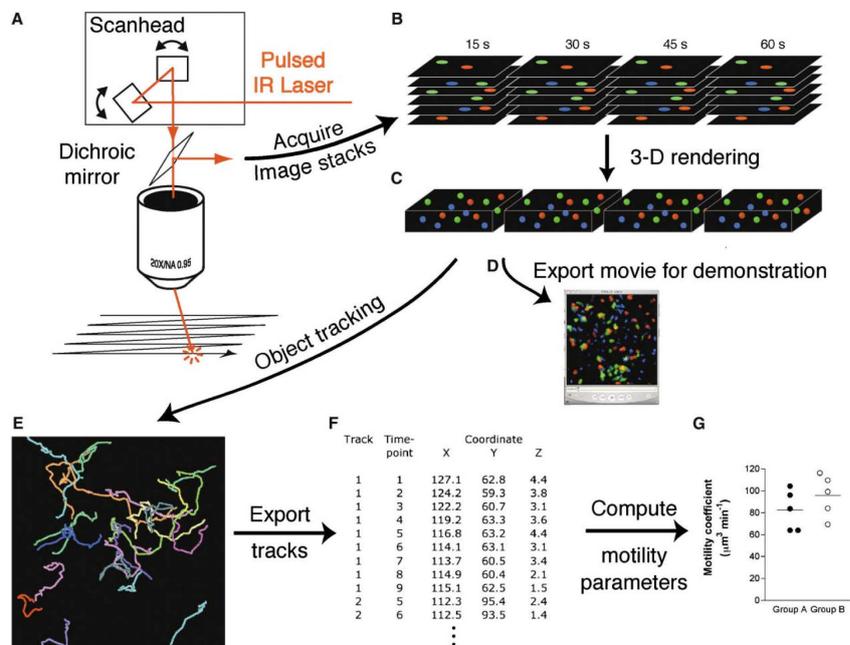


Abbildung 18: Prozess der in-vivo Datengewinnung bis zur Analyse

A) Mit dem Zwei-Photonenmikroskop werden die einzelnen Ebenen mäanderförmig abgescannt und Bilderstapel generiert **B)**, die zu einem 3D Video zusammengesetzt werden **C)**, welches zu Demonstrationszwecken genutzt werden kann **D)**. **E)** Mit den Videos können Zellverfolgungen (tracks) durchgeführt werden, die in der Analyse unterschiedlicher Parameter münden **F)**, die dann statistisch ausgewertet werden **G)**.

mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Immunity¹⁸¹, Copyright (2004)

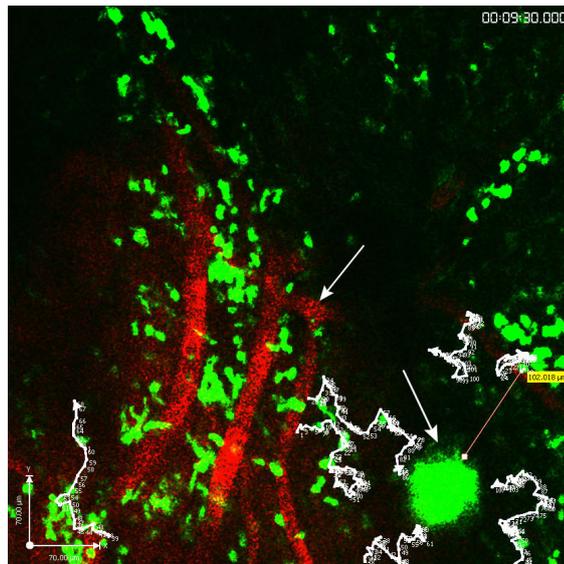


Abbildung 19: Darstellung des Sichtfeldes durch ein 2-Photonemikroskop

Darstellung der Gefäße in rot mittel TRITC (oberer Pfeil). In Grün sind die Monozyten durch GFP markiert. Die kreisrunde Stelle zeigt die Laserverletzung (unterer Pfeil), um die in weiß einige getrackten, selektierten Migrationswegen der neutrophilen Granulozyten abgebildet sind. Zusätzlich wurde der Abstand der Zellen zur Verletzung ausgemessen (rote Linie). Maßstab: 70 µm. Blickfeld 588 x 588 x30 µm.

Durch Zuhilfenahme des Softwareprogramms Volocity und dem darin integrierten Zellverfolgungswerkzeug (tracking tool) wurden die jeweilig zu analysierenden Zellen pro Zeitpunkt auf ihrer zurückgelegten Strecke verfolgt. Dabei wurde auf eine ausreichende Verfolgungstreckenlänge von mindestens 25 Zeitpunkten geachtet, damit die daraus errechneten Parameter Geschwindigkeit, Displacement rate und Meandering Index einen aussagekräftigen Wert widerspiegeln. Die Migrationsparameter wurden mit Hilfe von Volocity generiert und statistisch ausgewertet. Außerdem konnten Zellzahl und andere Faktoren, wie z.B. Zellkontakte, Ausbildung von Zellausläufern, in die Auswertung mit einbezogen werden.

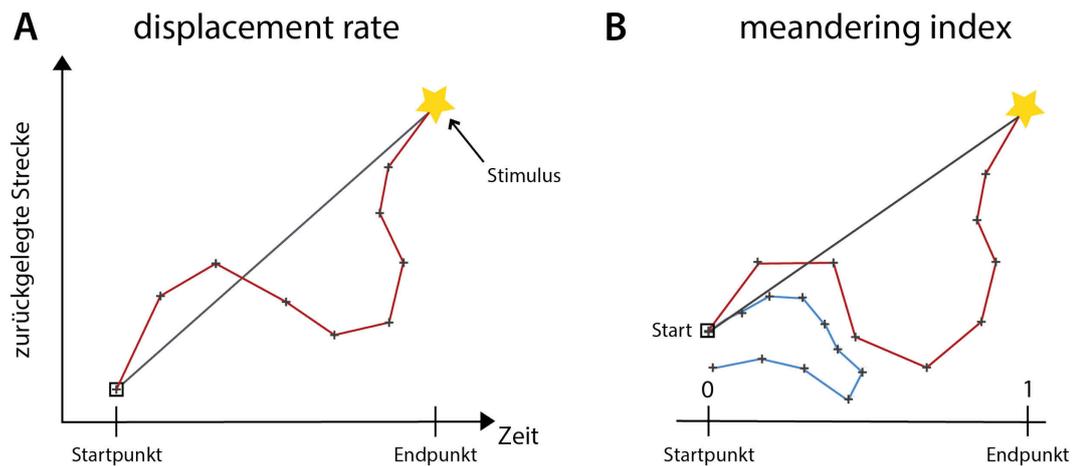


Abbildung 20: Darstellung der Displacement rate und dem Meandering Index

A) Displacement rate ist eine Geschwindigkeit, welche die Länge der direkten Verbindungslinie (schwarz) zwischen einem Startpunkt der Zellmigration bis zu einem Endpunkt in Relation setzt zur Zeit, die eine Zelle dafür auf ihrem tatsächlichen Migrationsweg (rot) benötigt. **B)** Bei dem Meandering index wird die Gerichtetheit einer Zellbewegung bestimmt. Dabei teilt man die direkte Distanz von Start- zu Endpunkt (schwarz) der Zelle durch den kompletten zurückgelegten Migrationspfad (rot). Das Ergebnis kann einen Wert zwischen 1 bei einer komplett geraden/ zielgerichteten Migration und 0 bei einer Migration im Kreis einnehmen (blau).

Haupttracking Parameter sind die Geschwindigkeit, Displacement rate und der Meandering index. Die Geschwindigkeit einer Zelle wird berechnet indem die Strecke, welche die Zelle zurücklegt, in Bezug gesetzt wird zur Zeit, die dafür benötigt wurde. Weitere zwei Parameter können genannt werden, um die Ausrichtung einer Zelle auf einen Stimulus zu beschreiben. Zu nennen sind die Beweglichkeit (Displacement rate) und die Zielgerichtetheit der zurückgelegten Wegstrecke (Meandering Index)¹⁸². Bei der Displacement rate (siehe Abbildung 20A) wird gemessen, wie schnell die Zelle von ihrem Startpunkt aus zum Stimulus wandert. Dabei wird ein idealer Pfad (schwarze Gerade) zum Stimulus hin gebildet und ins Verhältnis gesetzt zur Migrationszeit auf dem realen Weg (rote Linie), den die Zelle durch das Gewebe über die Zeit durchläuft. Der Meandering Index¹⁸³ ist ein Indikator für die Gerichtetheit der Migration einer Zelle. Hier wird die Zielgerichtetheit der Zellspur (Tracks) in Bezug gesetzt zu der gesamten zurückgelegten Wegstrecke. Der Index ist dimensionslos und kann einen Wert zwischen 0 und 1 einnehmen. Dabei steht 1 für eine gerichtete Zellwanderung (schwarze Linie) und 0 für eine Kreisbewegung, die nicht zum Stimulus hin wandert, sondern wieder in Richtung Startpunkt (blaue Linie in Abbildung 20B). Der Zellpfad mit der roten Farbe wird einen Wert zwischen 1 und 0 einnehmen.

4. Ohrmodell mit Laserverletzung

Diese Arbeit stützt sich auf das Ohrmodell bei der Maus, um *in vivo* die in der Mikrozirkulation stattfindenden Prozesse auf Zellebene mit Hilfe des Zwei-Photonen Mikroskops zu untersuchen. Das Modell wurde etabliert von Ng et al. und Roediger et al. und hat sich über die Jahre als klassisches Modell etabliert, um die Mikrozirkulation zu analysieren^{100,137,145,152,159}. Die Vorteile liegen in dem einfachen Zugang zum Ohr und den oberflächlich liegenden Gefäßen. Außerdem ist das Ohr frei von Bewegungsartefakten, die bei der Atmung entstehen. Somit können stabile, über Stunden andauernde Videos erstellt werden. Durch die weitgehend atraumatische Präparation entsteht zudem keine Entzündungsreaktion im Gewebe.

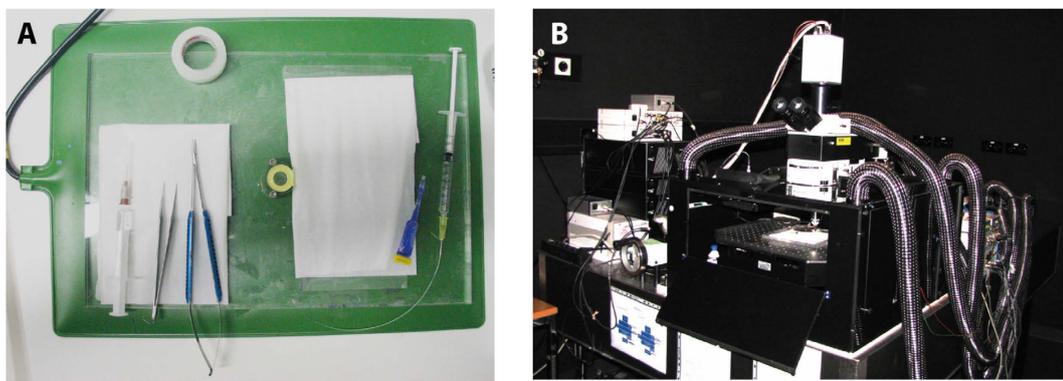


Abbildung 21: Ohrgestell für die Präparation und Aufbau des 2-Photonen Mikroskops

Abbildung **A**) zeigt die mikrochirurgischen Instrumente mit dem benötigten Material für die Präparation des Ohrmodells. **B**) Abbildung des 2-Photonenmikroskop

Die Operationsvorbereitung inklusive Anästhesie erfolgt wie bereits erwähnt (siehe IV.2). Sobald die Maus das chirurgische Toleranzstadium erreicht hat und die Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) aufgetragen wurde, wird je nach Dauer des Mikroskopierzeitraumes ein Schwanzvenenkatheter bzw. Femoraliskather gelegt (IV.1.3.1 und IV.1.3.2). Daraufhin wurde die Maus in Rückenlage auf eine spezielle Vorrichtung (Stage) verbracht und mit Hilfe von Klebeband (Transpore 3M, Health Care, Neuss) fixiert. Das Ohr wird in Position gebracht mit dem Ziel, eine möglichst plane, faltenfreie Fläche zu erreichen. Das Aufspannen des Ohres findet unter der Stereolupe statt und wird mittels umgeknickter Kanülnadeln, in das auf dem Ohrgestell befindenden Silikonring, erzielt. Anschließend wird die Maus inklusive Stage in den Wärmeinkubator unter das

Mikroskop gelegt. Mit einem Tropfen destilliertem Wasser oder 0,9%iger NaCl- Lösung wird die mikroskopische Ebene eingestellt und die ideale Stelle mit einem guten Durchfluss aufgesucht, an der dann die Laserverletzung gesetzt wird.

4.1. Laserverletzung

Um das Migrationsmuster der Zellen bei der sterilen Entzündung zu studieren, wird mit Hilfe des Zwei- Photonen Mikroskops eine definierte lokale Gewebsverletzung gesetzt. Mit hoher Laserstärke wird auf einen etwa 40x40 µm großen definierten Bereich im Gewebe für 30 Sekunden gezielt. Dadurch kommt es an dieser Stelle zu einer Gewebsnekrose und der Freisetzung der verschiedenen Faktoren/ Substanzen, die einer sterilen Entzündung gleicht. Diese Methode wurde von Ng et al etabliert¹⁵⁹.

Es werden CX3CR1-Tiere mit unterschiedlichen Genotyp (heterozygot/ homozygot) verwendet, um das Migrationsverhalten der Monozyten im Kontext der sterilen Inflammation zu untersuchen und den Effekt des Fraktalkinrezeptors auf die Rekrutierung der Zellen zu analysieren. Außerdem wurden sowohl Neutrophile¹⁸⁴ als auch Gewebsmakrophagen durch Depletion eliminiert (siehe IV.4.2), um deren Einfluss und das Zusammenspiel der Zellen untereinander besser zu verstehen. Um das Verhalten der neutrophilen Granulozyten im Fokus der Nekrose und der dabei freiwerdenden Substanzen zu visualisieren, wurden LysMeGFP- Mäuse eingesetzt. Durch diese Technik kann gerade auch das Zellverhalten über die Zeit erfasst und analysiert werden.

4.2. Zelldepletion

Unter der Depletion wird allgemein die Entfernung körpereigener Substanzen verstanden. Hierbei werden Zellen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern aus dem Organismus entfernt.

4.2.1. Depletion der neutrophilen Granulozyten

Um den gegenseitigen Einfluss der Zellen besser zu erarbeiten, war der Ansatz des Experimentes, die neutrophilen Granulozyten zu depletieren, um dann das Zellverhalten anderer Zellpopulationen wie etwa den Monozyten/Makrophagen zu analysieren.

Dabei kam ein spezifischer gegen das Protein Lys6-G gerichteter Antikörper zum Einsatz (purified rat anti-mouse Ly6-G, Klon 1A8, BD Pharmingen, Heidelberg). Das genannte Protein wird fast ausschließlich auf reifen Granulozyten exprimiert und kann deshalb den Effekt genau dieser Zellpopulation besser aufarbeiten. Gerade Ly6-C positive Zellen, wie Subpopulationen von Lymphozyten und Monozyten und dendritische Zellen werden nicht erfasst¹⁸⁴.

Der Antikörper wurde 12 h vor dem Mikroskopieren am 2-Photonenmikroskop in einer Konzentration von 50 µg/mL über die Schwanzvene verabreicht. Nach derselben Vorgehensweise wurde die Kontrollgruppe mit dem Isotyp- Antikörper (rat IgG2b kappa Isotyp, 1 mg/mL, eBioscience, Frankfurt) behandelt. Die Depletion wurde durch intracardiale Blutentnahme vor Beendigung des Versuches durch das Blutanalysegerät (ABX Micros Axonlab, Reichenbach/Stuttgart) auf das Vorliegen einer Neutropenie untersucht.

4.2.2. Depletion der Thrombozyten

Hier stellt sich dieselbe Frage wie bei IV.4.2.1: Welchen Einfluss nehmen Thrombozyten auf das Zellmigrationsverhalten der jeweiligen anderen Zellpopulation, wie Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten.

Es kommt ein thrombozytendepletierender Antikörper, der gegen das Oberflächenprotein GPIIb/IIIa (rat anti-mouse GPIIb/IIIa, Emfret analytics GmbH & Co. KG, Eibelstadt) gerichtet ist zum Einsatz. Über die Schwanzveneninjektion wurde der Antikörper in einer Konzentration von 2 µg/g Körpergewicht mit physiologischer NaCl-Lösung auf 200µL verdünnt und 12 Stunden vor der Mikroskopie unter dem Zwei-Photonen appliziert¹⁸⁵.

Die Kontrollgruppe erhielt den Isotyp- Antikörper (rat IgG, Emfret analytics GmbH & Co., Eibelstadt), der nach demselben Versuchsprotokoll, mit einer Konzentration von 2 µg/g Körpergewicht, eingesetzt wurde¹⁸⁶.

4.3. Inhibitorischer Faktor

4.3.1. BoxA

Ein starker Stimulus für die Zellrekrutierung bei der Gewebsnekrose ist das freiwerdende HMGB1. Durch Blockieren dieses DAMPs mit Hilfe von BoxA wurde die Auswirkung auf das Migrationsmuster untersucht. BoxA ist Bestandteil des DNA-bindenden Proteins HMGB1 und bewirkt als isoliertes Molekül eine Hemmung der chemotaktischen Funktion von HMGB1^{187,188}. Es wird in einer Konzentration von 83µg BoxA 30 min vor imagen subcutan in das Ohr injiziert. Die Laserverletzung und das Erstellen der Videos über einen langen Zeitraum findet, wie bei der Laserverletzung (IV.4.1) schon beschrieben, statt. Nach dem identischen Protokoll wurde eine Kontrollgruppe erstellt, der anstelle des Inhibitors BoxA subcutan PBS (phopshat puffer saline) verabreicht wurde.

4.4. Färbung der Thrombozyten mit eFluor670

Um Interaktionen zwischen den Thrombozyten und den neutrophilen Granulozyten zu visualisieren, wurden diese mit dem Farbstoff eFluor 670 nach Isolation der Thrombozyten wie unter IV.7.1.3 beschrieben, gefärbt. Die Plättchen wurden mit dem Farbstoff in einer Konzentration von 5mM 20 min inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationschritt (1200 rpm; 5 min) und der Aufnahme des Pellets in den Tyrodes-Puffer, konnte die gefärbte Zellsuspension der Maus, die für die Videodarstellung vorgesehen war, über die Schwanzvene injiziert werden.

5. Whole Mount Staining

Das Whole Mount Staining ist die direkte Färbung von ganzen Gewebestücken, ohne zuvor histologisch feine Schnitte anzufertigen. Dabei werden zelluläre Strukturen oder Zelloberflächen mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt und anschließend mit dem 2-Photonen-Mikroskop ausgewertet. Die Technik ermöglicht eine dreidimensionale Darstellung von Strukturen, wie Gefäßen und Zellen, direkt im Gewebe. In dieser Arbeit wurde als Gewebestück das Ohr verwendet, um die Freisetzung von Faktalkin bei der Verletzung mit Hilfe des Antikörpers visuell darzustellen.

5.1. Durchführung des Whole Mount Stainings

Hier wurde das Ohr verwendet, nachdem an bis zu 5 Stellen eine Laserverletzung gesetzt wurde. Zuerst wurde es in ein Reaktionsgefäß mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert, dann mit 0,2%igem Triton permeabilisiert und anschließend in PBS und 1%igem BSA bei 4°C dreimal auf einem Rüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) für jeweils 5 min gewaschen. In einem neuen dunklen Reaktionsgefäß werden mit 200µL 1%iges BSA plus 4µL Fc-Block (anti-mouse CD 16/32) die unspezifische Bindung über 30 min bei 4°C im Mixer blockiert. Nach Zugabe des primären Antikörper (siehe Tabelle 4) in das Reaktionsgefäß wurde es wieder bei 4°C auf dem Mixer inkubiert. Nun wurde erneut dreimal mit PBS und 1%igem BSA gewaschen, bevor der Sekundäantikörper in einem neuen Gefäß dazu pipettiert wurde. Die Inkubation erfolgte bei 4°C auf dem Rüttler. Drauf folgten erneut dreimal ein Waschschrift und zuletzt die Lagerung des Ohres in PBS bei 4°C, bis zur Verwendung am 2-Photonen-Mikroskop.

Tabelle 4: verwendete Antikörper (AK) für die Doppelfärbung des Whole Mount Stainings

Antigen			Konzentration mit Verdünnung	Hersteller
CD 31	Primär-AK	rat anti-mouse CD 31 FITC- conjugated	0,5 mg/mL 1:150	eBioscience
	Sekundär-AK	Alexa Fluor 488 (goat anti-rat)	2 mg/mL 1:200	Life- Technologies
CX3CL1	Primär-AK	rabbit anti- mouse	100 µg/mL 1:10	abcam
	Sekundär-AK	Alexa Fluor 594 (goat anti- rabbit)	2 mg/mL 1:200	Life- Technologies

5.2. Auswertung des Whole Mount Stainings mittels 2-Photonentechnik

Die Auswertung erfolgte unter dem 2-Photonenmikroskop. Dabei wurde das Gewebestück auf einem Objektträger platziert und mit einem Deckgläschen bedeckt. Mit einem Tropfen destilliertem Wasser benetzt, wurde das Objektiv eingetaucht und die Ebene eingestellt. Das Softwareprogramm ImSpector (entwickelt vom Max Planck Institut Göttingen, Deutschland) fertigte horizontale Schnittbilder an, die anschließend in dem Programm Volocity (Volocity 3D image analysis software, PerkinElmer, Waltham, USA) 3D- Rekonstruktionen erstellte. Die so gewonnenen Schnittbilder konnten für die Visualisierung verwendet werden.

6. Zellkultur

6.1. Humane Fibroblasten

Die für das nekrotische Zelllysate verwendeten Zellen wurden bei PromoCell (PromoCell GmbH, Heidelberg) bezogen. Die Kultivierung erfolgte mit dem Fibroblasten Medium 2 (Fibroblast Media2, PromoCell GmbH, Heidelberg) und nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens, wurden die Zellen geerntet, ausgezählt und für die Herstellung des nekrotischen Zelllysates verwendet.

6.2. Gewinnung von nekrotischem Zelllysate

Um den Effekt, der aus nekrotischen Zellen freiwerdenden Faktoren auf die Thrombozyten *in vitro* zu untersuchen, wurde nekrotisches Zelllysate hergestellt.

Dabei wurde die Zellzahl auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL eingestellt und in verschiedene Reaktionsgefäße verbracht, um sie anschließend zwei unterschiedlichen Verfahren zu unterziehen.

Ein Teil der Zellportionen wurde bei 58°C für 20 min im Wasserbad erhitzt. Die anderen Zellportionen wurden nicht mit Hitze, sondern mit Kälte behandelt, indem sie wiederholt in flüssigen Stickstoff getaucht wurden. Anschließend wurden beide bei 10.000g für 5 min zentrifugiert. Der klare Überstand abgenommen und steril filtriert (\varnothing 0,22 μ m Porengröße; Pall Corporation, Ann Arbor, USA) und bei -80°C bis zur Verwendung in der Aggregometrie gelagert.

6.3. Stimulation von humanen Fibroblasten

Um den Effekt der unterschiedlichen Signalstoffe, die bei der Nekrose freigesetzt werden, zu untersuchen, wurden *in-vitro* kultivierte humane Fibroblasten mit nekrotischen Zelllysate inkubiert. Daraufhin werden von den Fibroblasten Chemokine gebildet, die im Medium-Überstand mit dem ELISA anschließend quantifiziert werden konnten. Außerdem konnten die stimulierten Zellen in Form eines Pellet für die real-time PCR herangezogen werden. Hier konnten Rezeptor-Externalisierungen nachgewiesen werden.

6.3.1. Pelletierung von humanen Fibroblasten

Die humanen Fibroblasten wurden hierfür in 6-Loch Platten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Entfernung des Mediums (Fibroblast Media2, PromoCell GmbH, Heidelberg) und einem Waschschrift mit PBS wurde 1mL frisches Medium zugeführt und darauf 1mL nekrotisches Zelllysate (1:1 Verdünnung). Nach dem Einhalten von zwei unterschiedlichen Inkubationszeiten (6 und 24 Stunden) wurde der Überstand verworfen und dreimal ein Waschschrift mit jeweils 2mL PBS durchgeführt. Um die Zellen abzulösen, verwendet man 500 μ L Trypsin-EDTA (Sigma- Aldrich, Steinheim) pro Well und inkubiert im Brutschrank für 2-3 min. Die Ablösung wurde unter einem Lichtmikroskop kontrolliert und daraufhin die Reaktion durch Zugabe von 2mL PBS mit 10% FCS versetzt. Die Zellsuspension wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen bei -80°C bis zur Durchführung der PCR gelagert.

6.3.2. Herstellung konditionierter Medien und Gewinnung von Mediumüberstand für den ELISA

Die Herstellung des Medium-Überstandes für den ELISA ähnelt dem der Pelletherstellung wie unter IV.6.3.1 beschrieben. So wurden auch in 6-Loch Platten die Fibroblasten bis zur Konfluenz kultiviert. Der Medienüberstand entfernt und 1mL frisches Fibroblasten-Medium mit 1 mL nekrotischem Zelllysate, mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro mL, auf die Zellen verbracht (1:1 Verdünnung). Nach einer Inkubationsdauer von 6 bzw. 24 Stunden wurde der stimulierende Überstand wieder abgenommen und es erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit 2mL PBS. Danach wurden 2 mL Fibroblasten- Medium in jedes Well verbracht und nochmals für 24 Stunden inkubiert. Nun wurde der Überstand mit einer Pipette (Eppendorf, Hamburg) abgenommen und in einem 15 mL Falconröhrchen bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Sterilfilter (\varnothing 0,22 μ m Porengröße; Pall Corporation, Ann Arbor, USA) in ein Reaktionsgefäß filtriert und anschließend bei -80°C bis zur Messung gelagert.

6.4. ELISA

6.4.1. Testprinzip ELISA

Der ELISA (Enzym-Linked-Immunosorbant-Assay) ist ein antikörperbasierter, quantitativer Immunoassay, bei dem durch das Enzyms (Marker) der Substratumsatz und somit die Antigenkonzentration bestimmt werden kann.¹⁸⁹ Dabei kann sowohl der zu bestimmende Antikörper oder das Antigen an der festen Phase in einer Multiwellplatte gebunden sein. Nach Zugabe des zu untersuchenden Materials wird die zu bestimmende Substanz gebunden, wenn sie vorhanden ist. Nach einem Waschschrift wird der Sekundärantikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, in die Wells pipettiert. Nach Zugabe eines Substrates wird dieses, je nach Menge der vorhandenen Enzyme, umgesetzt. Der Substratumsatz wird durch einen Farbumschlag sichtbar und anschließend kann die optische Dichte mit Hilfe eines Photometers gemessen werden. Die optische Dichte steigt dabei mit der Konzentration und somit kann die Menge der untersuchenden Substanz in der Probe bestimmt werden.

6.4.2. Durchführung ELISA

Um den quantitativen Gehalt an Fraktalkin (CX3CL1) in den stimulierten Fibroblasten nachzuweisen, wurde der kommerziell verfügbare Kit (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, USA) angewendet. Zuerst wurden die hierfür benötigten Reagenzien angesetzt, um eine Verdünnungsreihe herzustellen. Dies ermöglicht die Erstellung einer Eichkurve, mit der die Konzentration der Messdaten bestimmt werden konnte. Man begann mit dem Pipettieren von 100 µL Assay Diluent in jedes Well der 96-Loch-Platte. Zusätzlich kamen 100 µL der Probe bzw. des jeweiligen Standards in das entsprechende Well und inkubierte für 3 Stunden die Proben bei 2-8 °C (Kühlschrank). Darauf folgten die Entfernung des Überstandes und ein viermaliger Waschschrift mit jeweils 400 µL Waschpuffer. Nun folgte die Zugabe von 200 µL des Konjugates in jedes Well und ein erneuter Inkubationsschrift von einer Stunde wieder bei 2-8 °C. Danach wurde der Überstand wieder entfernt und viermal gewaschen. Die Zugabe von 200 µL Substrates in jedes Well und eine Inkubation von 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur ist der folgende Schritt. Zuletzt wurde die Reaktion mit 50 µL Stopp-Reagenz beendet und die Platte innerhalb der nächsten halben Stunde bei 450 nm mittels eines Photometers ausgelesen.

6.5. Durchführung der real-time PCR

Mit der real-time PCR ist es möglich aus den stimulierten humanen Fibroblasten verschiedene Chemokine und Expressionslevel von diversen Rezeptoren nachzuweisen. Hierfür wird die RNA aus den Zellen isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben, um einen PCR durchführen zu können. Der Vorteil liegt in der zusätzlichen Quantifizierung der Probe. In dieser Arbeit kamen die Pellets zum Einsatz, die bei der Stimulation mit nekrotischen Zelllysat gewonnen wurden (siehe IV.6.3.1).

6.5.1. Isolation von RNA aus den Zellpellets

Zur Isolation der RNA aus dem Pellet wird das RNeasy Kit von Qiagen (Hilden) verwendet, der alle benötigten Reagenzien enthält. Unter dem Abzug wird zuerst der Mastermix aus 1:100 Mercaptoethanol in RLT-Puffer (Lysis-Puffer) angesetzt. In jede Probe wurden jeweils 350 µL des Mastermixes dazu pipettiert und gründlich vermischt. Darauf erfolgte die Zugabe von 350 µL 70%iger Ethanol (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn). Nach dem Überführen der Probe in eine Säule, wurde diese bei 8000 rcf für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und nach Zugabe von 350µL RW1 Puffer folgte nochmals ein Zentrifugationsschritt bei 8000 rcf für 15 s. Wieder wurde der Durchfluss verworfen und es folgte die Zugabe von 500 µL RPE-Puffer mit einem Zentrifugationsschritt von 8000 rcf für 2 min. Es folgte ein Trocknungszentrifugationsschritt und das Überführen der Säule in ein neues Reaktionsgefäß. Es wird 40 µL RNase-freies Wasser auf die Säule pipettiert und eine Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte der letzte Zentrifugationsschritt bei 8000 rcf für 1 min. Die RNA befindet sich nun im Eluat und kann bei -80°C gelagert werden.

6.5.2. Umschreibung in cDNA

Damit die RNA in DNA umgeschrieben werden konnte, kam der High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) zur Anwendung. Zuerst wurde auch hier ein Mastermix hergestellt, der aus 2µL 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 3,2 µL Nuklease-freies-Wasser je Probe bestand. Bei der negativ Kontrolle kam steriles Wasser statt der reversen Transkriptase zum Einsatz. Pro Reaktionsgefäß wurden nun 10 µL Mastermix vorgelegt, auf die 10 µL RNA (Gewinnung siehe IV.6.5.1) folgen. Nach kurzem Zentrifugieren der Proben wurden diese in den ThermoCycler

(Applied Biosystems, Veriti 96 well Thermal Cycler, Carlsbad, USA) gestellt und nach folgendem Protokoll die cDNA- Gewinnung gestartet: 10 min bei 25°C, 2x 60 min bei 37°C und 5 min bei 85°C. Zuletzt bei 4°C im unendlich Modus. Die so gewonnene cDNA kann bei -20°C gelagert werden.

6.5.3. real-time PCR

Für die rt-PCR kam wieder ein Kit zum Einsatz, der von Qiagen für SYBR® Green-basierte real-time PCR (Quanti Tect® Primer Assay, Quiagen, Hilden) entwickelt wurde. Alle verwendeten Substanzen entstammen dem Kit. Die cDNA mit den entsprechenden Primer wurden auf Eis gelagert aufgetaut. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 5 aufgeführt. Als Positivkontrolle kam das β -Aktin zum Einsatz, das von allen Zellen exprimiert wird und so als Referenzwert herangezogen werden kann.

Tabelle 5: Primerauswahl für die real time-PCR

Primer	Nummer
β - Aktin	QT 01680476
CXCL1	QT 00199752
CX3CL1	QT 00098490
MIF	QT 00219233
CCL2	QT 00212730

Wie bei jeder PCR stand zuerst die Herstellung des Mastermixes an. Dieser besteht je Primer und Probe aus 2 μ L Primer, 10 μ L SYBR®Green und 7 μ L Nuklease-freies Wasser. 19 μ L des Mastermixes wurden auf eine 96well rt-PCR Platte, die auf Eis liegt, vorgelegt und darauf dann jeweils 1 μ L cDNA pipettiert. Nach Verschließen der 96-well Platte folgte ein kurzer Zentrifugationschritt, bevor die Platte in den Real-Time Cycler (PerkinElmer, ABI Prism™ gestellt wurde. Es konnte der Programmdurchlauf gestartet werden, der nach folgendem Programm abläuft: 50°C bei 2 min, 95°C bei 10 min und eine 40-fache Zyklus bestehend aus 95°C 15 s und 60°C 1 min. Die Auswertung der Expressionswerte erfolgte nach der Methode von Livak und Schmittgen. Diese Methode ermöglicht die Analyse der relativen Veränderungen in der Genexpression von quantitativen real-time PCR-Experimenten¹⁹⁰.

7. Aggregationsassay

7.1. Turbimetrisches Verfahren nach Born

7.1.1. Testprinzip

Die Aggregometrie nach Born (turbimetrisches Verfahren) ist in der Funktionsdiagnostik der Thrombozyten eine Methode, bei der sich die optische Dichte einer Plättchensuspension durch Verklumpen (Aggregation) verändert und photometrisch erfasst werden kann. Die dabei aufgezeigte Kurve lässt Rückschlüsse auf die Thrombozytenfunktion zu¹⁹¹. Wichtige Beurteilungskriterien sind die Geschwindigkeit und der Kurvenverlauf.

7.1.2. Intracardiale Blutentnahme

Um eine ausreichende Menge Blut für die Isolierung der Thrombozyten oder für weitere Untersuchungen zu gewinnen, bspw. zur Kontrolle der Depletionsversuche, wurde die Technik der kardialen Blutentnahme angewandt.

Die in Rückenlage befindlichen Maus wurde dazu narkotisiert wie unter IV.2.1 beschrieben, der Bauchraum mit Alkohol besprüht und mit einer Schere und Pinzette vom Xiphoid ausgehend in Richtung cranial ein ovaler Schnitt gesetzt. Mit einer 2 mL Spritze (B.Braun, Melsungen), in der eine 0,106 molare Natriumcitratlösung als Antikoagulanzen vorgelegt war, wurde zwischen der 2. und 3. Rippe in einem 45° Winkel eingegangen und vorsichtig aspiriert. Dabei konnten bis zu 1,5 mL Blut gewonnen werden.

7.1.3. Isolation von murinen Thrombozyten

Das durch kardiale Blutentnahme gewonnene Blut (IV.7.1.2) wurde in ein FACS-Röhrchen (Sarstedt, Numbrecht) überführt und mit einem Puffer (Tyrodes, pH 6,5) auf 2 mL aufgefüllt. Um möglichst physiologische Bedingungen für die Zellen zu gewährleisten, wird ein Tyrodespuffer in zwei verschiedenen pH- Werten (6,5 und 7,4) angesetzt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 68 x g für 20 min ohne Bremse (Haereus, Megafuge, Hanau). Der dabei entstandene Überstand über der RBC- Fraktion (rote Blutzellenfraktion) stellte als Wölkchen das PRP (platelets rich plasma) dar, das vorsichtig in ein neues Gefäß überführt wurde. Zur Anwendung kamen auch gewaschene Plättchen, die durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt des PRP gewonnen werden konnten. Dabei wird das PRP wiederholt mit Tyrodes pH 6,5 versetzt und bei 1277 x g für 10 min mit Bremse zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wird mit jeweils Tyrodes pH 6,5 und 7,4 resuspendiert, um wieder

physiologische Bedingungen herzustellen. Die Thrombozytenzahl wurde am Blutanalysegerät (ABX Micros ES60, Horiba ABX Diagnostics, Axon Lab AG, Reichenbach/Germany) ermittelt und auf die gewünschte Konzentration von 150×10^3 Plättchen/ μL eingestellt. Die so gewonnenen Thrombozyten konnten nun für die Aggregationsmessungen eingesetzt werden.

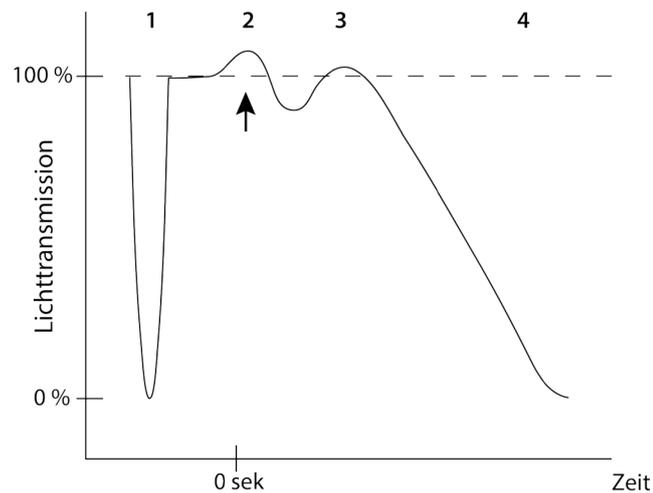


Abbildung 22: Schematischer Kurvenverlauf bei der Lichttransmissions-Aggregometrie nach Born

1) Referenzküvette mit ausschließlich PRP, welches 100% der Lichttransmission darstellt 2) Zugabe des Agonisten; kurzzeitige Abnahme der Lichttransmission durch „shape change“ der Thrombozyten 3) Kurvenverlauf zeigt die Geschwindigkeit der Aggregation an 4) maximale Thrombozytenaggregation

7.1.4. Durchführung der Messung

Um die Aggregationsversuche durchzuführen, muss plättchenreiches- Plasma (PRP; platelets rich plasma) bzw. gewaschene Plättchen (WP; washed platelets) wie unter IV.7.1.3 beschrieben, hergestellt werden.

Die Aggregometrie wurde an dem Pap-8 (Platelet Aggregation Profiler Corporation, Horsham, Pennsylvania/USA) durchgeführt. Der Ansatz aus 220 μL PRP wurde in eine Glasküvette mit magnetischem Rührstab pipettiert und mit 5 μL einer 1 mM Lösung aus MgCl_2 und CaCl_2 versetzt. Nach Zugabe des Agonisten (Collagen 10 U) bei der Positiv-Kontrolle wurde bei der Versuchsgruppe das nekrotischen Zelllysat in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und über 10 Minuten die Aggregationskurven aufgezeichnet. Die zur Analyse notwendigen Daten wurden von dem integrierten Rechner des Analysegeräts berechnet und dokumentiert. Die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe eines statistischen Programms.

8. Versuchsplanung und Durchführung

In vitro Versuche

Whole Mount staining:

Tabelle 6: C57BL6- Mäuse zur Durchführung der histologischen Färbung

Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
C57BL6	wt/wt	m	8- 10 Wochen	3

ELISA:

Tabelle 7: Untersuchung mittels ELISA auf Chemokine

	Anzahl n
stimulierte humane Fibroblasten	3
unstimulierte humane Fibroblasten	3

realTime-PCR:

Tabelle 8: Untersuchung mittels rt-PCR auf Chemokine und deren Rezeptoren

	Anzahl n
stimulierte humane Fibroblasten	3
unstimulierte humane Fibroblasten	3

Aggregationsmessungen:

Tabelle 9: C57BL6- Tiere zur Durchführung der Aggregationsmessungen

Versuch	Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
Kälte	C57BL6	wt/wt	m	8- 10 Wochen	4
Hitze	C57BL6	wt/wt	m	8- 10 Wochen	4

In vivo Versuche:

Imagen mit und ohne setzen eines Stimulus:

Tabelle 10: Fraktalkin-Tiere mit und ohne Laserverletzung

Versuch	Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
mit Verletzung	CX3CR1eGFP	ki/wt	m	8- 16 Wochen	4
ohne Verletzung	CX3CR1eGFP	ki/wt	m	8- 16 Wochen	4

Färbung der Thrombozyten mit eFluor670:

Tabelle 11: Fraktalkin- Tiere zur Thrombozyten-Färbung

Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
CX3CR1eGFP	ki/wt	m	10-20 Wochen	3

Thrombozyten-Depletion:

Tabelle 12: Fraktalkin- Tiere zur Durchführung der Thrombozyten-Depletion

Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
CX3CR1eGFP	ki/wt	m	10-16 Wochen	3
CX3CR1eGFP	ki/wt	m	10-16 Wochen	3

Tabelle 13: LysM- Tiere zur Durchführung der Thrombozyten-Depletion

Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
LysMeGFP	ki/wt	m	10-16 Wochen	3
LysMeGFP	ki/wt	m	10-16 Wochen	3

Neutrophilen Depletion**Tabelle 14: Fraktalkin- Tiere zur Durchführung der Neutrophilen-Depletion**

Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
CX3CR1eGFP	ki/wt	m	10-16 Wochen	4
CX3CR1eGFP	ki/wt	m	10-16 Wochen	4

Laserverletzung:**Tabelle 15: Fraktalkin zur Untersuchung des CX3CR1- Rezeptors**

Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
CX3CR1eGFP	ki/ki	m	10-16 Wochen	3
CX3CR1eGFP	ki/wt	m	10-16 Wochen	3

Inhibition von HMGB1 durch BoxA:**Tabelle 16: BoxA-Gruppe an LysM-Tieren**

Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
LysMeGFP	ki/wt	m	10-16 Wochen	3
LysMeGFP	ki/wt	m	10-16 Wochen	3

Tabelle 17: BoxA-Gruppe an Fraktalkin-Tieren

Stamm	Genotyp	Geschlecht	Alter	Anzahl n
CX3CR1eGFP	ki/wt	m	10-16 Wochen	3
CX3CR1eGFP	ki/wt	m	10-16 Wochen	3

9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erstellten Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc.(SSI), San Jose, California, USA). Es wurden jeweils zwei Gruppen auf einen signifikanten Unterschied untersucht. Die statistische Signifikanz wird bei einem Wert $< 0,05$ angenommen. Dabei kam der t-test bzw. Mann-Whitney Rangsummentest zum Einsatz. Das Programm führte zunächst einen Test auf Normalverteilung nach Shapiro- Wilk und überprüft die Varianzhomogenität. Wenn beide Überprüfungen positiv waren, kam der t-test zum Einsatz. Wenn der Test auf Normalverteilung scheiterte, wurde der Mann- Whitney durchgeführt. Die so gewonnenen Einzelwerte wurden als Streudiagramme (dot plots) in SigmaPlot erstellt und graphisch in Adobe Illustrator aufbereitet. Bei einem Vergleich > 2 Gruppen wurden die Versuchsgruppen ($n= 4$) anhand einer Bonferroni-Adjustierung mit $n= 4$ ($0,05/4= 0,0125$) durchgeführt. Damit konnte festgelegt werden, dass bei einem p-Wert $< 0,0125$ eine statistische Signifikanz angenommen werden kann.

Die Berechnung der AUC (Area under the curve) erfolgte, um die Zuwachsraten bei der Zellrekrutierung zu analysieren. Hierfür wurde für jede Versuchsgruppe die Methode von Bland¹⁹² angewendet. In die Graphen wurde die AUC als kolorierte Fläche dargestellt und zusätzlich die einzelnen Mittelwerte mit deren Standardfehler (SEM) zu dem gezeigten Zeitpunkt über den Beobachtungszeitraum aufgetragen. Es wurden sowohl die einzelnen Zeitpunkte der beiden zu untersuchenden Versuchsgruppen gegeneinander mit Hilfe des t-tests bei Normalverteilung oder beim Scheitern diesem, der Mann-Whitney Ranksumentest herangezogen. Die Interpretation des dimensionslosen Effektmaßes Cohen`s d erfolgte mit Hilfe einer Exceltabellen-Kalkulation nach Nakagawa und Cuthill et al¹⁹³. Als Definition des Effektmaßes Cohen`s d wird festgelegt, dass ein geringer Effekt vorliegt bei allen Werten $d < 0,5$, ein mittlerer Effekt bei $d \leq 0,5$ und alle Werte $p > 0,8$ sind als große Effekte zu interpretieren¹⁹³.

Die Auswertung der Daten bei der rt-PCR erfolgte nach der Methode von Livak und Schmittgen¹⁹⁴. Diese Methode ermöglicht die Analyse der relativen Veränderungen in der Genexpression¹⁹⁴.

V. ERGEBNISSE

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt in der Analyse der intravaskulären Rekrutierung und des Migrationsverhaltens myeloider Zellen im interstitiellen Gewebe. Die Rekrutierung dieser Zellpopulation im Gefäß nach einem Entzündungsreiz ist bereits im Detail beschrieben^{75,195}. Die genauen Mechanismen bei steriler Inflammation mit ihren verschiedenen Faktoren nach dem Übertritt aus dem Gefäß ins Gewebe bis hin zur interstitiellen Migration zum Entzündungsfokus ist dabei noch relativ unbekanntes Terrain.

In dieser Arbeit wurden die zellulären Prozesse bei steriler Inflammation *in vivo* mittels intravitaler 2-Photonenmikroskopie über die Zeit visualisiert und analysiert. Es wurden sowohl die Vorgänge in den postkapillären Venolen, als auch das interstitielle Gewebe untersucht. Ein Hauptaugenmerk lag auch auf der Interaktion der myeloiden Leukozyten untereinander sowie mit Thrombozyten, wofür jeweils die verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichen Versuchsansätzen depletiert wurden, um so einen Effekt beim Fehlen dieser Zellen heraus zu arbeiten (V.4/V.5). Außerdem wurde auch das Zellverhalten mit drei verschiedenen Parametern (Geschwindigkeit, Beweglichkeit und Zielgerichtetheit) untersucht, um beurteilen zu können, ob sich das Bewegungsmuster im interstitiellen Gewebe abhängig von anderen Zelltypen ändert.

1. Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten bei der Laserverletzung

Zunächst wurde der Einfluss eines sterilen Stimulus auf die Zellrekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Thrombozyten untersucht. Der Effekt der verschiedenen Mediatoren auf die myeloiden Zellen, die bei einem Zelluntergang im Gewebe freigesetzt werden, wurden dabei näher betrachtet. Aus diesem Grund wurde eine Gruppe mit einer Verletzung mittels Laser gegen eine Kontrollgruppe, die keinem Laserschaden erfahren hatte, untersucht. Hier wurde untersucht, ob auch ohne Laserverletzung eine Rekrutierung von Zellen ins Gewebe stattfinden würde. In Abbildung 23 ist dargestellt, wie die Gegebenheiten im zu untersuchenden Gewebsausschnitt vorlagen. Vor der Verletzung waren noch keine neutrophilen Granulozyten zu sehen, die erst nach Setzen des Laserschadens zeitnah

durch diesen angelockt wurden. Zu einem späteren Zeitpunkt traten auch die Monozyten aus dem Gefäßsystem ins Gewebe über.

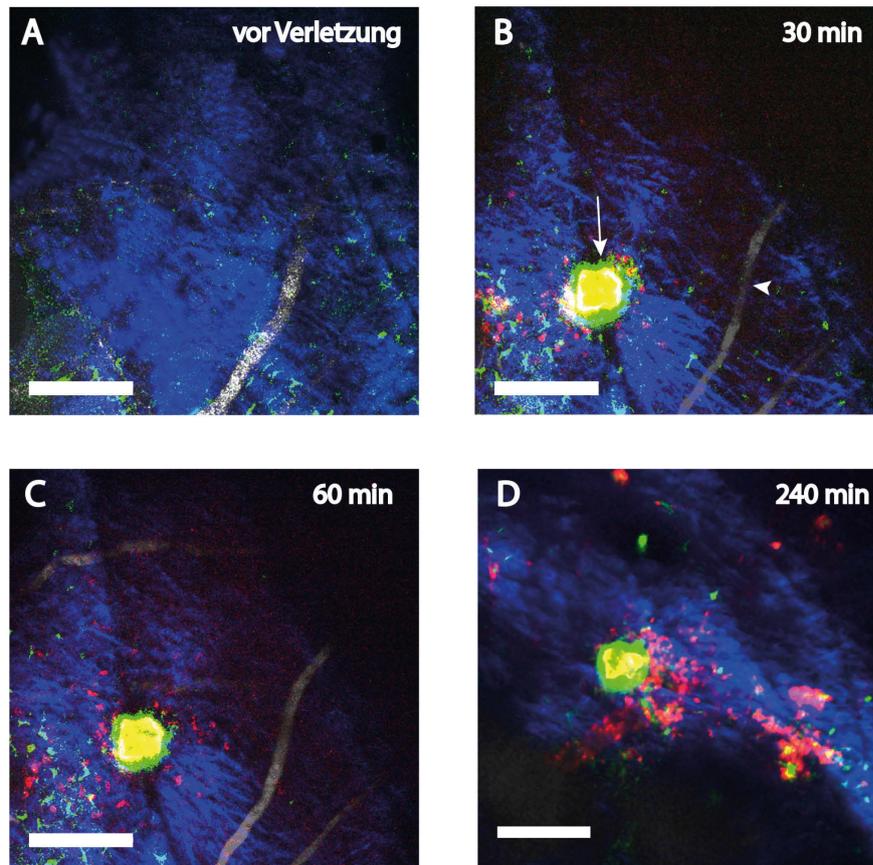


Abbildung 23: Darstellung der 2-Photonenmikroskopischen Analyse über den zu untersuchenden Zeitraum

A) zeigt die Situation im Gewebe vor der Verletzung **B)** nach dem Setzen der Laserverletzung (Pfeil), die durch die Autofluoreszenz in gelb sichtbar wird und Darstellung der Gefäße (Pfeilspitze) **C)** ersten neutrophilen Granulozyten werden rekrutiert (rot) **D)** zeigt den Gewebeausschnitt in der Haut über die Zeit unter Einfluss der Verletzung. Darstellung des Gefäßes mit Q-dots 705 nm (weiß), neutrophile Granulozyten markiert mit Lys6G-AK PE (rot) und Monozyten/ Makrophagen (grün) in einer CX3CR1-GFP Maus dargestellt. Das Kollagen ist in blau abgebildet (SHG). Maßstab: 100 μ m.

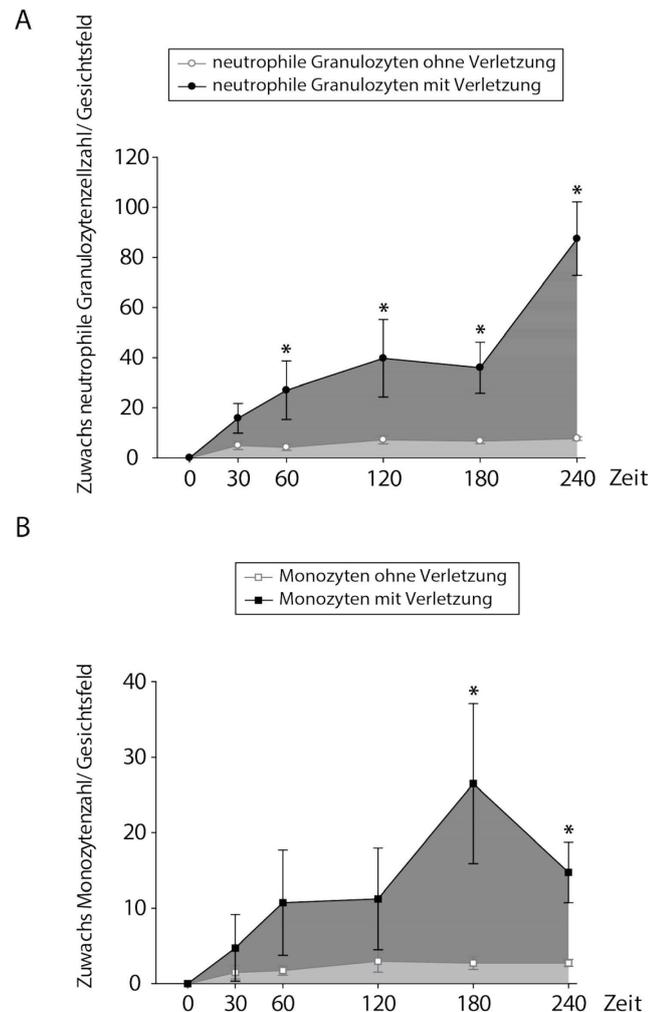


Abbildung 24: Zeitverlauf der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten

In schwarz sind die Versuchsgruppen mit einer Verletzung abgebildet, dabei stellen die runden Symbole (●) den Mittelwert (MW) der neutrophilen Granulozyten **A** zu dem jeweiligen Zeitpunkten und dem Standardfehler (SEM) dar und die rechteckigen Symbole (■) die MW der Monozyten **B** mit dem jeweiligen SEM zu dem definierten Zeitpunkten. In weiß ist die jeweilige Kontrollgruppe gegenübergestellt. Die grau eingefärbte Fläche stellt die Area under the curve (AUC) dar, die jeweils berechnet wurde (grau = Verletzungsgruppe; hellgrau= Kontrollgruppe). Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. Ein Gesichtsfeld bestand aus $588 \times 588 \times 30 \mu\text{m}$. Die jeweilige Gruppengröße beträgt $n=4$.

In der Abbildung 24 ist die Situation für die neutrophilen Granulozyten und die Monozyten über den analysierten Zeitraum aufgetragen. In der oberen Abbildung wurde die Situation der neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld im Zeitverlauf vor der Verletzung (Zeitpunkt 0), darauffolgend nach Setzen der Verletzung zu den Zeitpunkten 30, 60, 180 und 240 Minuten aufgetragen. Dabei wurden zu den einzelnen Zeitpunkten die Durchschnittswerte mit dem dazugehörigen Standardfehler

angezeigt. Über die Flächenberechnung konnte der Zuwachs über den Zeitraum dargestellt werden. Dem gegenübergestellt ist die Kontrollgruppe, in der kein Laserschaden vorhanden war. Deutlich kann man in dem Graphen erkennen, dass die neutrophilen Granulozyten auf einen sterilen Stimulus mit einer schnellen, schon nach wenigen Minuten beginnenden Rekrutierung reagieren. Die Zellzahlen zeigten schon nach einer Stunde einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe, die bis zum letzten ermittelten Zeitpunkt (240 Minuten) bestehen blieb. Durch die Flächenberechnung (AUC) konnte auch ein Zuwachs ermittelt werden, der mit 527% einen starken Anstieg gegenüber der Kontrolle verdeutlichte. Es konnte ein signifikante Unterschied beider Gruppen ($p=0,019$) berechnet werden. Um die Signifikanz näher zu interpretieren, wurde die Effektstärke ermittelt, die mit einem Wert von $d=2,61$ einen starken Effekt unterstreicht (siehe Tabelle 18). So konnte eine signifikante Reaktion der neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation im kutanen Gewebe festgestellt werden.

Tabelle 18: Zusammenfassung der statistische Werte der neutrophilen Granulozyten Gesamtzellzahl/ Gesichtsfeld mit vs. ohne Entzündungsreiz

neutrophile Granulozyten	Zellzahl über die Zeit/ Gesichtsfeld	
	ohne Verletzung	mit Verletzung
AUC	1414 +/- (265)	8858 +/- (2310)
p- Wert	0,019*	
Effektgröße	0,31	
Zuwachs in %	527	

Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. AUC: in Klammer die SEM- Werte

Bei den Monozyten zeichnete sich eine langsamere Reaktion auf den Entzündungsreiz ab. Diese verzögerte Reaktion auf einen Entzündungsreiz ist bereits bekannt^{47,196}. Nach einer Stunde konnte eine Plateauphase, die bis zum Zeitpunkt 120 Minuten eine gleichbleibende Zellzahl erkennen ließ. Erst darauf folgend kam es zu einem Anstieg, der zum Zeitpunkt 180 einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle hatte. Die erste Welle war somit erreicht und es folgte ein Abfall an Zellen zum Zeitpunkt 240 Minuten, der aber auch signifikant zur Kontrolle war. Es konnte ein starker Zuwachs an Monozyten über den analysierten Zeitraum von 362% ermittelt werden. Auch hier ließ sich ein signifikanter Zellanstieg mit $p=0,035$ im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnen. Die Effektstärke mit $d=1,7$ lässt auf einen starken Effekt schließen (siehe Tabelle 19).

**Tabelle 19: Zusammenfassung der statistische Werte der Monozyten
Gesamtzellzahl/ Gesichtsfeld mit vs. ohne Entzündungsreiz**

Monozyten	Zellzahl über die Zeit/ Gesichtsfeld	
	ohne Verletzung	mit Verletzung
AUC	896 +/- (216)	4144 +/- (1555)
p- Wert	0,035*	
Effektgröße	1,69	
Zuwachs in %	362	

Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. AUC: in Klammer die SEM- Werte

Um die Verteilung der Zellen im Betrachtungsfeld zu quantifizieren, wurde die Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld über die jeweilige Zeitspanne nochmals unterteilt in Zellzahl im Gefäß und Zellzahl im Gewebe. Zuerst wird hier die Situation für die neutrophilen Granulozyten beschreiben und darauffolgend die Lage für die Monozyten.

Im Gefäß konnte eine erste Phase der Rekrutierung festgestellt werden, die bis zum Zeitpunkt 180 Minuten andauerte und einen steilen Anstieg zum Zeitpunkt 240 Minuten erfuhr, zu diesem dann auch ein signifikanter Unterschied vorlag. Bei der Vergleichsgruppe in hellgrau konnte ebenso eine leichte Zellanlockung im Gefäß verzeichnet werden, die aber relativ konstant über die Zeit verlief. Durch eine starke Effektgröße kann der nicht mehr ganz signifikante Werte von $p = 0.056$ trotzdem als Effekt interpretiert werden. Der Zuwachs über die gesamte Zeitspanne betrug 241%.

Der Übertritt der neutrophilen Granulozyten erfolgte sofort nach Setzen des Stimulus. Es konnte ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Verletzung schon nach einer halben Stunde gesehen werden, der bis zum Zeitpunkt 240 Minuten anhielt. Nach einer ersten Phase bis zum Zeitpunkt 180 Minuten kam es zu einem weiteren starken Anstieg, der bis zum Zeitpunkt 240 Minuten bestand. Bei der Kontrollgruppe konnte nur vereinzelt zum Zeitpunkt 120/180 Minuten ein Übertritt von neutrophilen Granulozyten festgestellt werden. Da auch keine Verletzung stattfand und somit keine DAMPs freigesetzt wurden, war dieses Zellverhalten auch zu erwarten und ist auf die Präparation sowie die mikroskopische Untersuchung zurückzuführen. Es wurde ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe über die Zeit festgestellt ($p = 0,029$), der durch ein starkes Effektmaß von $d = 1,86$ bekräftigt wurde. Die Zuwachsrate über die Zeit betrug im Gewebe 4086%.

Entsprechend war in den mikroskopischen Aufnahmen ein Bienenschwarm-ähnliches Verhalten der neutrophilen Granulozyten nach Setzen des Stimulus im Video sichtbar (siehe auch Abbildung 27).

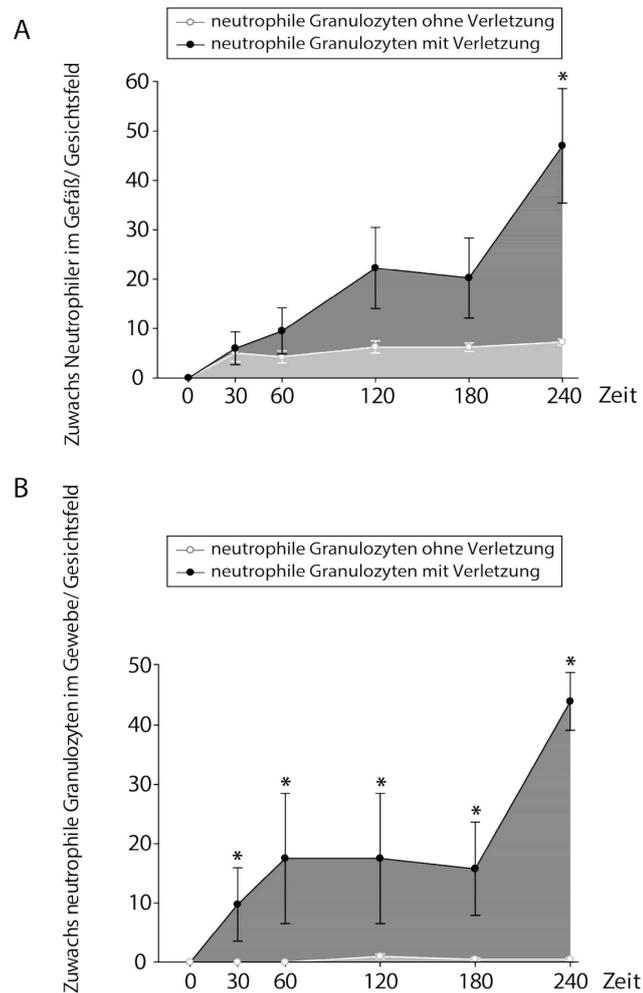


Abbildung 25: Zeitverlauf der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im Gefäßsystem und im Gewebe

In schwarz sind die Versuchsgruppen mit einer Verletzung abgebildet, dabei stellen die runden Symbole (●) den Mittelwert (MW) der neutrophilen Granulozyten zu dem jeweiligen Zeitpunkt mit dem dazugehörigen Standardfehler (SEM) dar. In weiß ist die jeweilige Kontrollgruppe gegenübergestellt. Die grau eingefärbte Fläche stellt die Area under the curve (AUC) dar, die jeweils berechnet wurde (grau = Verletzungsgruppe; hellgrau= Isotyp-Kontrolle). In Abbildung **A**) ist die Situation im Gefäß und bei **B**) im Gewebe dargestellt. Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind mit * markiert. Ein Gesichtsfeld bestand aus $588 \times 588 \times 30 \mu\text{m}$. Die jeweilige Gruppengröße beträgt $n = 4$

Tabelle 20: Zusammenfassung der statistische Werte der neutrophilen Granulozyten/ Gesichtsfeld im Gefäß A) oder Gewebe B) mit vs. ohne Entzündungsreiz

neutrophile Granulozyten	neutrophile Granulozyten im Gefäß / Gesichtsfeld	
	ohne Verletzung	mit Verletzung
AUC	1309 +/- (228)	4463 +/- (1314)
p- Wert	0,056	
Effektgröße	1,93	
Zuwachs in %	241	

neutrophile Granulozyten	neutrophile Granulozyten im Gewebe / Gesichtsfeld	
	ohne Verletzung	mit Verletzung
AUC	105 +/- (69)	4395 +/- (1884)
p- Wert	0,029*	
Effektgröße	1,86	
Zuwachs in %	4086	

Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert

Nun folgte auch die Analyse der Rekrutierung der Monozyten im Gefäß als auch im Gewebe. Im Gefäß lag die Rekrutierungsrate der Monozyten mit der Kontrollgruppe zu Beginn der Aufzeichnung gleich auf. Ein signifikanter Unterschied der Zellzahlen trat nach 180 Minuten ein, gefolgt von einem stetigen Anstieg, der noch bei Minute 240 anhielt. Es konnte ein signifikanter Wert von $p = 0,035$ ermittelt werden, der durch ein starkes Effektmaß von $d = 2,22$ belegt werden konnte. Der Anstieg der Zellen über die Zeit betrug 135% gegenüber der Kontrollgruppe. Der Anstieg zum Ende des Analysezeitraums zeigt eine nicht nachlassende Rekrutierung der Monozyten an, die zu dem letzten Zeitpunkt um 240 Minuten nicht mehr ins Gewebe übertreten.

Im Gewebe kam der Anstieg bei den Monozyten schon früher, als im Gefäßsystem (siehe Abbildung 26B), da schon gewebsständige Makrophagen vorlagen, die im Gewebe aktiviert wurden und somit zum Anstieg beigetragen haben könnten. Hier zeichnete sich auch ein zweiphasiger Anstieg ab. Bis zum Zeitpunkt 120 Minuten kann eine erste Phase abgelesen werden, die ihren zweiten Gipfel bei 180 Minuten ausweist und danach bei Zeitpunkt 240 Minuten am Absinken ist. Der Anstieg kann auch nicht so massiv gesehen werden, wenn man die große Streuung des Standardfehlers mit einbezieht. Die letzten beiden Zeitpunkte zeigten einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle an (180 und 240 Minuten). Bei der Bestimmung der Signifikanz über den gesamten Zeitraum konnte nur eine knappe Signifikanz von $p = 0,057$ ermittelt werden, die durch die Streuung des Standardfehlers zu erklären ist. Es konnte ein

starke Effektgröße von $d= 1,5$ ermittelt werden und ein Zuwachs von 505% im Gewebe festgestellt werden.

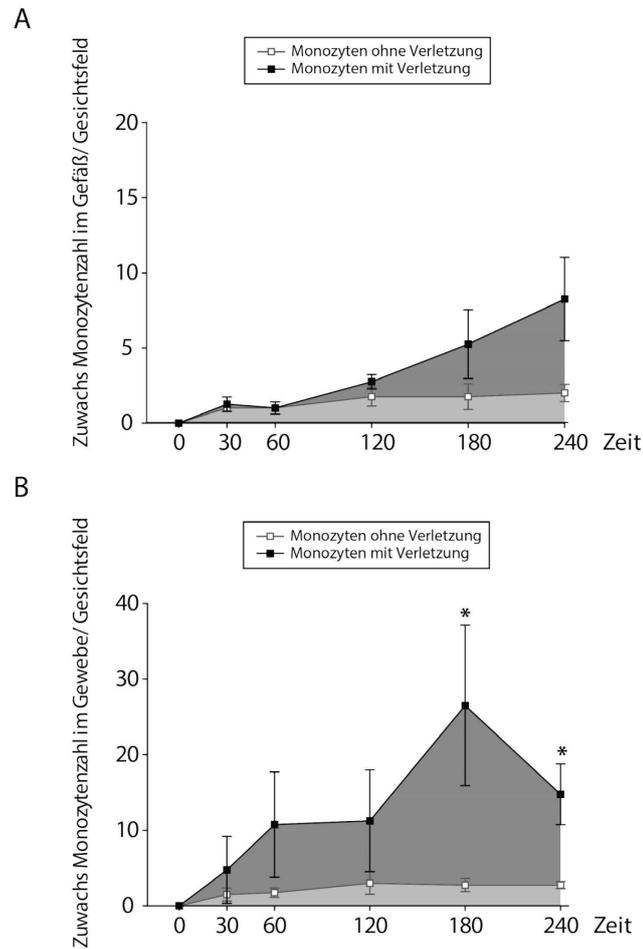


Abbildung 26: Zeitverlauf der Rekrutierung von Monozyten im Gefäßsystem und Gewebe abhängig von der Laser-Verletzung

In schwarz sind die Versuchsgruppen mit einer Verletzung abgebildet, dabei stellen die rechteckigen Symbole (■) den Mittelwert (MW) der Monozyten dar zu dem jeweiligen Zeitpunkt mit dem dazugehörigen Standardfehler (SEM). In weiß ist die jeweilige Kontrollgruppe gegenübergestellt. Die grau eingefärbte Fläche stellt die Area under the curve (AUC) dar, die jeweils berechnet wurde (grau = Verletzungsgruppe; hellgrau= Kontrolle). In Abbildung **A**) ist die Situation im Gefäß und bei **B**) im Gewebe dargestellt. Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind mit * markiert. Ein Gesichtsfeld bestand aus $588 \times 588 \times 30 \mu\text{m}$. Die jeweilige Gruppengröße beträgt $n = 4$

Tabelle 21: Zusammenfassung der statistische Werte der Monozyten/ Gesichtsfield im Gefäß A) oder Gewebe B) mit vs. ohne Entzündungsreiz

Monozyten	Monozyten im Gefäß / Gesichtsfield	
	ohne Verletzung	mit Verletzung
AUC	345 +/- (109)	810 +/- (132)
p- Wert	0,035*	
Effektgröße	2,22	
Zuwachs in %	135	

Monozyten	Monozyten im Gewebe / Gesichtsfield	
	ohne Verletzung	mit Verletzung
AUC	551 +/- (184)	3334 +/- (1511)
p- Wert	0,057	
Effektgröße	1,49	
Zuwachs in %	505	

Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. AUC in Klammer die SEM- Werte

Es kann zusammenfassend in diesen Versuchen gezeigt werden, dass bei einem Laserschaden, der einen sterilen Entzündungsreiz nachahmt, ein signifikanter Anstieg der beiden myeloiden Zellpopulationen (neutrophile Granulozyten und Monozyten), zu verzeichnen ist. Daraus kann man einen Effekt *in vivo* im Ohrmodell auf die hier beschriebenen Zellen sehen und diesen weiter, besonders in Hinsicht auf den extrazellulären Raum, untersuchen. Zudem weisen die Daten darauf hin, dass die Rekrutierung von myeloiden Zellen nicht stetig verläuft, sondern in unterschiedlichen zeitlichen Phasen.

2. Interaktion von Thrombozyten mit myeloiden Leukozyten

Dass Leukozyten nicht nur durch aktiviertes Endothel stimuliert werden können, sondern dies auch durch Interaktion untereinander sowie mit Thrombozyten initiiert werden kann, ist in der Literatur schon beschrieben¹⁹⁷. Sie bilden dabei Leukozyten-Thrombozyten-Komplexe¹⁹⁸ und ein erst kürzlich veröffentlichte Publikation suggeriert, dass neutrophile Granulozyten Komplexe mit Plättchen bilden mit denen die Gefäßwand nach weiteren aktivierten Plättchen abgetastet wird und dort die neutrophilen Granulozyten vermehrt austreten¹⁹⁹. Daher wurde untersucht, ob Thrombozyten bei steriler Inflammation ans Endothel adhären und ob sie mit myeloiden Leukozyten in Kontakt treten. In der Abbildung 27 ist eine Übersichtsdarstellung abgebildet, mit dem Fokus auf Interaktionen zwischen den beiden Zellpopulationen. Die neutrophilen Granulozyten sind in der hier verwendeten Mauslinie im LysM-Lokus mit GFP gekoppelt (IV.1.2.2) und werden im 2-Photonenmikroskop in grün dargestellt. Die Thrombozyten werden mittels Färbung in weiß dargestellt (IV.4.4). Das Bild zeigt die beiden Zellpopulationen im Milieu einer sterilen Entzündung mit einem Ausschwärmen der neutrophilen Granulozyten vom Gefäßsystem ins Gewebe. Im Gefäßsystem können aber immer wieder kurze Interaktionen zwischen den beiden Zellpopulationen beobachtet werden, teilweise bei transmigrierenden neutrophilen Granulozyten.

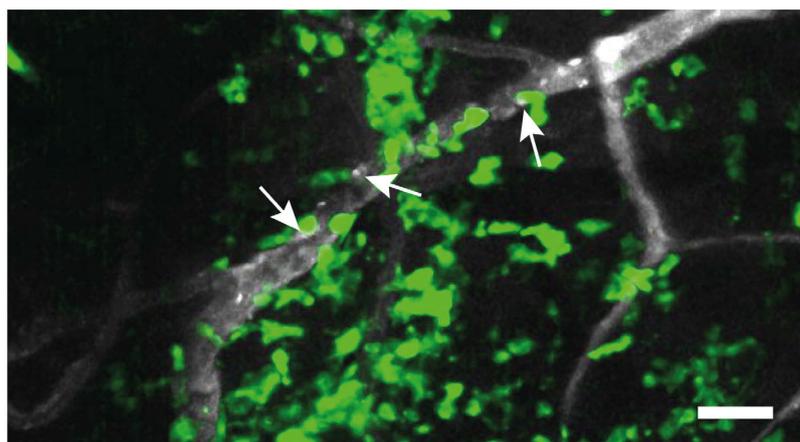


Abbildung 27: Übersicht über Interaktionen von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten bei steriler Entzündung

Die Thrombozyten wurden mit eFluor670 gefärbt und sind hier als weiße Zellen dargestellt. Die grünen Zellen sind neutrophile Granulozyten. Gefäß ist in grau dargestellt. Pfeile deuten auf Interaktionen zwischen neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten. Maßstab= 50 µm.

Die transienten Kontakte der Thrombozyten mit den neutrophilen Granulozyten waren nur von kurzer Dauer (<30 Sek.). Die zeitweisen Interaktionen fanden primär lumenwärts statt (siehe Abbildung 28), welches auf eine Aktivierung schließen lässt. Eine daraus resultierende Aggregatbildung konnte aber nicht beobachtet werden. Vereinzelt zeigte sich, dass neutrophile Granulozyten nach einem temporären Kontakt aus dem Gefäßsystem austraten.

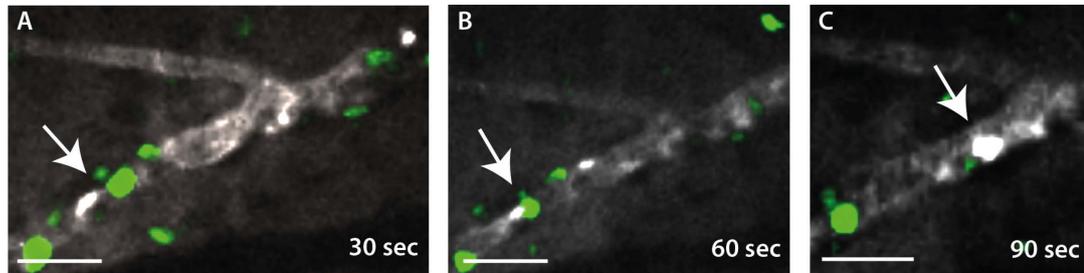


Abbildung 28: Transiente Interaktionen der Thrombozyten mit neutrophilen Granulozyten im vaskulären Gefäßsystem

Die Thrombozyten wurden mit eFluor 670 gefärbt und sind hier als weiße Zellen dargestellt. Die grünen Zellen sind GFP- markierte neutrophile Granulozyten. Das Gefäß ist mit Qtracker 705 in grau dargestellt. Bei **A**) ist eine Interaktion zwischen einem Thrombozyt vor Kontakt mit einem neutrophilen Granulozyten abgebildet, bei **B**) die Interaktion zwischen beiden Zellpopulationen und bei **C**) eine Aggregatbildung der Thrombozyten nach der Interaktion (siehe jeweilige Pfeile) Maßstab= 30 µm.

Die Thrombozyten traten nicht nur mit neutrophilen Granulozyten in Kontakt, sondern es konnten auch Interaktionen der Plättchen mit transmigrierenden Monozyten beobachtet werden. Auch im hier gezeigten Ohrmodell konnten transiente Interaktionen der Thrombozyten mit intravaskulären Monozyten beobachtet werden.

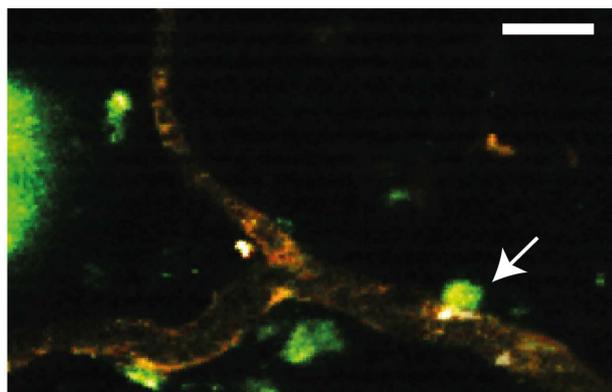


Abbildung 29: Kontakt transmigrierender Monozyt mit Plättchen

Die Thrombozyten wurden mit eFluor670 gefärbt (weiße Zellen). Die grünen Zellen sind Monozyten/Makrophagen. Das Gefäß wurde mit TRITC gefärbt (rot). Im linken Bildrand ist der Rand der Laserverletzung in grün dargestellt. Der Maßstab beträgt 30 µm.

Zusammenfassend kann hier *in vivo* mittels 2-Photonentechnik gezeigt werden, dass transiente Interaktionen mit Thrombozyten sowohl zwischen den neutrophilen Granulozyten als auch mit den Monozyten bei einer sterilen Inflammation stattfinden.

3. Interaktionen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/ Makrophagen im intravaskulären, perivaskulären und interstitiellen Raum

Durch die Möglichkeit sowohl der neutrophilen Granulozyten, als auch der Monozyten das Gefäß zu verlassen erschließen sich auch noch weitere Berührungspunkte sowohl im intravaskulären als auch interstitiellen Raum. Diese Interaktionen zwischen den beiden Zellpopulationen wurden *in vivo* weiter analysiert.

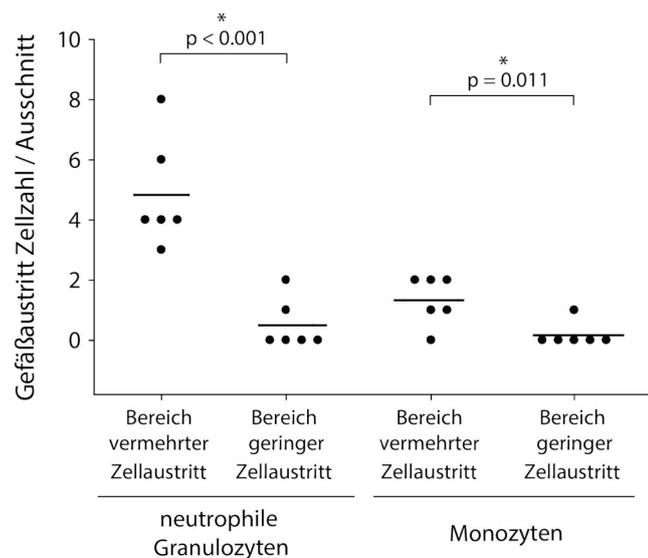


Abbildung 30: Gegenüberstellung Bereich vermehrter Zellaustritt vs. Ausschnitt mit geringem Zellaustritt

Vergleich der Zellzahlen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten, die in einem Ausschnitt (100 x 100 x 30 µm) austreten. Vergleich von Bereichen mit einem hohen Zellaustritt vs. geringen Zellaustritt. Fensteranzahl n= 6. Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert.

In Gefäß konnte beobachtet werden, dass die neutrophilen Granulozyten nach Kontakt mit Monozyten und dann primär auch im Bereich von perivaskulär gelegenen Makrophagen austreten. Letzteres wurde schon im Hintergrund einer bakteriellen

Entzündung gezeigt¹⁴⁰. Dieses Phänomen konnte auch bei einer sterilen Entzündung beobachtet werden (siehe Abbildung 30). Hier wurde sichtbar, dass es Bereiche in der Gefäßstruktur gibt, in denen die Zellen bevorzugt in Kontakt mit anderen Zellen treten (sowohl Monozyten als auch neutrophilen Granulozyten) und danach bevorzugt dort ins Gewebe austreten. Es wurden auch signifikante Unterschiede festgestellt, sowohl im Austritt bei den Monozyten wie auch bei den neutrophilen Granulozyten. In Abbildung 31 ist außerdem der Migrationsweg eines repräsentativen neutrophilen Granulozyten dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass der neutrophile Granulozyt im Moment der Interaktion mit einem perivaskulären Makrophagen langsamer wandert als vor dem Kontakt.

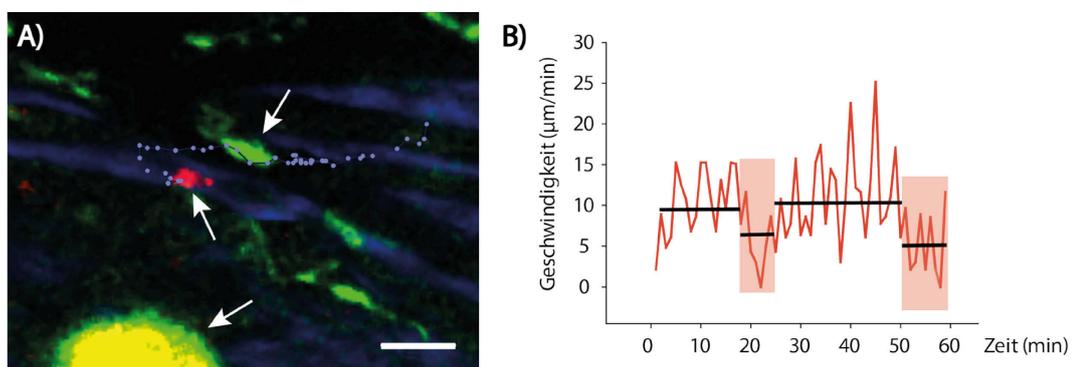


Abbildung 31: Migrationsweg eines neutrophilen Granulozyten, der in Kontakt mit einem perivaskulären Makrophagen tritt

A) Perivaskulärer Makrophage (oberer Pfeil; in grün, GFP), der mit dem neutrophilen Granulozyten (mittlerer Pfeil; rot; Lys6G-AK PE markiert) in Kontakt tritt. Die Laserletzung befindet sich im Bildrand unten links in gelb/ grün (unterer Pfeil). Maßstab = 30 μm . **B)** Die zweite Abbildung stellt das Geschwindigkeitsprofil des hier gezeigten neutrophilen Granulozyten dar. Die schwarzen Balken zeigen die MW in dem gekennzeichneten Zeitfenster dar. Rot unterlegt ist der Kontaktbereich des neutrophilen Granulozyten mit dem Makrophagen.

Bei der Videoanalyse konnten perivaskuläre Makrophagen ermittelt werden, die Ausläufer ausbildeten und diese auch in Kontakt traten mit den neutrophilen Granulozyten (siehe Abbildung 32).

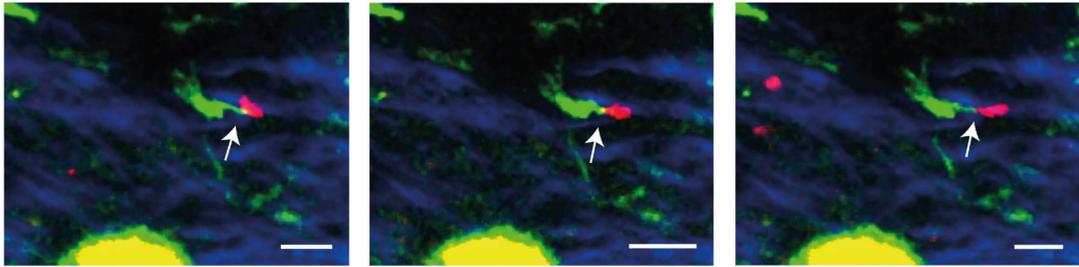


Abbildung 32: Ausläuferbildung eines perivaskulärer Makrophagen, der in Kontakt mit einem neutrophilen Granulozyt tritt

Perivaskulärer Makrophage (in grün; GFP), der über Ausläufer mit einem neutrophilen Granulozyten (rot; Ly6G-Aantikörper PE markiert) in Kontakt (Pfeil) tritt. Die Laserverletzung befindet sich im Bildrand unten links in gelb/ grün. Maßstab = 30 μ m.

Zudem konnte noch eine weitere Beobachtung im interstitiellen Raum bezüglich der Interaktion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gemacht werden. Ein zuvor stationärer Makrophage, der sich im Kontext einer sterilen Inflammation befand, begannen sich nach Kontakt mit mehreren neutrophilen Granulozyten in Richtung der Verletzung in Bewegung zu setzen (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Das Bewegungsprofil des Makrophagen ist als letzte Bild in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** aufgezeichnet. Zu Beginn konnte man noch eine relativ runde Zelle sehen, die anfänglich Ausläufer ausbildet und daraufhin beginnt sich in Pfeilrichtung zu bewegen.

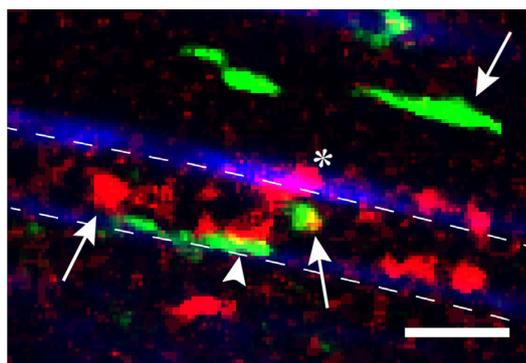


Abbildung 33: intravaskuläre Interaktionen zwischen neutrophilen Granulozyten und Monozyten

Interaktionen (Pfeilspitzen im Gefäß zwischen neutrophilen Granulozyten (rot; PE-markiert) und Monozyten (grün, GFP). Die weiße gestrichelte Linie markiert die Gefäßstruktur an. Der außerhalb des Gefäßes gelagerte Pfeil deutet auf einen perivaskulären Makrophagen hin. Das Sternchen zeigt den Gefäßaustritt eines neutrophilen Granulozyten an. Maßstab= 30 μ m.

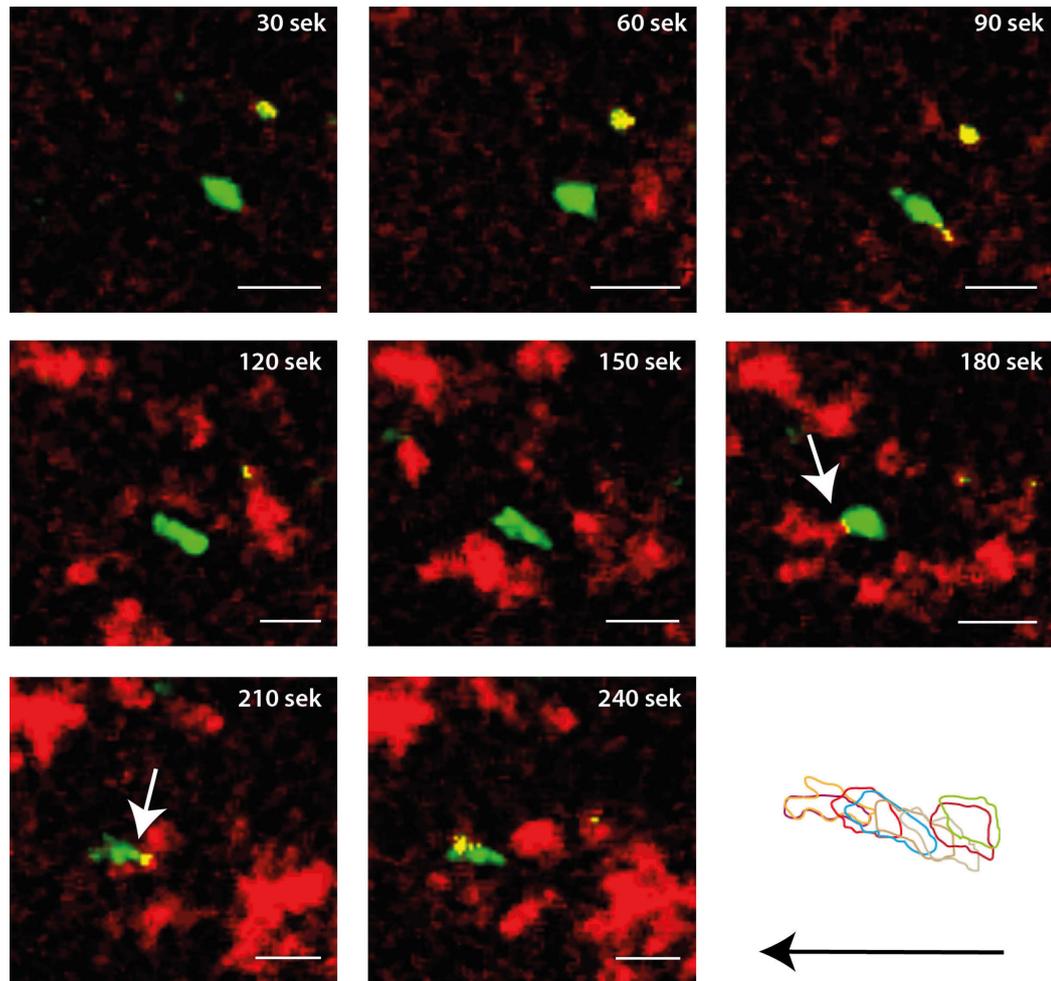


Abbildung 34: Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, der beginnt sich nach Kontakt zu bewegen

Bilderfolge eines Makrophagen (in grün), der nach Kontakt mit mehreren neutrophilen Granulozyten anfängt sich zu bewegen. Die letzte Abbildung demonstriert das Bewegungsmuster des Makrophagen über die Zeit. Der Pfeil demonstriert die Richtung in der sich der Makrophage fortbewegt. Maßstab = 30 μm .

Zusammenfassend sind also sowohl intravaskulär als auch im interstitiellen Gewebe Interaktionen zwischen den neutrophilen Granulozyten und den Monozyten/Makrophagen bei steriler Inflammation zu beobachten. Die funktionelle Bedeutung dieser Interaktionen – auch mit Thrombozyten - ist jedoch unklar, und wird in den folgenden Abschnitten im Detail untersucht.

Kontakte konnten sowohl im intravaskulären, perivaskulären als auch im interstitiellen Bereich zwischen den neutrophilen Granulozyten mit dem Monozyten dokumentiert werden. Dabei gibt es Bereiche im Gefäßsystem, indem ein Austritt an Zellen bevorzugt abläuft.

4. Abhängigkeit der Rekrutierung von myeloiden Zellen von Thrombozyten

Da nur transiente Adhäsionen von Thrombozyten an das Endothel sowie an myeloide Leukozyten bei steriler Inflammation stattfanden, wurde untersucht, ob ein steriler Stimulus mit seiner Freisetzung der verschiedenen DAMPs einen Effekt auf Thrombozyten *in vitro* zeigt. Für den sterilen Entzündungsreiz diente das nekrotische Zelllysate, welches aus humanen Fibroblasten hergestellt wurde. Das nekrotische Zelllysate wurde durch zwei unterschiedliche Prozesse gewonnen: eine Kälte- bzw. Hitzebehandlung. Zum einen wurde die Nekrose der Zellen durch eine Kältebehandlung herbeigeführt, wodurch alle Faktoren, einschließlich der proteinogenen Substanzen erhalten bleiben und somit ihr Effekt auf Thrombozyten untersucht werden konnte. In der zweiten Gruppe wurde die Nekrose bei den humanen Fibroblasten mittels Hitze erzielt. Hier fehlen die Faktoren, die eine Proteinstruktur als Grundgerüst enthalten, da sie denaturiert wurden. Mittels der Aggregationsmethode nach Born (IV.7.1) konnte die Aktivierbarkeit und Funktion der isolierten Plättchen untersucht werden. Dabei diente das nekrotische Zelllysate, das in einer Verdünnungsreihe angesetzt wurde, als jeweiliger Stimulus. In Abbildung 35A ist der Effekt bei dem kältebehandelten Zelllysate abgebildet. Der Puffer, in dem die isolierten Plättchen gelöst sind, diente als Negativkontrolle in diesem Versuchsaufbau. Als Positivkontrolle wurde Kollagen verwendet, bei dem ein Effekt etwa bei 750 AUC zu erwarten war. Es konnte eine signifikante Aktivierung der Plättchen bei den Verdünnungsstufen 100%, 50% und 25% festgestellt werden. Die letzte Verdünnungsstufe hatte keinen signifikanten Effekt mehr auf die Aktivierung der Thrombozyten. In der folgenden Aggregometrie (siehe Abbildung 35B) wurde das durch Hitze gewonnene Zelllysate als Stimulus eingesetzt. Hier gab es nur noch für die Verdünnungsstufe von 50% einen signifikanten Effekt auf die Aktivierung der Plättchen.

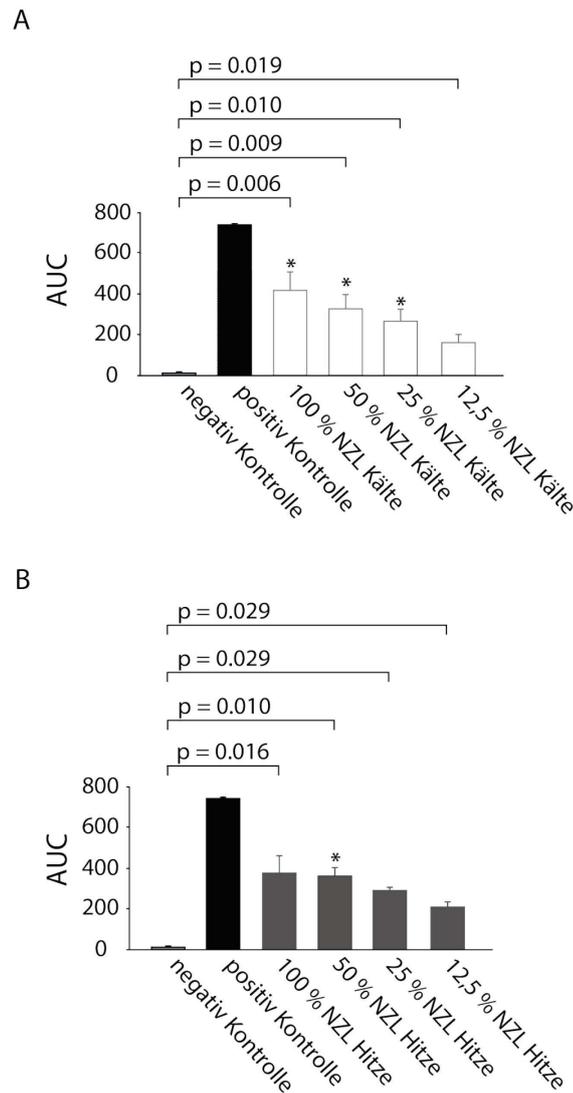


Abbildung 35: Aggregometrie von Thrombozyten nach Stimulation mit nekrotischem Zelllysat

Negativkontrolle ist in beiden Ansätzen Puffer ohne Plättchen; die Positivkontrolle jeweils Kollagen. **A)** Zeigt die Effekte mit nekrotischen Zelllysat in unterschiedlichen Verdünnungsstufen, welches durch Kälte gewonnen wurde. **B)** Zeigt die Effekte mit nekrotischem Zelllysat in unterschiedlichen Verdünnungsstufen, welches durch Hitze gewonnen wurde. Signifikanzen nach Bonferroni- Holm Adjustierung liegen bei p-Werten von $< 0,0125$ vor und werden durch * über den Balken gekennzeichnet. Der Fehlerbalken zeigt jeweils den SEM an.

Da eine Wirksamkeit *in vitro* auf die Plättchen mittels nekrotischen Zelllysats festgestellt werden konnte, lag nun die Intention darin, die Resultate im *in vivo* Modell näher zu untersuchen. Hierfür wurde das für sterile Entzündungsprozesse etablierte Ohrmodell verwendet. Es wurden zwei Gruppen (jeweils $n= 3$) gebildet, bei der einen Gruppe wurden die Plättchen mit Hilfe eines depletierenden Antikörper aus dem Organismus entfernt. Die Kontrollgruppe erhielt den Isotypantikörper. Damit konnte

analysiert werden, welchen Effekt das Fehlen der Thrombozyten auf die Rekrutierung der myeloiden Zellen hat. Außerdem lag ein Untersuchungsschwerpunkt darin, ob ein Fehlen der Plättchen Auswirkung auf das Zellverhalten der Immunzellen bei Transmigration sowie im interstitiellen Gewebe hat. Für die Beurteilung zog man die verschiedenen Parameter Geschwindigkeit, displacement rate sowie meandering index heran und stellte sie der Isotypkontrolle gegenüber.

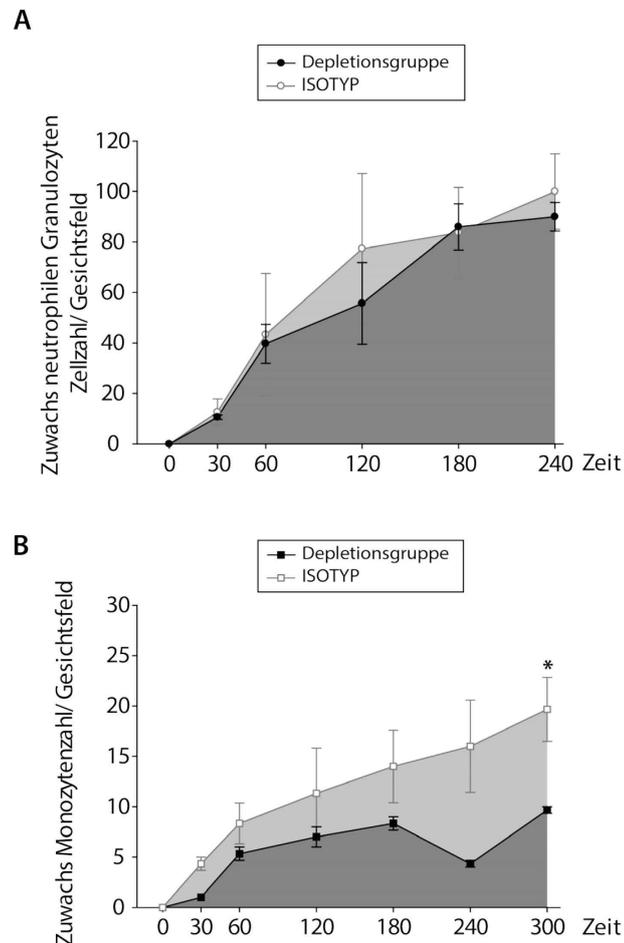


Abbildung 36: Zellzahlen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei Thrombozyten-depletierten Tieren vs. Kontrolle

In schwarz sind die Versuchsgruppen mit der Plättchen (plt) Depletion abgebildet, dabei stellen die runden Symbole (●) den Mittelwert (MW) der neutrophilen Granulozyten **A**) zu dem jeweiligen Zeitpunkten und dem Standardfehler (SEM) dar und die rechteckigen Symbole (■) die MW der Monozyten **B**) mit dem jeweiligen SEM zu dem definierten Zeitpunkten. In weiß ist die jeweilige Kontrollgruppe mit dem Isotypantikörper gegenübergestellt. Die grau eingefärbte Fläche stellt die Area under the curve (AUC) dar, die jeweils berechnet wurde (grau = Plt- depletierte Gruppe; hellgrau= Kontrollgruppe). Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind mit * markiert. Ein Gesichtsfeld bestand aus $588 \times 588 \times 30 \mu\text{m}$. Die jeweilige Gruppengröße beträgt $n = 3$.

Zuerst wurde die Zellrekrutierung herangezogen (siehe Abbildung 36A). Hier zeigte sich, dass ein Fehlen der Plättchen keinen großen Effekt ($d= 0,34$) auf die Zellrekrutierung der neutrophilen Granulozyten hat. Es konnte kein signifikanter Wert ermittelt werden und die Zuwachsrate der Isotypengruppe lag gegenüber der Depletionengruppe bei 12,7% (siehe Tabelle 22). Jedoch lief die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten in der Phase zwischen 60 und 180 Minuten verzögert ab, was auf eine spezifische Bedeutung von Thrombozyten in dieser Rekrutierungsphase hinweist.

Tabelle 22: Statistische Werte der neutrophilen Granulozyten Zellzahl über die Zeit bei der Depletion der Thrombozyten vs. Kontrolle

neutrophile Granulozyten	Zellzahl über die Zeit/ Gesichtsfeld	
	Plt Depletion	Plt Isotyp
AUC	13305 +/- (1771)	14990 +/- (4191)
p- Wert	0,730	
Effektgröße	0,37	
Zuwachs in %	12,66	

signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert

Auch die Anzahl der Monozyten in den beiden Versuchsgruppen, die über die Zeit rekrutiert wurden, wurde ermittelt. Die Kontrollgruppe wies eine Zuwachsrate von 121% gegenüber der Depletionsgruppe auf. Dies bedeutete, dass tendenziell mehr Monozyten kamen, es aber keinen signifikanten Unterschied ($p= 0,103$) gab. Auch hier erwies sich der Effekt der Thrombozyten als phasenspezifisch, mit einem ausgeprägten Effekt im Zeitraum zwischen 180 und 240 Minuten nach Laser-Verletzung.

Tabelle 23: Statistische Werte der Monozyten über die Zeit bei der Depletion der Thrombozyten vs. Kontrolle

Monozyten	Zellzahl über die Zeit/ Gesichtsfeld	
	Plt Depletion	Plt Isotyp
AUC	1620 +/- (169,71)	3575 +/- (1301,60)
p- Wert	0,103	
Effektgröße	2,11	
Zuwachs in %	120,68	

signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert

Nicht nur die Zellzahl wurde untersucht, sondern auch das Migrationsverhalten der Zellen, die sich im interstitiellen Raum bewegten. So wurden die jeweiligen Migrationswege der einzelnen Zellen anhand von drei Parametern beurteilt. Zuerst wurde die Geschwindigkeit ermittelt, wie schnell sich die Zellen bewegen. Der nächste Parameter war die displacement rate, die eine Aussage über die Geschwindigkeit im Geweberaum macht, bezogen auf eine ideale direkte Strecke zur Verletzung. Zuletzt wurde noch ein Index (meandering index) herangezogen, der eine Aussage über die Effektivität und Gerichtetheit der Migration macht. Dabei steht 1 für eine zielgerichtete Bewegung und 0 für eine Zelle, die sich im Kreis bewegt.

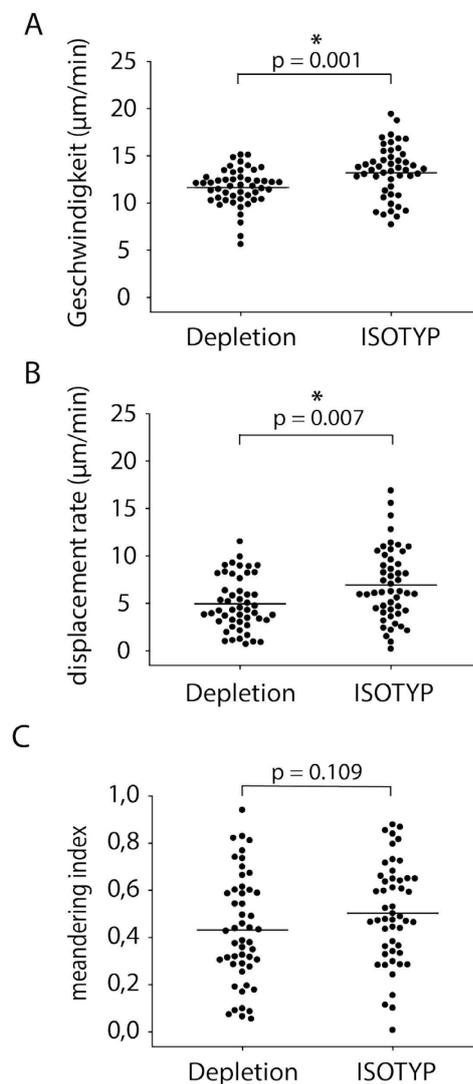


Abbildung 37: Interstitielles Migrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten in der Abwesenheit von Thrombozyten

Die einzelnen Tracks werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen, der Plättchen-depletierten Gruppe vs. Kontrolle. Unterscheidung in die 3 Parameter Geschwindigkeit (A), displacement rate (B) und meandering Index (C). Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind mit * markiert. Gruppengröße jeweils $n = 3$.

Bei den neutrophilen Granulozyten konnte festgestellt werden, dass diese bei fehlenden Thrombozyten signifikant langsamer im interstitiellen Gewebe wandern ($p=0,001$). Dies spiegelte sich auch in der Beweglichkeit wieder ($p=0,007$). Es hatte aber keinen Effekt auf die Zielgerichtetheit der Zellen bei der Wanderung auf die Verletzung zu.

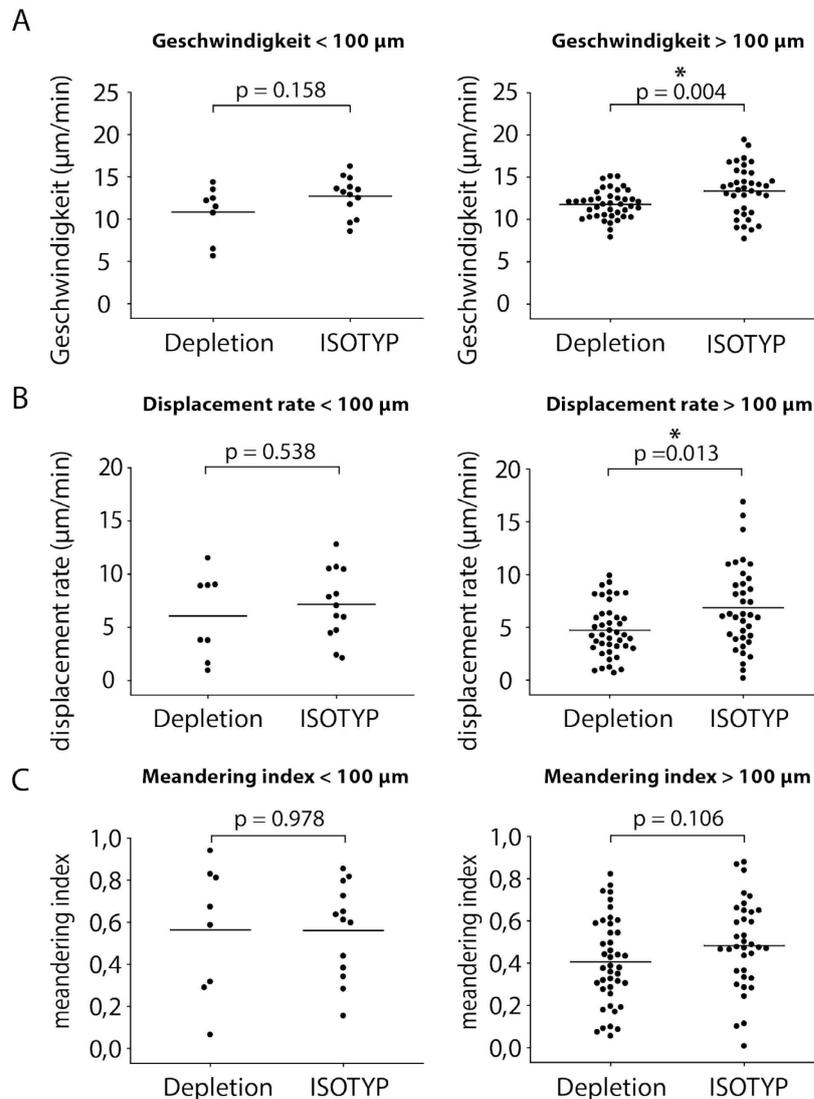


Abbildung 38: Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit zum Abstand vom Nekrosefokus bei der Depletion von Thrombozyten

Einzelnen Tracks werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen, der plättchendepletierten Gruppe vs. der Kontrolle. Die Tracks wurden in einen Gradienten $<$ oder $>$ $100 \mu\text{m}$ um die Verletzung entfernt unterteilt, mit der Unterscheidung in die 3 Parameter Geschwindigkeit **A**), displacement rate **B**) und meandering Index (C). Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind mit * markiert. Gruppengröße beträgt $n = 3$.

Bei der Migration von Zellen im Gewebe werden unterschiedliche Faktoren im Voranschreiten der Zellen im extrazellulären Raum angenommen. Deshalb wurden die Zellen nochmals unterteilt, abhängig vom Abstand zur Verletzung zu Beginn der Aufzeichnung des Migrationspfades. Damit sollten Einflussgrößen, die direkt um die Nekrosezone sezerniert werden, gegenübergestellt werden zu Faktoren, die in der Peripherie der Verletzung eine Rolle spielen. Daraus erfolgte eine Unterteilung in zwei Zonen mit einem Abstand von mehr oder weniger als 100µm von der Nekrosezone (siehe Abbildung 38). Direkt um die Nekrosezone konnte kein signifikanter Unterschied im Migrationsverhalten der einzelnen Zellen verzeichnet werden, so dass man annehmen kann, dass das Fehlen der Plättchen keinen großen Einfluss mehr auf ihr Bewegungsmuster in der Nähe der Verletzung hat. Im Umkreis von mehr als 100 µm zeigte sich jedoch, dass sich die neutrophilen Granulozyten in Abwesenheit von Thrombozyten signifikant ($p=0,004$) langsamer zur Kontrollgruppe im Gewebe fortbewegten. Auch in ihrer Beweglichkeit ($p=0,013$) war ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle sichtbar. Auf die Zielgerichtetheit hatte das Fehlen in beiden Zonen (<100 und >100 µm) keinen Einfluss.

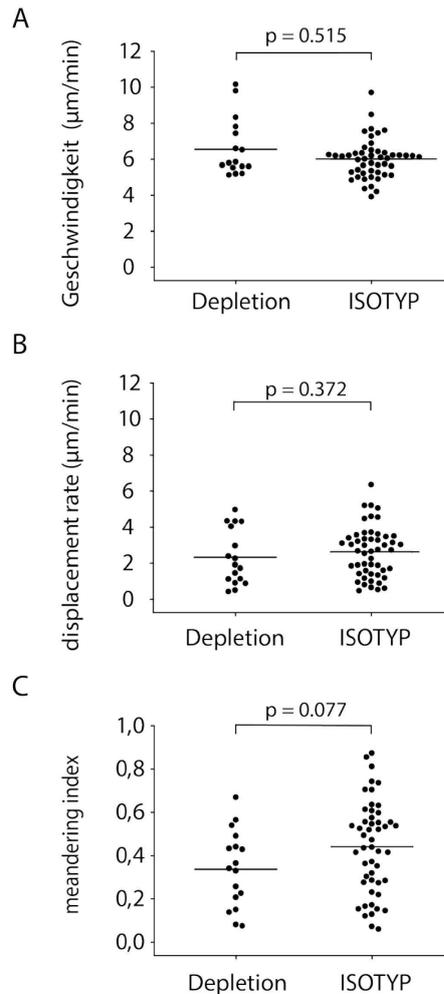


Abbildung 39: Verhalten der Monozyten bei der Thrombozyten-Depletion

Die einzelnen Tracks werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen, der Plättchen-depletierten Gruppe vs. Kontrolle. Unterscheidung in die 3 Parameter Geschwindigkeit **A**), displacement rate **B**) und meandering Index **C**). Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind mit * markiert. Gruppengröße jeweils $n = 3$.

Als weitere Zellpopulation wurden auch die Monozyten näher betrachtet. Das Fehlen der Thrombozyten hatte hier aber keinen signifikanten Effekt auf die Geschwindigkeit und Beweglichkeit der einzelnen Zellen im Gewebe, nur in der Anzahl der Zellpopulation konnte eine verringerte Rekrutierung verzeichnet werden. Bei der Zielgerichtetheit konnte man eine Tendenz sehen, dass die Zellen nicht mehr ganz gerichtet in ihrer Fortbewegung waren im Vergleich zur Kontrollgruppe, die noch Thrombozyten im Organismus enthielten.

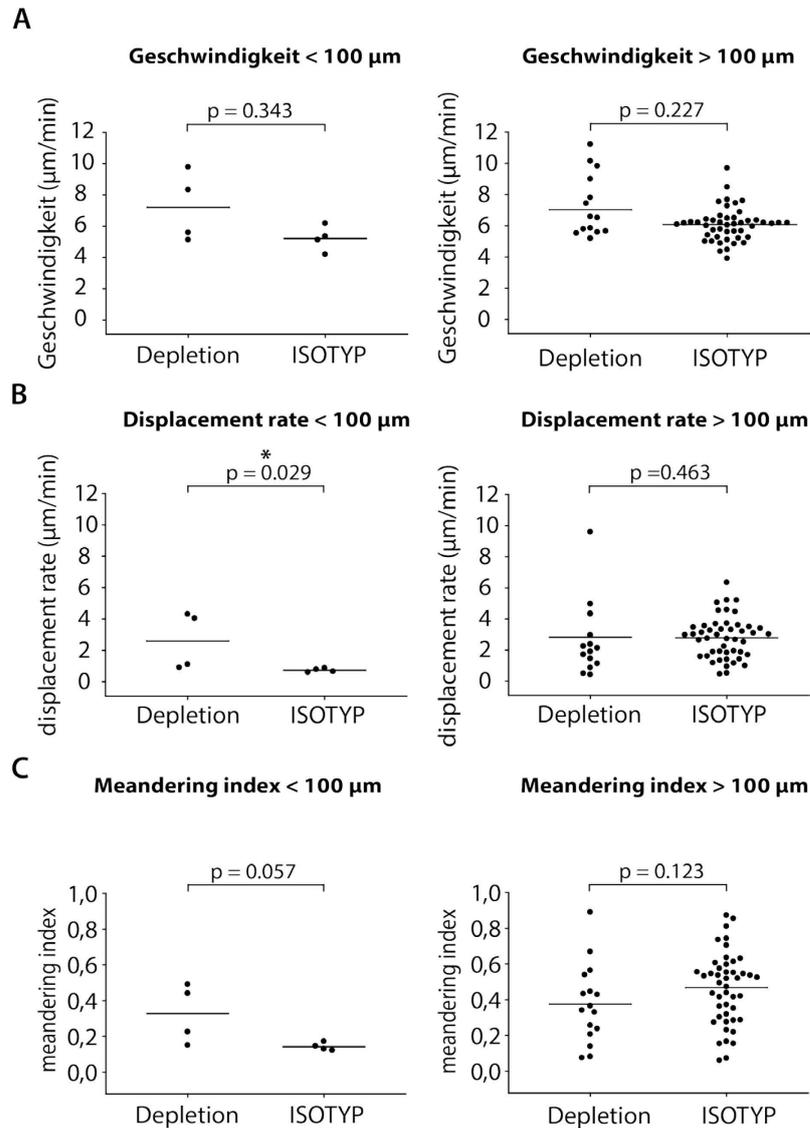


Abbildung 40: Verhalten der Monozyten bei Thrombozyten depletierten Tieren mit einem Gradienten

Die einzelnen Tracks werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen; der Plättchendepletierten Gruppe vs. der Kontrolle. Die Tracks wurden in einen Gradienten < oder > 100 µm um die Verletzung entfernt unterteilt, mit der Unterscheidung in die 3 Parameter Geschwindigkeit **A**), displacement rate **B**) und meandering index **C**). Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind mit * markiert. Gruppengröße beträgt $n = 3$.

Auch hier wurde wieder das interstitielle Migrationsverhalten der Monozyten/Makrophagen in Abhängigkeit vom Abstand zur Laser-Verletzung untersucht, wie bei den neutrophilen Granulozyten. Es konnten jedoch keine relevanten Veränderungen im Bewegungsmuster und der Zielgerichtetheit festgestellt werden. Ein signifikanter Effekt war nur bei der Beweglichkeit in der Nähe der Nekrosezone zu verzeichnen. Da in dieser Zone aber nur wenige Zellen zum Verfolgen

vorhanden waren, ist die Signifikanz ($p=0,029$) nur bedingt aussagekräftig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Fehlen der Thrombozyten primär einen Effekt auf die neutrophilen Granulozyten in der äußeren Zone hat. Diese Zellpopulation ist in ihrem Vorankommen verlangsamt und zeigt eine reduzierte Beweglichkeit.

5. Abhängigkeit der Monozytenrekrutierung von neutrophilen Granulozyten

Nachdem verdeutlicht wurde, dass ein Fehlen der Plättchen einen Effekt auf das Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten zeigte, wurden nun auch diese mit Hilfe eines depletierenden Antikörpers aus dem Organismus entfernt (siehe IV.4.2.1). So sollte die Auswirkung der Abwesenheit der neutrophilen Granulozyten auf die Zellrekrutierung bei steriler Inflammation analysiert werden.

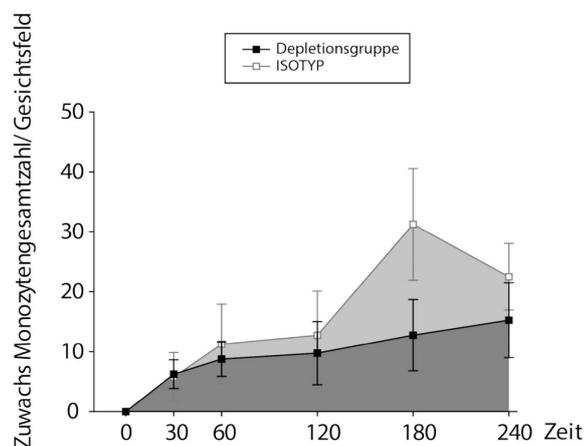


Abbildung 41: Monozytenrekrutierung über die Zeit bei neutrophilen Granulozyten depletierten Tieren

In schwarz sind die Versuchsgruppen mit der neutrophilen Granulozyten-Depletion abgebildet, dabei stellen die rechteckigen Symbole (■) die MW der Monozyten mit dem jeweiligen SEM zu dem definierten Zeitpunkten dar. In weiß ist die jeweilige Kontrollgruppe mit dem Isotypantikörper gegenübergestellt. Die grau eingefärbte Fläche stellt die Area under the curve (AUC) dar (grau = neutrophile Granulozyten-depletierte Gruppe; hellgrau= Kontrollgruppe). Ein Gesichtsfeld bestand aus $588 \times 588 \times 30 \mu\text{m}$. Die jeweilige Gruppengröße beträgt $n=4$.

Zuerst wurde auch hier die Zellzahl pro Gesichtsfeld (588 x 588 x 30 µm) und Zeitpunkt ermittelt und über den gesamten Zeitverlauf von 240 Minuten erfasst. Es konnte zu Beginn keine Unterscheidung in der Rekrutierung der Monozyten/Makrophagen festgestellt werden. Erst nach 3 Stunden kamen in der Kontrollgruppe tendenziell mehr Monozyten als in der Depletionsgruppe. So kann ein Effekt der neutrophilen Granulozyten in der späten Phase gesehen und angenommen werden, dass sie eine Vermittlerfunktion in der Rekrutierung der Monozyten einnehmen. Statistisch konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,41$) zur Kontrollgruppe festgestellt werden und die Effektgröße von 0,73 spricht auch nur für einen mittelstarken Effekt. Der Zuwachs an Zellen, die in der Kontrollgruppe mehr mobilisiert wurden, lag bei 67,2% (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Statistische Werte der Monozytengesamtzahl über die Zeit bei Depletion der neutrophilen Granulozyten

Monozyten	Zellzahl über die Zeit/ Gesichtsfeld	
	neutrophile Granulozyten Depletion	Isotyp
AUC	2388,75 +/- (962)	3993,75 +/- (1527)
p- Wert	0,41	
Effektgröße	0,73	
Zuwachs in %	67,19	

Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. AUC in Klammer die SEM- Werte

Nach der Gesamtzellzahl wurde die Zellen nochmals unterteilt, abhängig vom Kompartiment in dem sie sich befanden: im Gefäß oder Gewebe. Hier sollte nun auch differenziert werden, ob bei intravaskulären oder interstitiellen Rekrutierungsmustern der Monozyten/Makrophagen ein Unterschied festzustellen ist. In Abbildung 42A) wurden zuerst das Gefäßsystem in seiner Anzahl an rekrutierten Zellen über den gesamten Zeitraum betrachtet. In den ersten 30 Minuten konnte kein Unterschied festgestellt werden. Danach kam es zu einem Auseinanderdividieren der beiden Gruppen (Depletions- vs. Kontrollgruppe). Die Depletionsgruppe zeigte eine höhere Monozytenrekrutierung, die bis zum Zeitpunkt 180 Minuten ihren Höhepunkt erreichte. Darauf folgend kam es zum Absinken der Zellzahlen im Gefäß. Bei der Kontrollgruppe konnte über die Zeit ein kontinuierlicher Anstieg beobachtet werden, der nach 180 Minuten dann über der Depletionsgruppe lag. Es lag jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,7$) vor und das Effektmaß war mit $d=0,32$ gering (siehe Tabelle 24).

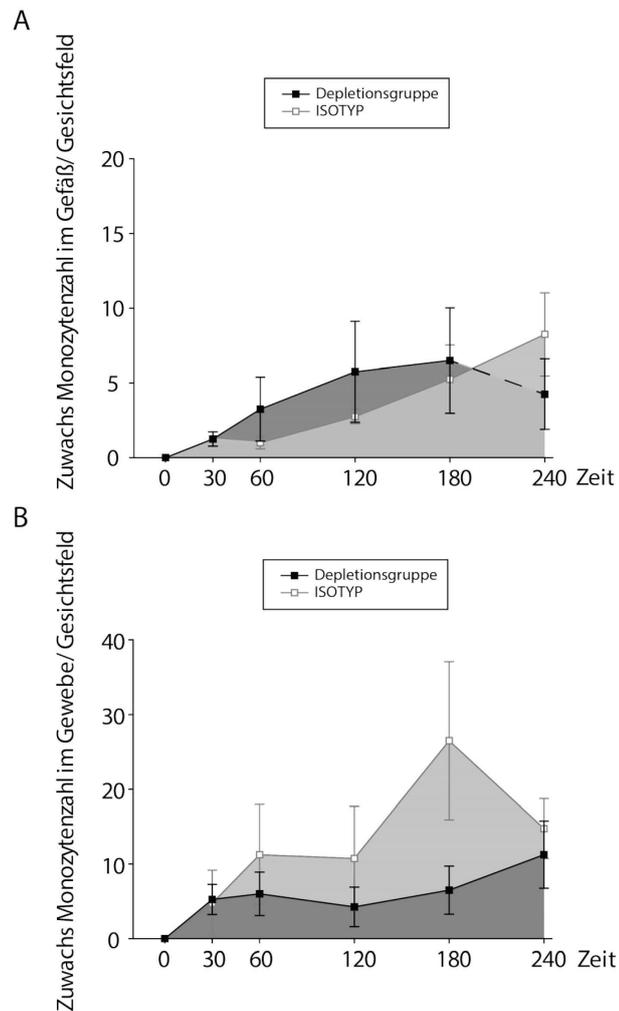


Abbildung 42: Monozytenrekrutierung im Gefäß und im Gewebe über die Zeit bei Depletion neutrophiler Granulozyten

In schwarz sind die Versuchsgruppen mit der neutrophilen Granulozyten Depletion abgebildet, dabei stellen die rechteckigen Symbole (■) die MW der Monozyten mit dem jeweiligen SEM zu dem definierten Zeitpunkten dar. In weiß ist die jeweilige Kontrollgruppe mit dem Isotypantikörper gegenübergestellt. Abbildung **A**) zeigt die Situation im Gefäß und **B**) im interstitiellen Gewebe. Die grau eingefärbte Fläche stellt die Area under the curve (AUC) dar, die jeweils berechnet wurde (grau = neutrophile Granulozyten-depletierte Gruppe; hellgrau= Kontrollgruppe). Ein Gesichtsfeld bestand aus 588 x 588 x 30 µm. Die jeweilige Gruppengröße beträgt n= 4.

Im Gewebe (siehe Abbildung 42B) war in den ersten 30 Minuten auch kein Effekt zwischen beiden Gruppen feststellbar. Bei der Depletionsgruppe kam es nur zu einem geringen Übertreten der Zellen ins Gewebe. Die intravaskuläre Rekrutierung war nicht beeinträchtigt. Bei der Kontrollgruppe konnte ein zweiphasiger Anstieg an Monozyten ins Gewebe verzeichnet werden. Im Vergleich der beiden Gruppe war der Unterschied nicht signifikant ($p= 0,2$), aber mit einer Effektstärke von $d= 0,97$ kann von einer

Auswirkung gesprochen werden. Es konnte auch ein Zuwachs an Zellen im Vergleich zur Depletionsgruppe von 136% berechnet werden (siehe Tabelle 25). Der erste Anstieg war bis zum Zeitpunkt von 120 Minuten festzustellen, dann nochmals mit einem Anstieg bis zum Zeitpunkt 180 Minuten. Daraufhin folgte ein Abfallen der Zellen im Gewebe bis zum Zeitpunkt 240 Minuten. Dass es zu keinem Ansteigen der Monozyten im Gewebe in der Depletionsgruppe kam, könnte durch ein Fehlen der neutrophilen Granulozyten erklärt werden, die einen Aktivierungsfaktor für die Monozyten bereitstellen, welcher die Monozyten bei der Transmigration aus dem Gefäßsystem unterstützt. Diese These würde sich mit dem Graphen (Abbildung 42A) im Gefäß der Depletionsgruppe decken, da durchschnittlich mehr Zellen im Gefäß sind als bei der Kontrollgruppe.

Tabelle 25: Statistische Werte der Monozytenzahl im Gefäßsystem und Gewebe über die Zeit bei der Depletion der neutrophilen Granulozyten

Monozyten	Monozyten im Gefäß / Gesichtsfeld	
	neutrophile Granulozyten Depletion	Isotyp
AUC	1046,25 +/- (584)	810 +/- (132)
p- Wert	0,707	
Effektgröße	0,32	
Zuwachs in %	29,17	

Monozyten	Monozyten im Gewebe / Gesichtsfeld	
	neutrophile Granulozyten Depletion	Isotyp
AUC	1410 +/- (560)	3326,255 +/- (1515)
p- Wert	0,28	
Effektgröße	0,97	
Zuwachs in %	135,9	

Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. AUC in Klammer die SEM- Werte

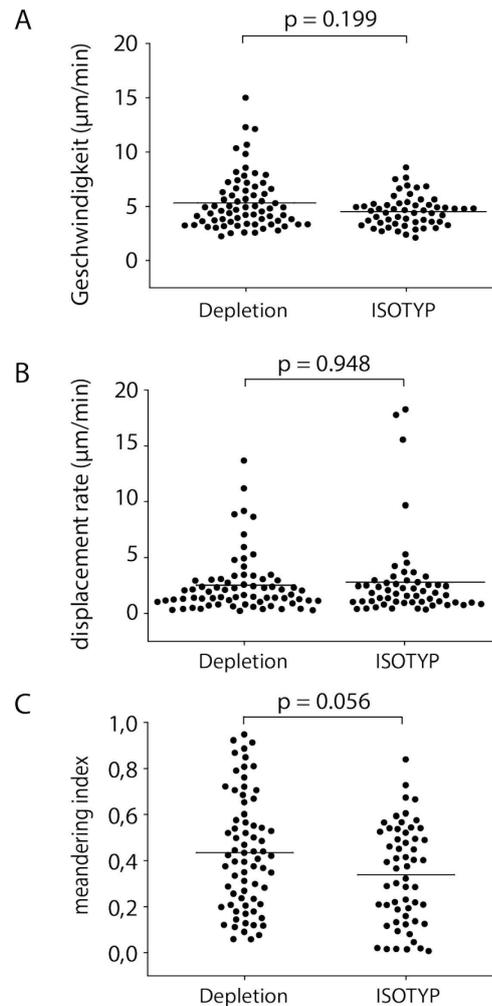


Abbildung 43: Interstitielles Migrationsverhalten von Monozyten bei Depletion neutrophiler Granulozyten

Die einzelnen Tracks der Monozyten werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen, der neutrophilen Granulozyten depletierten Gruppe vs. Kontrolle. Unterscheidung in die 3 Parameter Geschwindigkeit **A**), Displacement rate **B**) und Meandering Index **C**). Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind mit * markiert. Gruppengröße jeweils $n = 4$.

Im Folgenden wurde analysiert, ob das Fehlen der neutrophilen Granulozyten eine Auswirkung in der Migration der Monozyten im interstitiellen Gewebe hat. Dies wurde anhand der Parameter Geschwindigkeit, Beweglichkeit und Zielgerichtetheit der einzelnen Migrationswege der Monozyten untersucht (Abbildung 43). Dabei zeigte sich weder ein signifikanter Unterschied in der Geschwindigkeit ($p = 0,199$) noch in der Displacement rate ($p = 0,948$) der Monozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe, die noch die neutrophilen Granulozyten im Organismus besitzen. Das Fehlen dieser Zellpopulation hatte aber einen Einfluss auf die Gerichtetheit der Monozyten in ihrer Wanderung zum sterilen Stimulus hin, welche in Abwesenheit der neutrophilen

Granulozyten erhöht war (Abbildung 43). So kann angenommen werden, dass die neutrophilen Granulozyten die Monozyten in ihrer Wanderung auf den sterilen Stimulus ablenken, da sie freigesetzte Mediatoren einen chemotaktischen Reiz für die Monozyten darstellen.

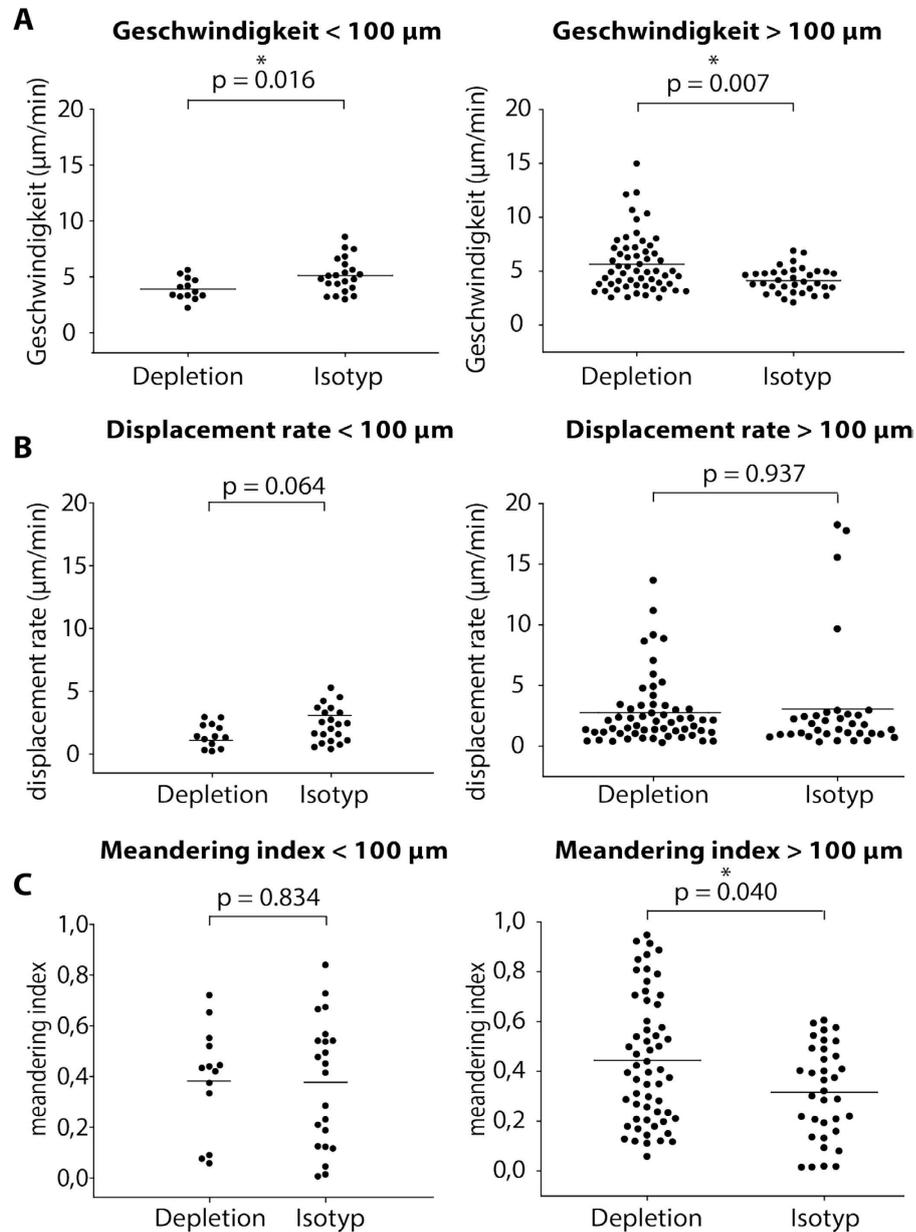


Abbildung 44: Interstitielles Migrationsverhalten von Monozyten bei Depletion neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Entfernung zur Laser-Verletzung

Die einzelnen Tracks werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen, die neutrophilen Granulozyten-depletierte Gruppe vs. Isotyp. Unterscheidung in die 3 Parameter Geschwindigkeit **A**), displacement rate **B**) und meandering index **C**). Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind mit * markiert. Gruppengröße jeweils $n = 4$.

Weiterhin wurde differenziert, ob das Fehlen der neutrophilen Granulozyten einen Einfluss auf die interstitielle Migration der Monozyten in Abhängigkeit von der Entfernung zur Laser-Verletzung hat. Die erste Zone befand sich direkt um die Laserverletzung in einem Abstand von $<100\mu\text{m}$. Hier zeigte sich, dass die Monozyten in Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten signifikant langsamer im Bereich direkt um die Verletzung wandern ($p=0,016$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auf die Beweglichkeit und Zielgerichtetheit der Monozyten hatte der Verlust der neutrophilen Granulozyten in der Nähe der Nekroszone keinen Einfluss.

Es wurde noch der Bereich von $>100\mu\text{m}$ definiert, in welchem untersucht wurde, ob das Fehlen der neutrophilen Granulozyten in Kombination mit den hier chemotaktisch wirkenden Signalstoffen einen Einfluss auf die Monozyten hatte. Zusätzlich erfolgte eine Analyse auf deren Geschwindigkeit, Beweglichkeit und Zielgerichtetheit im Wandern durch das Interstitium. Hier konnte festgestellt werden, dass ein Fehlen der neutrophilen Granulozyten einen Effekt auf die Geschwindigkeit und Zielgerichtetheit der Monozyten hatte. So wandern die Monozyten schneller durch das Gewebe und zeigen eine zielgerichtetere Vorgehensweise im Gewebe, als unter dem Einfluss der neutrophiler Granulozyten.

Zusammenfassend kann hier gezeigt werden, dass ein Fehlen der neutrophilen Granulozyten sich hauptsächlich im Übertritt der Monozyten aus dem Gefäß ins Gewebe bemerkbar machte. Zudem spielten in der späten Phase die neutrophilen Granulozyten eine Rolle bei der Rekrutierung der Monozyten. Hier zeigte sich zum späteren Zeitpunkt eine Vermittlerfunktion der neutrophilen Granulozyten für die Rekrutierung der Monozyten. Außerdem war eine schnellere und zielgerichtetere Fortbewegung der Monozyten im Gewebe ohne die neutrophilen Granulozyten feststellbar, jedoch in unmittelbarer Umgebung zur Nekrose eine langsamere Migration.

6. Bedeutung von Fraktalkin für die Monozyten- und neutrophilen Granulozytenrekrutierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass neutrophile Granulozyten an der Rekrutierung von Monozyten bei steriler Entzündung von Bedeutung sind, wurde nun der Effekt des Chemokins Fraktalkin untersucht, welches eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Zellmigration bei Monozyten spielt. Fraktalkin wurden nicht nur auf dem aktivierten Endothel nachgewiesen, sondern konnten bspw. auch auf den Fibroblasten nach einer bakteriellen Infektion nachgewiesen werden^{200,201}. Hier sollte der Einfluss von CX3CL1 auf die Migration nicht nur im Gefäßkompartiment untersucht werden, sondern auch welchen Einfluss das Fehlen des Rezeptors auf die Migration durch das Gewebe hat. So wurden transgene Mäuse verwendet, die durch einen knock-in in homozygoter Form (kiki) keinen Fraktalkinrezeptor mehr vorliegen hatten (siehe IV.1.2.3). Sie wurden der heterozygoten Mauspopulation (kiwt) gegenübergestellt und in ihrer Zellrekrutierungsrate über die Zeit im Bewegungsmuster untersucht.

Zuerst wurde mit Hilfe des Whole Mount Stainings (siehe IV.5) nach einem Stimulus mittels Lasererletzung das Chemokin Fraktalkin mittels Whole Mount Staining gefärbt und visuell durch die 2-Photonentechnik dargestellt (siehe Abbildung 45). In der Abbildung wird sichtbar, dass der Ligand vorwiegend um das Gefäß lokalisiert ist und sich teilweise auch im Gewebe um die Fibroblasten gelagert ist, da diese als eine mögliche Quelle von Fraktalkine im interstitiellen Gewebe der Haut beschrieben wurden²⁰⁰.

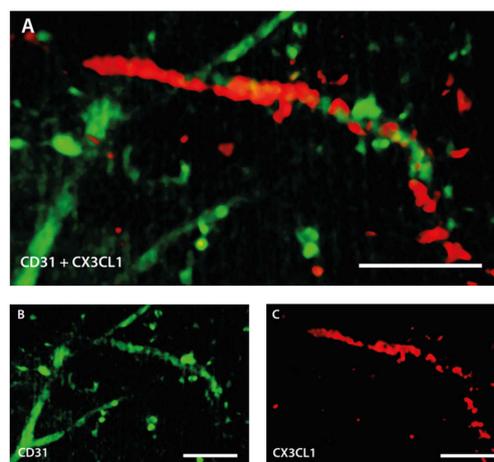


Abbildung 45: Perivaskuläre Lokalisation von CX3CL1

In **A**) ist die Doppelfärbung dargestellt mit Gefäß und CX3CL1 **B**) Gefäße werden mit CD31 angefärbt und stellen sich grün dar. **C**) Das Fraktalkin (CX3CL1) wurde mittels Alexa Fluor 594 in rot markiert. Maßstab= 50 µm. Repräsentativ für n=3 Experimente.

An Fibroblasten sollten nun *in vitro* näher untersucht werden, wie sie auf einen sterilen Entzündungsreiz hinsichtlich der Ausbildung von Chemokinen und Adhäsionsmoleküle reagieren. Hierfür wurde mit Hilfe der rtPCR und eines ELISAs die Reaktion der Fibroblasten auf das nekrotische Zelllysate näher untersucht. Hierfür wurden die humanen Fibroblasten in Kultur durch zwei unterschiedliche Inkubationstufen (6h und 24h) stimuliert und auf deren Antwort auf zellulärer Ebene analysiert. Die Expression der unterschiedlichen Chemokine MIF, CXCL1, CCL2 und CX3CL1 auf den humanen Fibroblasten wurde mittels real-time PCR und den entsprechenden Primern untersucht.

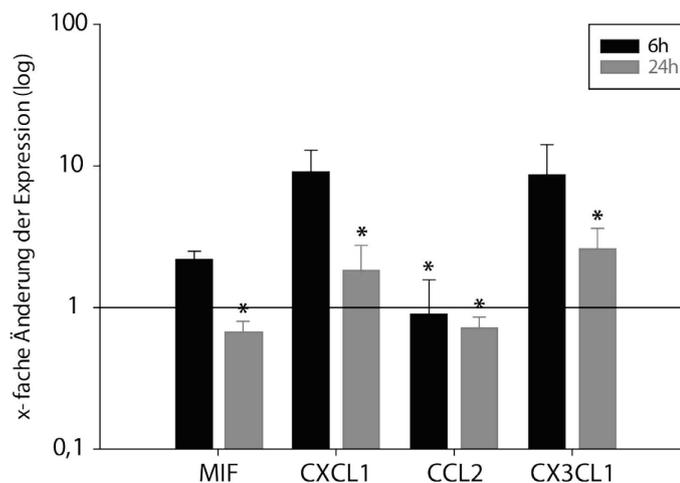


Abbildung 46: Expression von verschiedenen Chemokinen auf humanen Fibroblasten bei steriler Inflammation

Darstellung der x-fachen Änderung der Expression der Chemokine MIF, CXCL1, CCL2 und CX3CL1 nach Stimulation mit nekrotischem Zelllysate (NZL) auf mRNA-Ebene. Der schwarze Balken zeigt die Stimulation mit nekrotischem Zelllysate nach 6h und der graue Balken nach einer Inkubationszeit von 24h an. In beiden Diagrammen werden die Änderungen im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe dargestellt. Mit einem * gekennzeichnete Balken weisen eine signifikante Erhöhung von ($p < 0,05$) auf. Werte aus mindestens $n=3$ Experimenten.

In Abbildung 46 wurden unterschiedliche Chemokine untersucht, die eine Rolle in der inflammatorischen Reaktion spielen. So wird MIF, das primär auf Makrophagen aber auch auf Endothelzellen exprimiert wird, eine chemotaktische Wirkung auf myeloide Zellen und T- Zellen zugesprochen²⁰². Außerdem bindet MIF an verschiedenen Rezeptoren, die eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr spielen. Hier zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied zur unstimulierten Kontrollgruppe erst nach 24h.

Bei CXCL1, ein Chemokin, welches vor allem chemotaktisch auf die neutrophilen Granulozyten wirkt, zeigte eine Hochregulation nach 6h die nach 24h in ihrer

Expression aber absank. Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei Fraktalkin ab, welches auch zuerst nach 6h hochreguliert wird und nach 24h wieder in seiner Expression gemindert ist, aber noch eine vermehrte Expression zeigt. Bei CCL2, das für Monozyten chemotaktisch wirkt, zeigt sich über beide Inkubationszeiträume signifikante Expressionsänderung gegenüber der Kontrolle, aber es konnte keine Hochregulation des Chemokins bestimmt werden.

Da der Schwerpunkt auf der Untersuchung der Sekretion von Fraktalkin durch Fibroblasten lag, welches als möglicher Wegweiser in der Migration myeloider Zellen im Gewebe bei sterilen Entzündung dienen, wurde die Sekretion mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert und überprüft. Hier zeigte sich das Fraktalkin erst zu einem späteren Zeitpunkt eine signifikante Expression zeigte (siehe Abbildung 47).

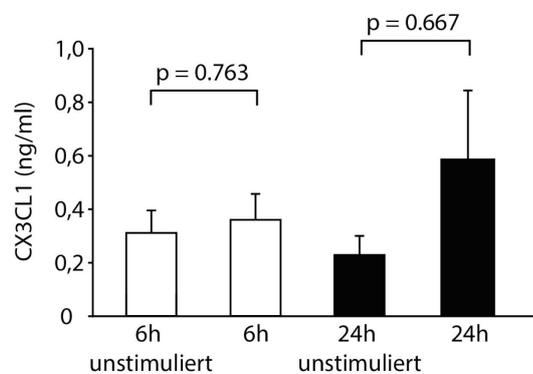


Abbildung 47: Fraktalkin im Überstand stimulierter humaner Fibroblasten

Darstellung der quantitativen Werte durch die Stimulation der humanen Fibroblasten mit NZL für jeweils 6h und 24h. Die Ergebnisse stammen aus dem Medienüberständen stimulierter im Vergleich zu unstimulierten Fibroblasten. Der Balken zeigt den Standardfehler an und die p- Werte sind über den beiden zu vergleichenden Gruppen dargestellt. Die ermittelten Werte stammen aus mind. 3 Experimenten.

Es konnte beobachtet werden, dass sich nach 6h Stimulation noch keine signifikant gesteigerte Menge an CX3CL1 gebildet hatte, wobei auch bei unstimulierten Zellen eine konstitutive Expression zu finden ist. Bei der Inkubation von 24h zeigte sich, dass tendenziell eine Zunahme der Bildung von Fraktalkin zu verzeichnen war. Mit diesen Ergebnissen kann interpretiert werden, dass eine Stimulation durch DAMPs, die bei steriler Entzündung freigesetzt werden, eine vermehrte Expression von Fraktalkin induziert wird, was auch eine erhöhte Sekretion dieses Chemokins zur Folge hat.

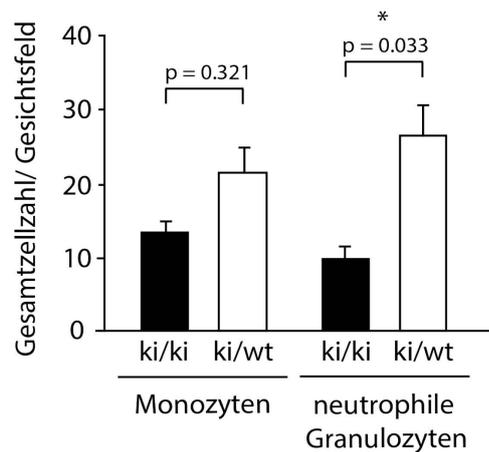


Abbildung 48: Rekrutierung myeloider Leukozyten in Abhängigkeit von Fraktalkin

Quantifizierung der Monozyten und neutrophilen Granulozyten im gesamten Beobachtungszeitraum, mit der Unterteilung in die Versuchsgruppe mit (kiwt) und ohne (kiki) Fraktalkinrezeptor. Gesichtsfeld (588 x 588x 30 μm). Mit * gekennzeichnete Balken weisen eine signifikante Erhöhung auf ($p < 0,05$) Gruppengröße $n=3$.

Da die oben gezeigten Experimente nahelegen, dass Fraktalkin nicht nur intravaskulär auf Endothelzellen, sondern auch im interstitiellen Gewebe auf Fibroblasten vorhanden ist, wurde die Bedeutung dieses Chemokins *in vivo* untersucht.

Bei der Bestimmung der gesamten Zellzahl pro Gesichtsfeld wurde ersichtlich, dass insgesamt weniger Zellen, sowohl bei den Monozyten als auch bei den neutrophilen Granulozyten über die Zeit in der Gruppe ohne Fraktalkinrezeptor (kiki) zu verzeichnen sind. Es konnte eine signifikante höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der CX3CR1kiwt Gruppe bestimmt werden, als in der Versuchsgruppe die keinen Rezeptor mehr innehatte.

Um hier zwischen einer Beeinträchtigung der intravaskulären oder interstitiellen Akkumulation durch eine knockout von CX3CR1 zu unterscheiden, wurde in diesen Bereichen die Anzahl der neutrophilen Granulozyten und Monozyten quantifiziert (Abbildung 49). Im Gefäßsystem konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl der Monozyten sowie der neutrophilen Granulozyten zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden. Zudem zeigte sich im Gewebe kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Monozytenanzahl. Interessanterweise konnte hier aber nachgewiesen werden, dass in Abwesenheit von CX3CR1 signifikant weniger neutrophile Granulozyten in das interstitielle Gewebe rekrutiert werden, was darauf hinwies, dass bei einem Fehlen des Fraktalkinrezeptors weniger neutrophile

Granulozyten ins Gewebe übertreten. Zusammenfassend weist dies darauf hin, dass die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in enger Abhängigkeit von Monozyten erfolgt. Die CX3CL1-CX3CR1 Achse ist primär für die Aktivierung von Monozyten verantwortlich. Bleibt dies aus, ist allerdings weniger deren Rekrutierung, als vielmehr jene der neutrophilen Granulozyten in das interstitielle Gewebe vermindert.

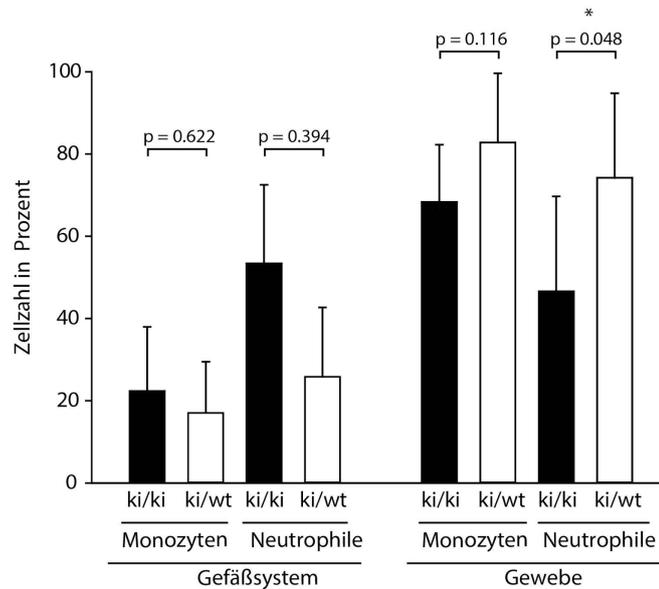


Abbildung 49: Differenzierung des Effekts von CX3CR1 auf die intravaskuläre und interstitielle Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten

Auftragung der intravaskulären sowie interstitiellen Monozyten und neutrophilen Granulozyten im gesamten Beobachtungszeitraum, mit der Unterteilung in die Versuchsgruppe mit (ki/wt) und ohne (kiki) Fraktalkinrezeptor. Mit * gekennzeichnete Balken weisen eine signifikante Erhöhung auf ($p < 0,05$) Gruppengröße $n=3$.

Auch die Rekrutierung der myeloiden Leukozytenpopulationen abhängig von CX3CR1, sollte noch in dem folgenden Graphen über die Zeit dargestellt werden. Zuerst wurde erneut die Gesamtzellzahl an Monozyten (siehe Abbildung 50) und neutrophilen Granulozyten (siehe Abbildung 51) über einen Zeitraum von drei Stunden aufgetragen.

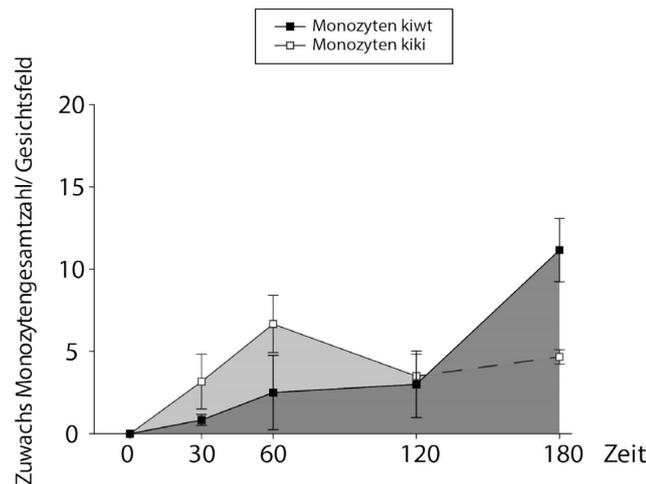


Abbildung 50: Rekrutierung von Monozyten im Zeitverlauf abhängig von CX3CR1

In schwarz sind die Versuchsgruppen mit (kiwt) dem Fraktalkinrezeptor (CX3CR1) abgebildet, dabei stellen die rechteckigen Symbole (■) die MW der Monozyten mit dem jeweiligen SEM zu dem definierten Zeitpunkten dar. In weiß ist Versuchsgruppe ohne (kiki) den CX3CR1 gegenübergestellt. Die grau eingefärbte Fläche stellt die Area under the curve (AUC) darstellen, die jeweils berechnet wurde (grau = Fraktalkingruppe Gruppe; hellgrau= Gruppe ohne Rezeptor). Ein Gesichtsfeld bestand aus 588 x 588 x 30 µm. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) werden mit * gekennzeichnet. Die jeweilige Gruppengröße beträgt $n=3$.

So zeigt sich in der Abbildung 50, dass die Monozyten in der Versuchsgruppe mit dem Fraktalkinrezeptor erst langsam ansteigen und zum Zeitpunkt 180 Minuten ihren Höhepunkt der Zellzahl haben. In der Gruppe ohne CX3CR1- Rezeptor ist der Anstieg der Monozyten zu Beginn stärker und fällt nach 60 Minuten schon wieder ab. Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,736$) zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Auch die Ermittlung der Effektgröße zeigte nur einen geringe ($d=0,29$) Ausprägung des Unterschieds. Der Zuwachs der Zellzahl in der Fraktalkingruppe lag auch nur bei 14% mehr Zellen als in der Versuchsgruppe ohne den Rezeptor (siehe Tabelle 26). Allerdings zeigt sich hier ein zeitabhängiger Effekt von Fraktalkin, welches erst für die Rekrutierungsphase nach über zwei Stunden von Bedeutung war.

Bei den neutrophilen Granulozyten zeigte sich, dass gleich zu Beginn die Gruppe mit CX3CR1 (kiwt) mehr neutrophile Granulozyten über den analysierten Zeitraum rekrutierten im Vergleich zur Gruppe ohne CX3CR1 (kiki). Es zeigte sich ein Zuwachs von insgesamt 204% gegenüber der Gruppe ohne den Rezeptor. Bei den Zeitpunkten 60 und 180 Minuten konnte auch ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ermittelt werden. Die Effektgröße $d=2,23$ ließ darauf schließen, dass CX3CR1

einen starken Effekt auf die Rekrutierungsrate der neutrophilen Granulozyten hatte (siehe Tabelle 26). Dieser Effekt scheint also weniger auf einzelne Rekrutierungsphasen begrenzt zu sein und korreliert nicht direkt mit der Monozytenrekrutierung.

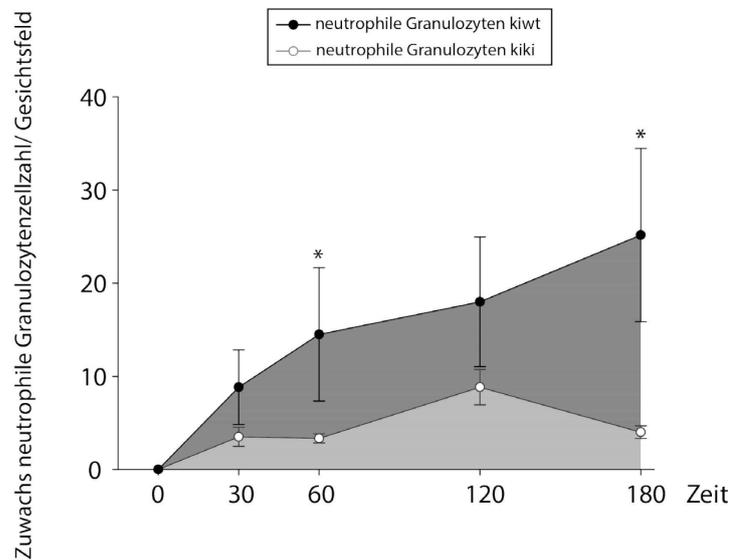


Abbildung 51: Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Zeitverlauf abhängig von CX3CR1

In schwarz sind die kiwt Versuchsgruppen abgebildet, dabei stellen die runden Symbole (●) die MW der neutrophilen Granulozyten mit dem jeweiligen SEM zu dem definierten Zeitpunkten dar. In weiß ist die kiki Versuchsgruppe gegenübergestellt. Die grau eingefärbte Fläche stellt die Area under the curve (AUC) dar, die jeweils berechnet wurde (grau = Fraktalkingruppe Gruppe; hellgrau= Gruppe ohne Rezeptor). Ein Gesichtsfeld bestand aus $588 \times 588 \times 30 \mu\text{m}$. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) werden mit * gekennzeichnet. Die jeweilige Gruppengröße beträgt $n=3$.

Um zu sehen in welchem Kompartiment sich die Zellen verteilen, wurde die Gesamtzellzahl der Monozyten/Makrophagen sowie der neutrophilen Granulozyten im Gefäß und im Gewebe gegenübergestellt. Zuerst sollte die Verteilung der Monozyten näher betrachtet werden. Im Gefäß (siehe Abbildung 52A) konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,627$) in der Monozytenrekrutierung über den gesamten Zeitraum zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Das Effektmaß zeigt auch nur einen mittleren Effekt ($d=0,43$) zwischen beiden Gruppen an. Im Gewebe unterschied sich das Bild nicht viel zu dem im Gefäß (siehe Abbildung 52B). Auch hier kamen vergleichsweise zuerst in der Gruppe ohne den Fraktalkinrezeptor mehr Monozyten, die aber über den analysierten Zeitraum zum Ende hin wieder in ihrer Anzahl vermindert waren. Zum Ende des Beobachtungszeitraumes zeigten immer die Monozyten mit CX3CR1 einen späten Anstieg, der bei 180 Minuten gipfelte. Mit einem

Zuwachs von 7% und einer Effektstärke von 0,19 zeigte sich auch, dass sich die beiden Gruppen nicht signifikant voneinander unterscheiden (siehe Tabelle 27). So ist daraus abzuleiten, dass der Fraktalkinrezeptor erst zu einem späten Zeitpunkt nach der Laserverletzung einen Einfluss auf die Monozytenrekrutierung im Interstitium hat.

Tabelle 26: Statistische Werte der Monozyten- und neutrophilen Granulozytenzahl im Gefäß und Gewebe über die Zeit bei der Untergliederung ohne (kiki) oder mit Fraktalkinrezeptor (kiwt)

Monozyten	Zellzahl über die Zeit/ Gesichtsfeld	
	kiki	kiwt
AUC	1490 +/- (297)	1305 +/- (418)
p- Wert	0,736	
Effektgröße	0,29	
Zuwachs in %	14,2	
Korrelationskoeffizienten	0,786	

neutrophile Granulozyten	Zellzahl über die Zeit/ Gesichtsfeld	
	kiki	kiwt
AUC	1810 +/- (154)	5505 +/- (2328)
p- Wert	0,05	
Effektgröße	2,23	
Zuwachs in %	204	
Korrelationskoeffizienten	0,588	

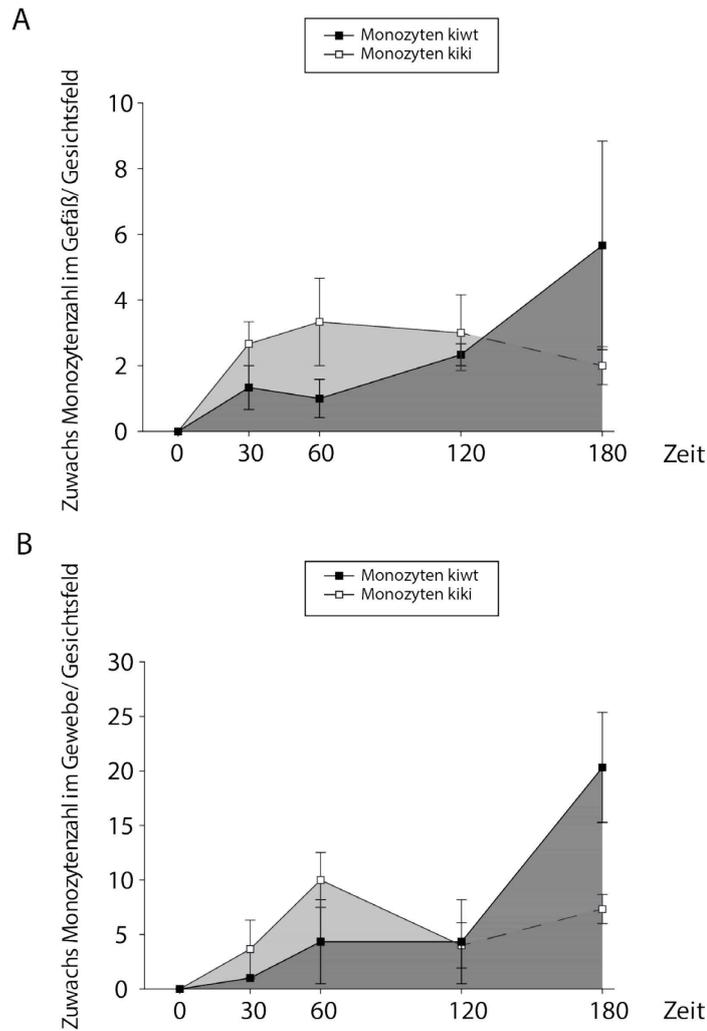


Abbildung 52: Rekrutierung von Monozyten über die Zeit im Gefäß oder im Gewebe abhängig von CX3CR1

In schwarz sind die kiwt Versuchsgruppen abgebildet, dabei stellen die rechteckigen Symbole (■) die MW der Monozyten mit dem jeweiligen SEM zu dem definierten Zeitpunkten dar. In weiß ist die jeweilige Kontrollgruppe ohne (kiki) den CX3CR1 gegenübergestellt. **A)** zeigt die Situation im Gefäß und **B)** im interstitiellen Gewebe. Die grau eingefärbte Fläche stellt die Area under the curve (AUC) dar, die jeweils berechnet wurde (grau= Fraktalkingruppe Gruppe; hellgrau= Gruppe ohne Rezeptor). Ein Gesichtsfeld bestand aus 588 x 588 µm. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) werden mit * gekennzeichnet. Die jeweilige Gruppengröße beträgt $n=3$.

Tabelle 27: Statistische Werte der Monozytenzahl im Gefäß und Gewebe über die Zeit bei der Untergliederung ohne (kiki) oder mit Fraktalkinrezeptor (kiwt)

Monozyten	Monozyten im Gefäß/ Gesichtsfeld	
	kiki	kiwt
AUC	470 +/- (110)	395 +/- (91)
p- Wert	0,627	
Effektgröße	0,43	
Zuwachs in %	19	

Monozyten	Monozyten im Gewebe/ Gesichtsfeld	
	kiki	kiwt
AUC	1020 +/- (234)	1095 +/- (309)
p- Wert	0,856	
Effektgröße	0,19	
Zuwachs in %	7,4	

Auch die Verteilung der neutrophilen Granulozyten im Gefäß und Gewebe analysiert (siehe Abbildung 53A und B). Im Gefäßsystem zeichnete sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ab. Auch im Zuwachs der Zellen über den gesamten Zeitraum konnte ein minimaler Anstieg von 5% ermittelt werden. Im Gewebe war die Anzahl der neutrophilen Granulozyten bei der CX3CR1 kiwt Versuchsgruppe im Vergleich zur CX3CR1 kiki Gruppe ohne den Rezeptor in ihrer zu den Zeitpunkten 120 und 180 Minuten signifikant erhöht. Es zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der neutrophilen Granulozyten, der seinen höchsten Anstieg bei 180 Minuten zeigte. Es ist anzunehmen, dass die Anzahl der Zellen noch weiter ansteigt. Der Zuwachs an neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur Gruppe, die keinen Rezeptor besitzt, betrug 410% (siehe Tabelle 28). In der Versuchsgruppe der Tiere, die keinen Fraktalkinrezeptor hatten zeigte sich, dass kaum neutrophile Granulozyten ins Gewebe übertreten.

Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der CX3CR1 Rezeptor ein wichtiger Bestandteil für die neutrophilen Granulozyten ist, das Gefäß zu verlassen, was vor allem von Monozyten vermittelt wird, da diese im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten CX3CR1 exprimieren.

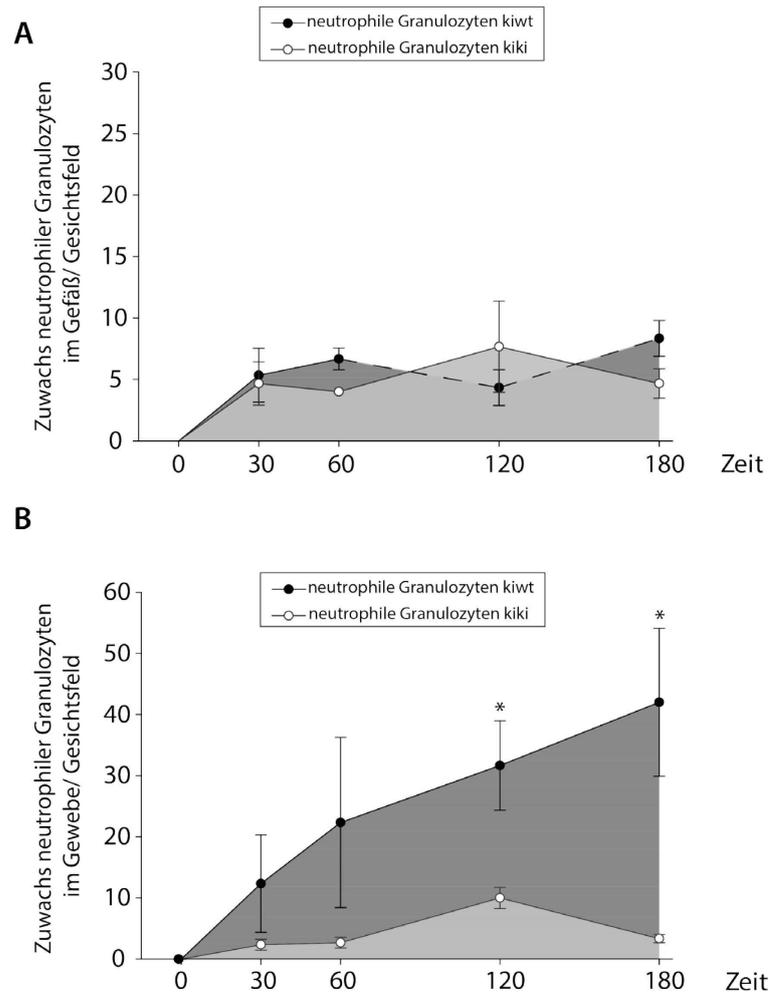


Abbildung 53: Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Zeitverlauf im Gefäß oder im interstitiellen Raum abhängig von CX3CR1

In schwarz sind die Versuchsgruppen mit (kiki) ohne dem Fraktalkinrezeptor (CX3CR1) abgebildet, dabei stellen die runden Symbole (●) die MW der neutrophilen Granulozyten mit dem jeweiligen SEM zu dem definierten Zeitpunkten dar. In weiß ist die jeweilige Kontrollgruppe mit (kiwt) dem CX3CR1 gegenübergestellt, die mit derselben Einteilung MW und SEM je Zeitpunkt aufgetragen wurden. **A)** zeigt die Situation im Gefäß und **B)** interstitiellen Raum. Die grau eingefärbte Fläche stellt die Area under the curve (AUC) dar, die jeweils berechnet wurde (grau= Fraktalkingruppe Gruppe; hellgrau= Gruppe ohne Rezeptor). Ein Gesichtsfeld bestand aus 588 x 588 x 30 µm. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) werden mit * gekennzeichnet. Die jeweilige Gruppengröße beträgt $n = 3$.

Tabelle 28: Statistische Werte der neutrophilen Granulozytenanzahl im Gefäß und Gewebe über die Zeit bei der Untergliederung ohne (kiki) oder mit Fraktalkinrezeptor (kiwt)

neutrophile Granulozyten	neutrophile Granulozyten im Gefäß / Gesichtsfeld	
	kiki	kiwt
AUC	920 +/- (257)	970 +/- (172)
p- Wert	0,879	
Effektgröße	0,13	
Zuwachs in %	5,4	

neutrophile Granulozyten	neutrophile Granulozyten im Gewebe / Gesichtsfeld	
	kiki	kiwt
AUC	890 +/- (108)	4535 +/- (1310)
p- Wert	0,05	
Effektgröße	2,26	
Zuwachs in %	410	

Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. AUC in Klammer die SEM- Werte

Die myeloiden Zellen sollten nicht nur auf ihre Zellanzahl über den zu analysierenden Zeitraum untersucht werden, sondern es sollte auch das interstitielle Bewegungsmuster der Zellen analysiert werden. Die Fragestellung war, ob ein fehlender Fraktalkinrezeptor die Wanderung durch das Gewebe auf den Stimulus hin beeinflusst.

Zuerst wurden die Monozyten in ihrem Migrationsverhalten auf die drei Parameter Geschwindigkeit, Beweglichkeit und Zielgerichtetheit auf die Verletzung hinzu untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Monozyten insgesamt signifikant ($p = 0,029$) schneller durch das Gewebe wandern, wenn Ihnen der Fraktalkinrezeptor fehlt. In ihrer Beweglichkeit und Zielgerichtetheit hatte der Rezeptor keinen Effekt mehr.

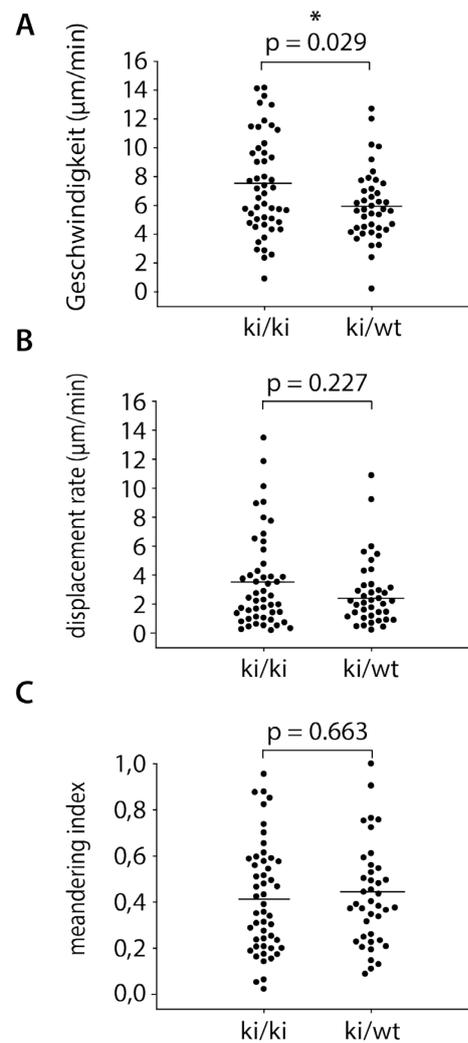


Abbildung 54: Interstitielles Bewegungsmuster von Monozyten/Makrophagen in Abhängigkeit von CX3CR1 bei steriler Inflammation

Die einzelnen Tracks werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen. Gruppe ki/ki hat keinen CX3CR1- Rezeptor; ki/wt hat den Fraktalkinrezeptor. Unterscheidung in die 3 Parameter Geschwindigkeit **A**), Displacement rate **B**) und Meandering Index **C**). Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. Gruppengröße jeweils $n = 3$.

Auch hier wurden zwei verschiedene Zonen gebildet, eine direkte um die Verletzung gelegene Zone mit $< 100\mu\text{m}$ und eine $> 100\mu\text{m}$ entfernt von der Nekrosezone (siehe Abbildung 55). Hier sollte untersucht werden in wie fern, der Effekt von Fraktalkin auf die Monozyten/Makrophagen von der Entfernung zur Laserverletzung abhängig ist.

In der Geschwindigkeit konnte bei der Zone direkt um die Nekrose kein Unterschied festgestellt werden. Genauso zeigten sich die Parameter Beweglichkeit und Zielgerichtetheit, in denen sich die beiden Versuchsgruppen in ihrem Bewegungsmuster nicht unterschieden. In den von dem Laserschaden weiter

entfernten ($>100\mu\text{m}$) Migrationswegen war zu beobachten, dass die Monozyten, die ohne Fraktalkinrezeptor ausgestattet waren, tendenziell ($p= 0,05$) schneller in ihrem Vorankommen im Gewebe sind (siehe Abbildung 55A). Es hatte aber keinen Einfluss auf die Beweglichkeit der Monozyten und auch in ihrer Zielorientierung auf die Verletzung hin zeigten sich keine Unterschiede zu den beiden Gruppen (siehe Abbildung 55B und C)

Man kann hier beobachten, dass die Monozyten ohne Rezeptor schneller durch das Gewebe wandern, als die Monozyten, die mit einem Fraktalkinrezeptor ausgestattet waren und zwar vor allem in weiterer Entfernung von der Nekrosezone. Dies könnte darauf hindeuten, dass Fraktalkin die Monozyten/Makrophagen im Gewebe eher davon abhält zur Laserverletzung zu migrieren.

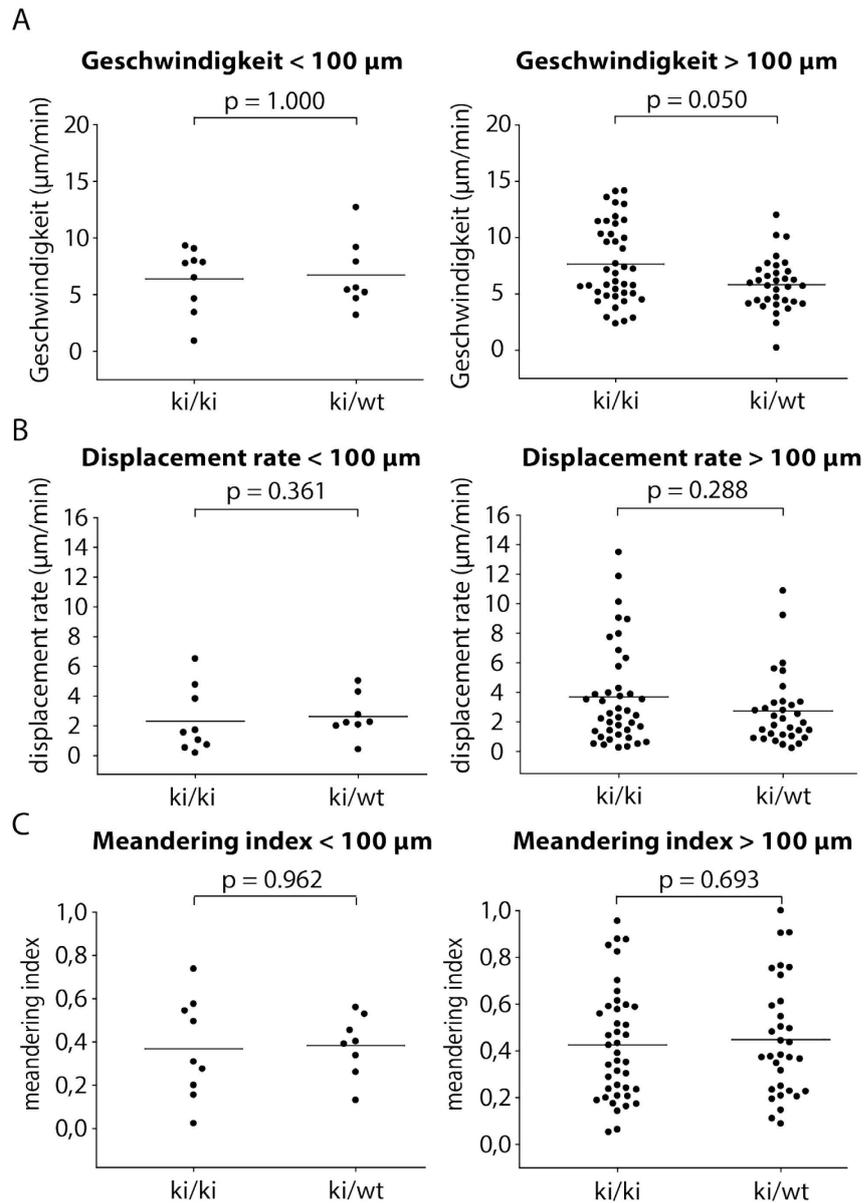


Abbildung 55: Interstitielles Migrationsmuster von Monozyten/Makrophagen in Abhängigkeit vom Abstand zur Laser-Verletzung und der Unterscheidung in die Parameter Geschwindigkeit, Beweglichkeit und Zielgerichtetheit.

Die einzelnen Tracks werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen. Gruppe ki/ki hat keinen CX3CR1- Rezeptor; ki/wt hat den Fraktalkinrezeptor. Die Tracks wurden in einen Gradienten $<$ oder $>$ 100 μm um die Verletzung entfernt unterteilt, mit der Unterscheidung in die 3 Parameter Geschwindigkeit **A**), displacement rate **B**) und meandering index **C**). Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. Gruppengröße beträgt $n = 3$.

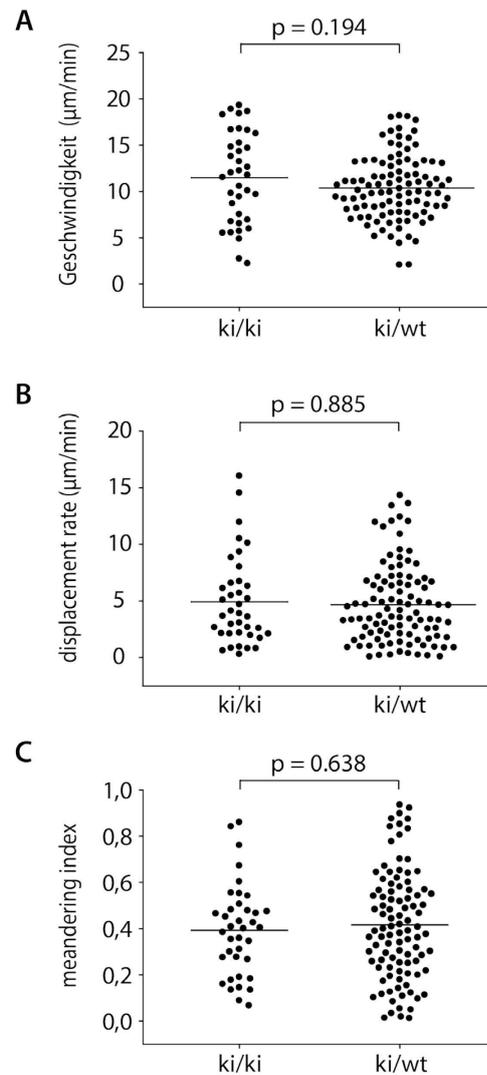


Abbildung 56: Interstitielles Bewegungsmuster der neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit von CX3CR1 bei Laserverletzung

Einzelne Migrationspfade neutrophiler Granulozyten werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen. Gruppe kiki hat keinen CX3CR1- Rezeptor; kiwt hat den Fraktalkinrezeptor. Unterscheidung in die Parameter Geschwindigkeit **A**), displacement rate **B**) und meandering index **C**). Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. Gruppengröße jeweils $n = 3$.

Nach der Analyse des Verhaltens der Monozyten sollten hier nun auch die neutrophilen Granulozyten näher in ihrem Bewegungsmuster durch das Gewebe auf die Verletzung betrachtet werden. In dem ersten Graphen zeichnet sich aber ab, dass ein Fehlen des CX3CR1-Rezeptors keinen Einfluss hat auf die neutrophilen Granulozyten in ihrem Bestreben auf die Verletzung hin zu wandern. Alle drei Parameter (Geschwindigkeit, Beweglichkeit und Zielgerichtetheit) hatten in beiden Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen (siehe Abbildung 56).

Des Weiteren wurde auch hier untersucht, in wie fern der Fraktalkinrezeptor einen Einfluss auf die Wanderung in den beiden Zonen $<$ und $>100 \mu\text{m}$ hat. Hierfür wurden die einzelnen Migrationspfade der neutrophilen Granulozyten nochmals gegeneinander aufgetragen, je nachdem wo sie sich bei ihrem Startpunkt befanden. Hier waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen, aber tendenziell ($p= 0,059$) zeigte sich, dass in dem Bereich direkt um die Nekrosezone, die neutrophilen Granulozyten in Abwesenheit von CX3CR1 auf Monozyten/Makrophagen schneller durchs Gewebe wanderten als die neutrophilen Granulozyten in der Versuchsgruppe in dem der Rezeptor noch vorhanden war. In der entfernteren Zone ($>100\mu\text{m}$) zeigten sich keine Gegensätze und so wanderten die neutrophilen Granulozyten sowohl in der CX3CR1- kiwt Versuchsgruppe als auch in der ohne CX3CR1 annähernd gleich durchs Gewebe (siehe Abbildung 57).

Zusammenfassend zeigt sich hier also, dass Fraktalkin erst für die späte Rekrutierungsphase der Monozyten von Bedeutung ist, jedoch einen signifikanten und zeitunabhängigen Einfluss auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten hat. Dies deutet auf einen indirekten Effekt hin, da neutrophile Granulozyten keinen Rezeptor für Frakalkin exprimieren, der Effekt also nur über die Aktivierung von Monozyten vermittelt werden kann. Zum anderen weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Fraktalkin die Migration von Monozyten/Makrophagen im interstitiellen Gewebe eher negativ beeinflusst in der Hinsicht, dass sie zurückgehalten werden und langsamer in ihrer Bewegung sind.

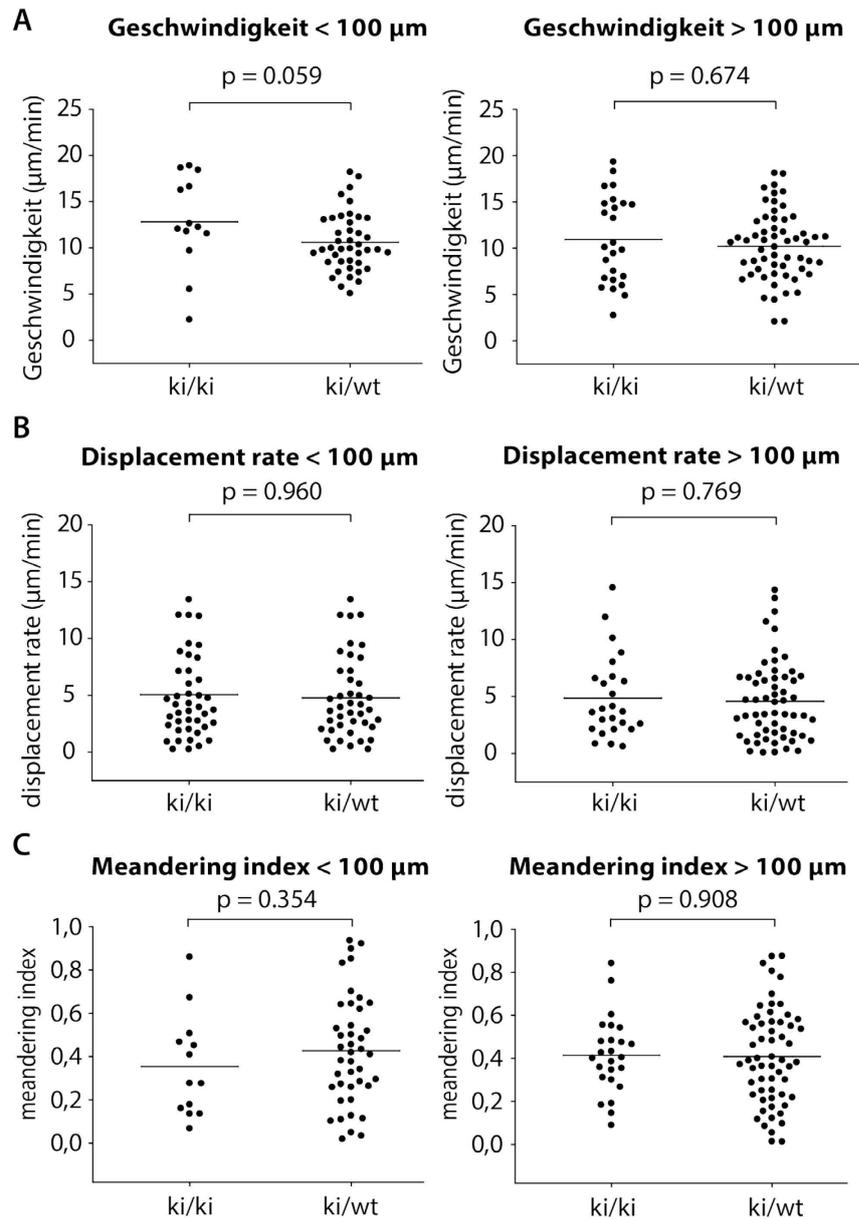


Abbildung 57: Interstitielles Bewegungsmuster neutrophiler Granulozyten abhängig von CX3CR1 mit Differenzierung abhängig von der Entfernung zur Laserverletzung

Die einzelnen Migrationspfade neutrophiler Granulozyten- werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen. Gruppe kiki hat keinen CX3CR1- Rezeptor; kiwt hat den Fraktalkinrezeptor. Die Tracks wurden in einen Gradienten < oder > 100 µm um die Verletzung entfernt unterteilt, mit der Unterscheidung in die 3 Parameter Geschwindigkeit **A**), displacement rate **B**) und meandering index **C**). Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind mit * markiert. Gruppengröße beträgt $n = 3$.

7. Bedeutung von HMGB1 für die Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten

Die sterile Inflammation kann auch eine überschießende Entzündungsantwort auslösen und so im Gewebe zerstörerische Tendenzen annehmen, die eingedämmt werden sollten, um den Schaden so gering wie möglich zu halten. Ein Ansatz hier war zu untersuchen wie die Substanz BoxA sich auf das Verhalten der myeloiden Zellen auswirkt. BoxA ist eine Teilsequenz des HMGB1s und hat in seiner isolierten Form einen antiinflammatorischen Effekt durch Inhibition von HMGB1²⁶. Durch subcutane Applikation von BoxA ins Gewebe sollte der Effekt auf das Zellverhalten der myeloiden Zellen im Milieu einer sterilen Entzündung analysiert werden.

Zuerst sollen die Monozyten betrachtet werden. Hier zeigte sich, dass BoxA eine Wirkung auf die Monozyten zeigte. So kann in der Abbildung 58 gesehen werden, dass insgesamt weniger Zellen über die Zeit rekrutiert werden. Es kam nur zu einem leichten Ansteigen der Zellen nach 30 Minuten, der daraufhin aber stagnierte und über die gesamte Beobachtungszeit von 300 Minuten sich nicht mehr veränderte. Bei der Kontrollgruppe zeigt sich, dass die Monozyten relativ schnell zunehmen und einen Zuwachs von 215% zeigen im Vergleich zur Inhibitionsgruppe. Es konnte nur ein p-Wert von $p = 0,06$ über den gesamten Zeitraum festgestellt werden, der durch die starke Streuung in der Kontrollgruppe zu erklären ist (siehe Tabelle 29). Zum Ende hin konnte bei Zeitpunkt 240 Minuten ein signifikanter Wert festgestellt werden. Das Effektmaß bestätigte aber auch den visuellen Eindruck der Abbildung 58 und spricht für einen starken Effekt ($d = 2,54$).

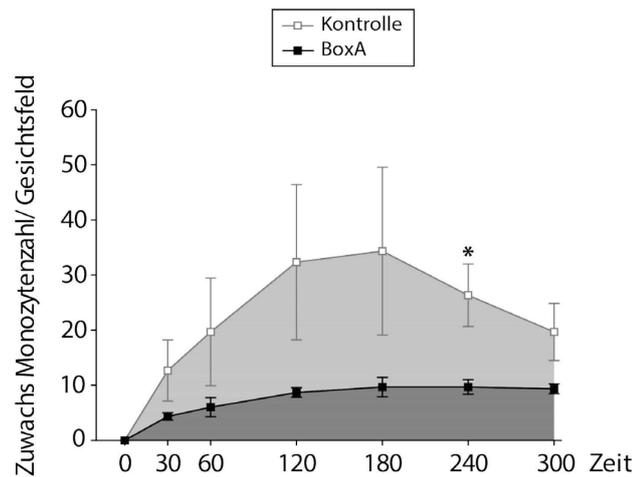


Abbildung 58: Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen in Abhängigkeit von HMGB1

In schwarz ist die Versuchsgruppe mit der BoxA Behandlung abgebildet, dabei stellen die rechteckigen Symbole (■) die MW der Monozyten mit dem jeweiligen SEM zu dem definierten Zeitpunkten dar. In weiß ist die jeweilige Kontrollgruppe mit der Behandlung mit PBS gegenübergestellt. Die grau eingefärbte Fläche stellt die Area under the curve (AUC) dar, die jeweils berechnet wurde (grau = BoxA Gruppe; hellgrau= Kontrollgruppe). Ein Gesichtsfeld bestand aus 588 x 588 x 30 µm. Die jeweilige Gruppengröße beträgt n= 3.

Tabelle 29: Statistische Werte über die Zellzahl der Monozyten unter Einfluss von BoxA

Monozyten	Zellzahl über die Zeit/ Gesichtsfeld	
	BoxA	Isotyp
AUC	2388,75 +/- (962)	3993,75 +/- (1527)
p- Wert	0,064	
Effektgröße	2,54	
Zuwachs in %	215,04	

Auch in diesem Versuchsansatz wurde die Wirkung nochmals genauer untersucht, in dem die beiden Kompartimente Gefäß und Gewebe getrennt voneinander analysiert wurden. Im Gefäß (siehe Abbildung 59A) war zu Beginn des Beobachtungszeitraums kein Unterschied zur Kontrollgruppe zu sehen. Beide stiegen bis zum Zeitpunkt 30 Minuten an. Nach diesem Zeitpunkt kam es in der BoxA- Inhibitionsgruppe aber zum Abfall der Zellzahl an rekrutierenden Monozyten im Gefäß. Es konnte keine Zunahme bis zum Ende des Analysezeitraums verzeichnet werden. In der Kontrollgruppe konnte ein zweiphasiger Anstieg beobachtet werden. Die erste Phase zeigte einen Anstieg bis Zeitpunkt 60 Minuten. Darauf folgte nochmals eine Rekrutierungswelle mit einem Anstieg der Monozyten mit einer Spitze nach drei bis vier Stunden, zu dem die

Monozytenzahlen sich auch signifikant unterschieden. Danach kam es zu einem Abfallen der Monozytenanzahl im Gefäß. Insgesamt konnte ein starker Zuwachs (1218%) im Vergleich zu Inhibitionsgruppe festgestellt werden. Außerdem bestand auch ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen ($p= 0,02$), der durch eine starke Effektgröße von $d= 3,7$ in seiner Ausprägung bestätigt wurde (siehe Tabelle 30).

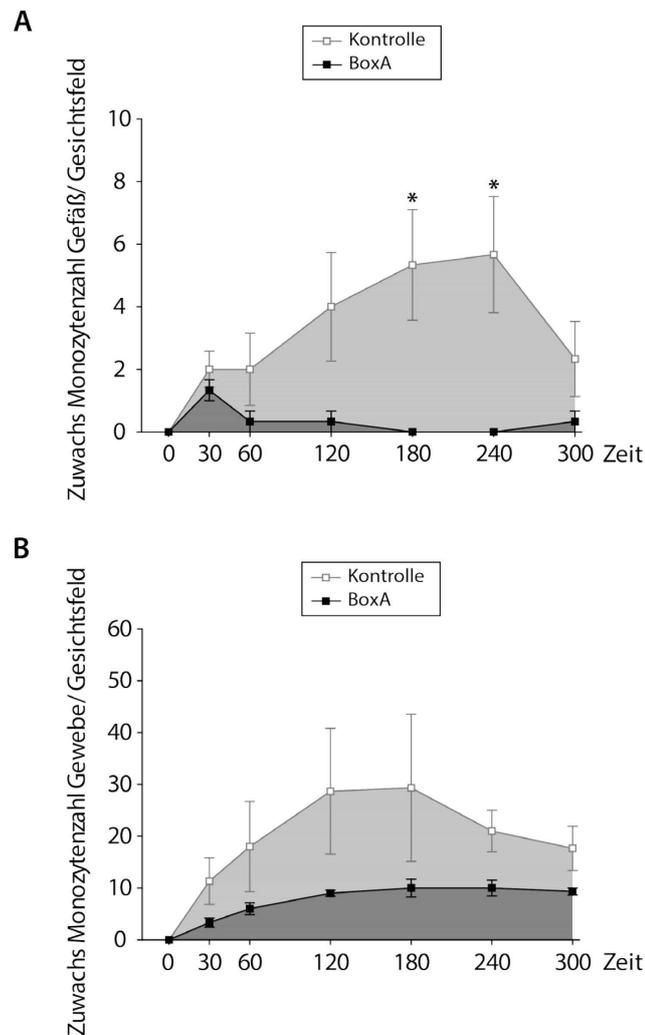


Abbildung 59: Zellzahl an Monozyten, die unter Einfluss von BoxA im Gefäß und im Gewebe rekrutiert werden

In schwarz ist die Versuchsgruppe mit der BoxA Behandlung abgebildet, dabei stellen die rechteckigen Symbole (■) die MW der Monozyten mit dem jeweiligen SEM zu dem definierten Zeitpunkten dar. In weiß ist die jeweilige Kontrollgruppe mit der Behandlung mit PBS gegenübergestellt. Die grau eingefärbte Fläche stellt die Area under the curve (AUC) dar, die jeweils berechnet wurde (grau = BoxA Gruppe; hellgrau= Kontrollgruppe). **A**) zeigt die Situation im Gefäß und **B**) im interstitiellen Raum. Ein Gesichtsfeld bestand aus $588 \times 588 \mu\text{m}$. Die jeweilige Gruppengröße beträgt $n= 3$.

Im Gewebe konnte in der Inhibitionsgruppe gesehen werden, dass BoxA auch eine Wirkung auf die Zellansammlung im Gewebe hat. Hier konnte kaum ein Anstieg im interstitiellen Raum verzeichnet werden. In der Kontrollgruppe lag der Zuwachs der Zellen bei 167% in Bezug zur BoxA behandelten Gruppe. Der Unterschied war zwar nicht signifikant ($p=0,08$), aber durch Bestimmung der Effektstärke ($d=2,3$) kann von einer unterschiedlichen Ausprägung in der Anzahl an Zellen im Gewebe ausgegangen werden (Tabelle 30).

Tabelle 30: Statistische Werte der Monozytenzahl im Gefäßsystem und Gewebe über die Zeit unter Einfluss von BoxA

Monozyten	Monozyten im Gefäß / Gesichtsfeld	
	BoxA	Isotyp
AUC	85 +/- (19)	1120 +/- (399)
p- Wert	0,021*	
Effektgröße	3,66	
Zuwachs in %	1217,6	

Monozyten	Monozyten im Gewebe / Gesichtsfeld	
	BoxA	Isotyp
AUC	2390 +/- (26)	6420 +/- (2489)
p- Wert	0,084	
Effektgröße	2,29	
Zuwachs in %	168,62	

Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. AUC in Klammer die SEM- Werte

Nicht nur die Zellzahl sollte in den verschiedenen Kompartimenten erfasst werden, sondern auch das Verhalten der Zellen in ihrem interstitiellen Bewegungsmuster auf den Stimulus hin. Im Überblick über die gesamten Migrationswege konnte festgestellt werden, dass BoxA einen Einfluss auf die Monozyten/Makrophagen in Bezug auf die Geschwindigkeit und Beweglichkeit der Zellen hat. Sie wanderten unter Einfluss des Inhibitors BoxA annähernd um die Hälfte langsamer im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit PBS behandelt wurde. Es bestand in beiden Parametern (Geschwindigkeit und Beweglichkeit) ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p < 0,001$). Auf die Zielgerichtetheit hatte der Inhibitor keine Einfluss ($p=0,387$).

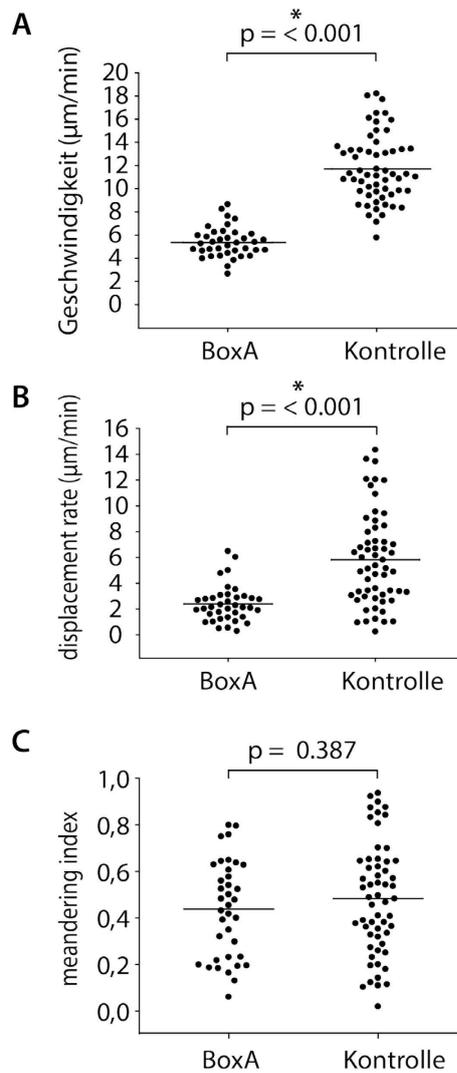


Abbildung 60: Effekte von BoxA auf die interstitielle Monozytenmigration

Die einzelnen Migrationspfade werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen; BoxA behandelte Gruppe gegenüber der Kontrolle. Unterscheidung in die 3 Parameter Geschwindigkeit **A**), displacement rate **B**) und meandering index **C**). Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. Gruppengröße jeweils $n = 3$.

Es wurde wieder Kompartimente gebildet, die sich auf den Abstand der Monozyten zu dem sterilen Stimulus bezog. Hier wird ersichtlich, dass sich kein Unterschied in der Auswirkung des Inhibitors BoxA bezogen auf die Distanz zur Verletzung zeigt. In beiden Kompartimenten ($< 100 \mu\text{m}$ und $> 100 \mu\text{m}$) sind die Monozyten in ihrer Bewegung und Geschwindigkeit signifikant ($p < 0,001$) langsamer im Vergleich zur Kontrolle. Auch hier zeigte sich kein Einfluss durch BoxA auf die Zielgerichtetheit der Monozyten zur Verletzung hin.

Damit konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass BoxA als Inhibitor einen Effekt auf die Monozyten hat, die langsamer in ihrer Wanderung durchs Gewebe sind. HMGB1 hat damit sowohl einen Einfluss auf die chemotaktische Wanderung ($>100\ \mu\text{m}$) im entfernten Kompartiment zur Laserverletzung, als auch in der direkten Umgebung ($< 100\ \mu\text{m}$) der Nekrosezone. Die Monozyten zeigten aber keinen Unterschied in ihrer Zielgerichtetheit auf die Verletzung hin.

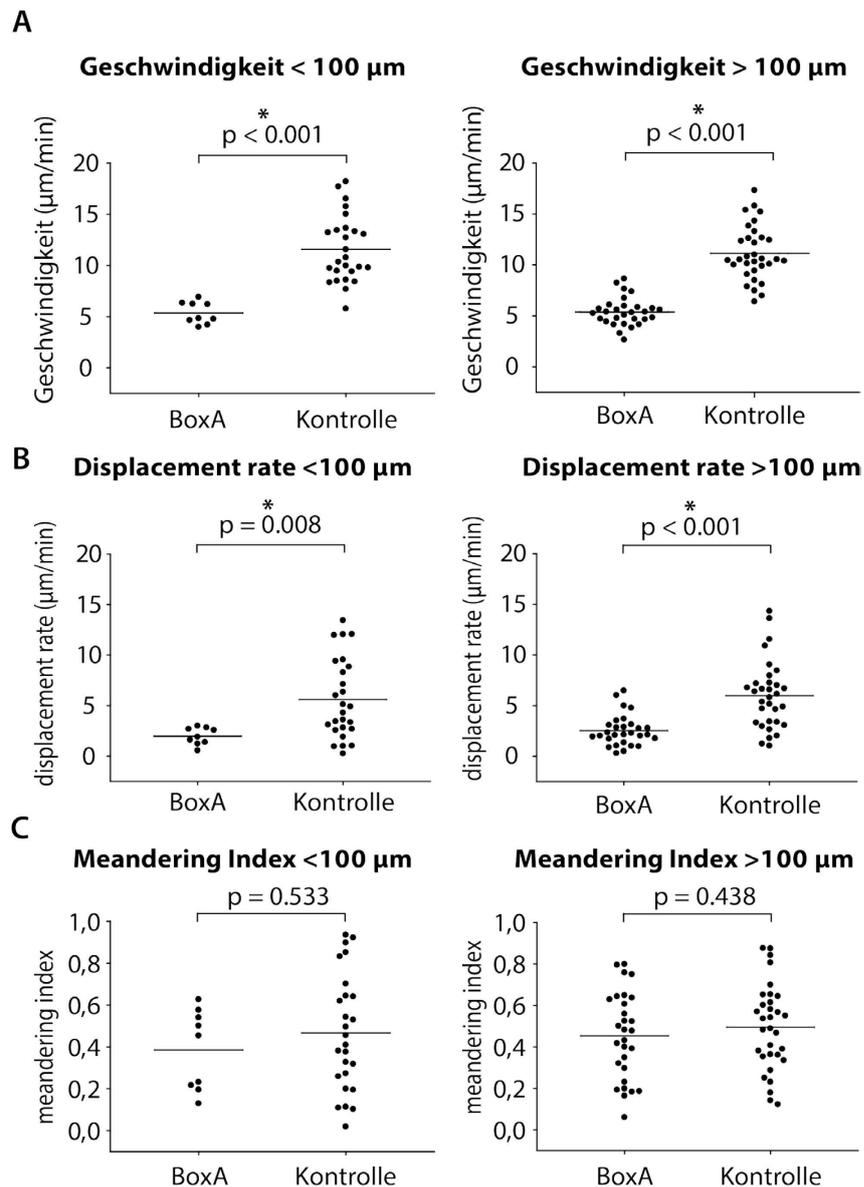


Abbildung 61: Effekt von BoxA auf die interstitielle Migration von Monozyten/Makrophagen in Abhängigkeit zum Abstand zur Laserverletzung

Die einzelnen Migrationspfade werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen; BoxA behandelte Gruppe gegenüber der Kontrolle. Unterscheidung in die 3 Parameter Geschwindigkeit **A**), displacement rate **B**) und meandering index **C**). und die Aufteilung der Verfolgungstrecken in einen Zone <100 und $>100\ \mu\text{m}$. Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind mit * markiert. Gruppengröße jeweils $n=3$.

Nachdem sich ein ausgeprägter Effekt von HMGB1 auf die Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen bei steriler Inflammation gezeigt hatte, sollte dies nun auch bei neutrophilen Granulozyten untersucht werden. Hier zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied in der Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten zu verzeichnen war. Es kamen im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell weniger Zellen ($p= 0,292$) als in der Kontrollgruppe, die nur einer Behandlung von subcutan verabreichtem PBS ausgesetzt waren. Durch Bestimmung der Effektgröße ($d= 1,21$) kann aber von einem Unterschied zwischen den beiden Gruppen ausgegangen werden. In der Kontrollgruppe kamen auch 44% mehr neutrophile Granulozyten als in der Inhibitionsgruppe (siehe Tabelle 31). Es konnte auch im Graphen beobachtet werden, dass die Zellen in beiden Gruppen erst später eine Reaktion auf den sterilen Stimulus zeigen. Ein Anstieg in beiden Gruppen fand erst nach 30 Minuten statt, was bei den neutrophilen Granulozyten unter Einfluss eines Entzündungsreizes spät ist, da diese sofort mit einer Rekrutierung reagieren (siehe V.1).

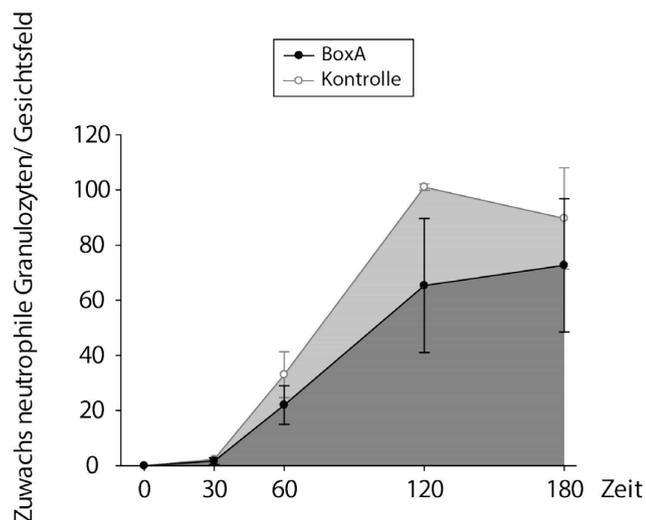


Abbildung 62: Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten abhängig von HMGB1

In schwarz ist die Versuchsgruppe mit der BoxA Behandlung abgebildet, dabei stellen die runden Symbole (●) die MW der neutrophilen Granulozyten mit dem jeweiligen SEM zu dem definierten Zeitpunkten dar. In weiß ist die jeweilige Kontrollgruppe mit der Behandlung mit PBS gegenübergestellt. Die grau eingefärbte Fläche stellt die Area under the curve (AUC) dar, die jeweils berechnet wurde (grau = BoxA Gruppe; hellgrau = Kontrollgruppe). Ein Gesichtsfeld bestand aus $588 \times 588 \times 30 \mu\text{m}$. Die jeweilige Gruppengröße beträgt $n= 3$.

Tabelle 31: Statistische Werte der Zellzahl neutrophiler Granulozyten unter Einfluss von BoxA

neutrophile Granulozyten	Zellzahl über die Zeit/ Gesichtsfeld	
	BoxA	Isotyp
AUC	7140 +/- (2426,29)	10305 +/- (962,34)
p- Wert	0,292	
Effektgröße	1,21	
Zuwachs in %	44,33	

Auch hier wurde nochmals genauer die Zellverteilung im Gefäß oder Gewebe aufgeschlüsselt (Abbildung 63). Es zeigte sich sowohl im Gefäß als auch im Gewebe eine verzögerte Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten, die erst nach einer halben Stunde begann. Im Gefäß (siehe Abbildung 63A) konnte kein signifikanter Unterschied ($p= 0,678$) zwischen den beiden Gruppen berechnet werden. Die Effektgröße mit einem Wert von $d= 0,45$ bestärkte auch das visuelle Bild des Graphen, der von einem geringen Effekt ausgeht. In der Kontrollgruppe war mit einem Zuwachs von 17% mehr Zellen über die Zeit feststellbar und zusätzlich kein großer Unterschied zur Inhibitionsgruppe deutlich (siehe auch Tabelle 32).

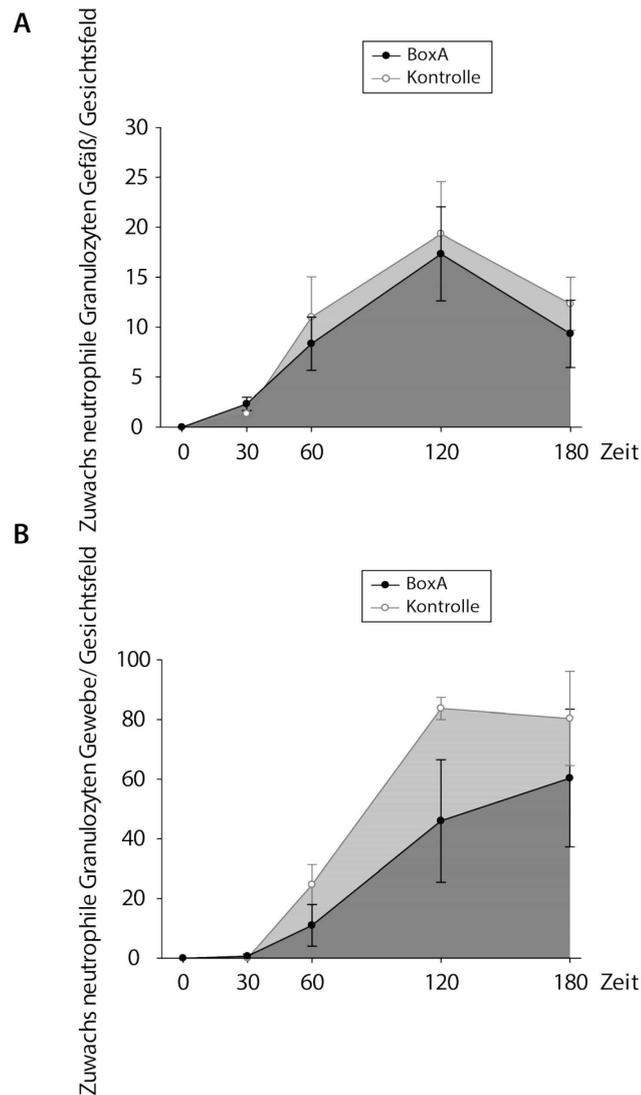


Abbildung 63: Zellzahl an neutrophilen Granulozyten im Gefäß und im Gewebe unter Einfluss von BoxA

In schwarz ist die Versuchsgruppe mit der BoxA Behandlung abgebildet, dabei stellen die runden Symbole (●) die MW der Monozyten mit dem jeweiligen SEM zu dem definierten Zeitpunkten dar. In weiß ist die jeweilige Kontrollgruppe mit der Behandlung mit PBS gegenübergestellt, die mit derselben Einteilung MW und SEM je Zeitpunkt aufgetragen wurde. Die grau eingefärbte Fläche soll die Area under the curve (AUC) darstellen, die jeweils berechnet wurde (grau = BoxA Gruppe; hellgrau= Kontrollgruppe). **A)** zeigt die Situation im Gefäß und **B)** interstitiellen Raum. Ein Gesichtsfeld bestand aus 588 x 588 x 30 µm. Die jeweilige Gruppengröße beträgt n= 3.

Auch im Gewebe war ein ähnliches Bild zu verzeichnen. Auch hier war der Beginn der Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten erst nach 30 Minuten bemerkbar, welches mit der späten Rekrutierung im Gefäß konform einhergeht. Im Gewebe ist aber in der Kontrollgruppe eine vermehrte Rekrutierung ins Gewebe festzustellen, die nicht signifikant ist ($p= 0,205$), aber in ihrem Effektmaß mit $d= 1,51$ schon einen Effekt

ermittelt. In der Kontrollgruppe wird auch ein Zuwachs von 68% mehr neutrophile Granulozyten zur Kontrolle berechnet (siehe Tabelle 32).

Tabelle 32: Statistische Werte neutrophiler Granulozyten im Gefäß und im Gewebe unter Einfluss von BoxA

neutrophile Granulozyten	neutrophile Granulozyten im Gefäß / Gesichtsfeld	
	BoxA	Isotyp
AUC	1765 +/- (473)	2065 +/- (475)
p- Wert	0,678	
Effektgröße	0,45	
Zuwachs in %	17	

neutrophile Granulozyten	neutrophile Granulozyten im Gewebe / Gesichtsfeld	
	BoxA	Isotyp
AUC	5085 +/- (2229)	8540 +/- (507)
p- Wert	0,205	
Effektgröße	1,51	
Zuwachs in %	67,94	

Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. AUC in Klammer die SEM- Werte

In der Rekrutierungsrate der neutrophilen Granulozyten zur Verletzung hin konnte kein signifikanter Unterschied über die Zeit festgestellt werden. Somit führt BoxA lediglich zu einer verzögerten Transmigration von neutrophilen Granulozyten in das Gewebe, zeigt aber insgesamt keinen signifikanten Effekt auf die Akkumulation der neutrophilen Granulozyten bei steriler Inflammation.

Ob eine Wirkung des Inhibitors BoxA auf das interstitielle Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten besteht, wurde im Folgenden untersucht. Es konnte aber auch hier dargestellt werden, dass es zu keiner Auswirkung auf die neutrophilen Granulozyten durch BoxA kommt. Alle drei Parameter zeigten fast identische Werte zur Kontrollgruppe auf (siehe Abbildung 64). Um auch auszuschließen, dass BoxA nur einen Kompartiment-spezifischen Effekt hatte, wurde zuletzt noch die neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit zur Entfernung zur Nekrosezone aufgeteilt. Im Bereich $< 100\mu\text{m}$ direkt um die Verletzung konnte keine Änderung im Bewegungsmuster bei den Zellen erkannt werden (siehe Abbildung 65). Auch direkt um die Nekrosezone ($> 100\mu\text{m}$) zeigte sich kein Unterschied zur Kontrollgruppe in ihrem Migrationsmuster durch den interstitiellen Raum.

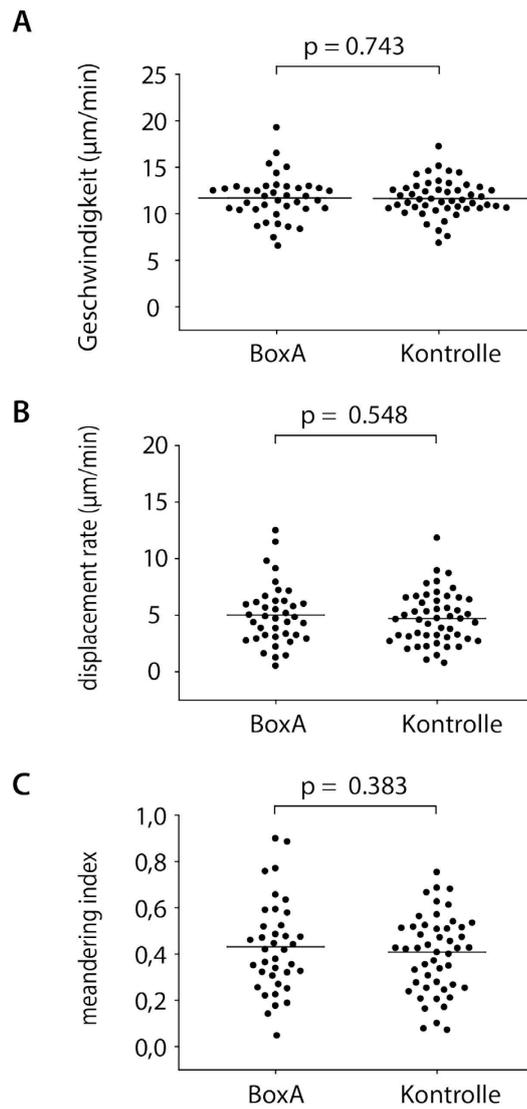


Abbildung 64: Effekt von BoxA auf die interstitielle Migration neutrophiler Granulozyten

Die einzelnen Migrationspfade werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen; BoxA behandelte Gruppe gegenüber der Kontrolle. Unterscheidung in die drei Parameter Geschwindigkeit **A**), displacement rate **B**) und meandering index **C**), und die Aufteilung der Verfolgungstrecken in einen Zone <100 und $>100\mu\text{m}$. Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind in Fett und mit * markiert. Gruppengröße jeweils $n = 3$.

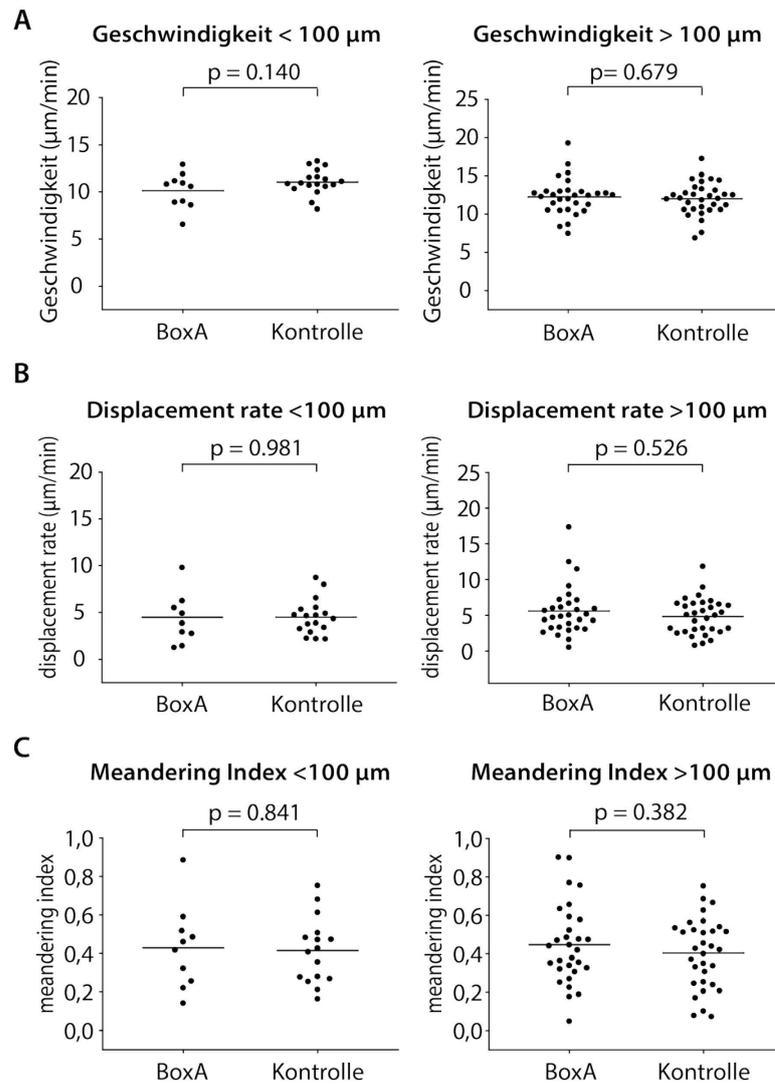


Abbildung 65: Effekt von BoxA auf das interstitielle Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit zum Abstand zur Laserverletzung.

Die einzelnen Migrationspfade werden als Punkte dargestellt und gegeneinander aufgetragen; BoxA behandelte Gruppe gegenüber der Kontrolle. Unterscheidung in die 3 Parameter Geschwindigkeit **A**), displacement rate **B**) und meandering index **C**), und die Aufteilung der Verfolgungstrecken in einen Zone <100 und >100µm. Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind mit * markiert. Gruppengröße jeweils $n = 3$.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass der Inhibitor BoxA nur einen Effekt auf die Monozyten zeigte. Diese sind in ihrer Geschwindigkeit und Beweglichkeit reduziert. Aber auch in ihrer Zellanzahl, die über die Zeit angelockt werden, kommen insgesamt weniger Monozyten als Reaktion auf den sterilen Reiz der Nekrose. Bei den neutrophilen Granulozyten konnte keine Wirkung des BoxAs festgestellt werden.

VI. DISKUSSION

1. Wahl der Mauslinie

Die Maus als Versuchstier wurde in dieser Arbeit gewählt durch die Verfügbarkeit von transgenen Linien, die Untersuchungen zu den jeweiligen Fragestellungen *in vivo* und *ex vivo* ermöglichen. Außerdem sind kurze Generationszeiten, die einfache Haltung und die meist problemlose Aufzucht von Vorteil. Gerade für die 2-Photonentechnik konnten transgene Mausstämme verwendet werden, deren myeloide Zellen mit dem grün fluoreszierenden GFP gekoppelt sind. Somit konnte der Einsatz von Antikörpermarkierten Farbstoffen reduziert werden, bei denen teilweise noch nicht geklärt ist, inwiefern die Besetzung des Liganden einen Einfluss auf die Migration hat.

Die Fraktalkin- Maus wurde in zwei unterschiedlichen Genotypen verwendet. Zum einen konnte das Verhalten der Monozyten bei der sterilen Entzündung analysiert werden. Zum anderen hat aber auch der knock-in Auswirkung auf die CX3CR1-Rezeptor- Ausstattung. Der Einfluss des Rezeptors konnte somit in der hier vorliegenden Arbeit auch auf das Migrationsverhalten untersucht werden. Der größte Anteil an grün fluoreszierenden Zellen sind in dieser Mauslinie die Monozyten, aber auch einige wenige dendritische Zellen leuchten in grün¹⁶³.

Bei der Generierung der LysM- Maus konnte nachgewiesen werden, dass 98% der neutrophilen Granulozyten in grün fluoreszieren und nur ein vernachlässigbarer kleiner Teil von 2% der Monozyten zusätzlich auch in grün leuchtet.¹⁶² Somit ließ sich auch das Verhalten der neutrophilen Granulozyten im zu untersuchenden Kompartimenten studieren. Durch die Möglichkeit fluoreszierende Antikörper in einer anderen Wellenlänge zu verabreichen, erweitert sich das Spektrum an Zellpopulationen, die gleichzeitig dargestellt werden können.

2. Verwendung des Ohrmodells in der Zwei-Photonentechnik

Zur Darstellung der sterilen Entzündung *in vivo* musste ein Modell gefunden werden, dass die Visualisierung in einem Gewebe ermöglicht, welches kompatibel für die 2-Photonentechnik ist. Das bedeutete eine geringe Gewebedichte und eine Möglichkeit zur Immobilisation, um stabile und über längere Zeiträume andauernde Videos zu

erstellen. Zur Auswahl stand das Cremastermodell dem Ohrmodell gegenüber. Bei ersterem präpariert man den *Musculus cremaster* frei, um in einer Einspannvorrichtung den Muskel für das Mikroskop aufzuspannen. Dieser Eingriff stellt ein sehr invasives Modell dar, da durch die Manipulation bei der Präparation Entzündungsreaktionen leicht hervorgerufen werden können.²⁰³ Außerdem können im Cremastermodell nur männliche Tiere verwendet werden, so dass aus Tierschutzrelevanten Gründen auch dem Ohrmodell der Vortritt gegeben werden sollte, da dort beide Geschlechter verwendet werden können und keine weiblichen Überschusstiere anfallen. Da in der vorliegenden Arbeit die sterile Entzündung untersucht werden sollte, fiel die Wahl auf das Ohrmodell. Gerade durch ihre nicht invasive Präparation und den geringen Durchmesser des Ohrgewebes, welches mit möglichst wenigen kleinen sterilen Nadeln in die Vorrichtung eingespannt wird. So entsteht keine Entzündung durch die Präparation. Der sterile Entzündungsreiz wurde dann mit Hilfe eines Lasers fokal begrenzt gesetzt. So konnte mit Hilfe dieser Methode myeloide Zellen sowohl in der intravaskulären, als auch in der interstitielle Migration *in vivo* näher untersucht werden. Es bestand ebenso die Möglichkeit, durch Verabreichen inflammatorischer Mediatoren einen Entzündungsreiz zu setzen. Diese Methode war aber in ihrer Lokalisation nicht so exakt wie bei einer kontrolliert gesetzten Laserverletzung, ebenso wäre auch die Untersuchung eines Gradienten nicht möglich.

3. Wahl der humanen Fibroblasten für die *in-vitro* Versuche

Der Einsatz der humanen Fibroblasten bei der *in vitro* Untersuchung wurde gewählt, um auch eine Aussage im humanen System treffen zu können. Bei einer Laserverletzung werden Fibroblasten geschädigt und gehen durch Nekrose zugrunde. Dabei setzen sie Substanzen frei, die es zu untersuchen gilt. Aus diesem Grunde wurden humanen Fibroblasten eingesetzt, um nekrotisches Zelllysate herzustellen. Außerdem war es möglich mit dem nekrotischen Zelllysate an humanen Plättchen zu arbeiten. Die Isolierung von humanen Zellen gestaltet sich einfacher in der Durchführung und Gewinnung einer ausreichenden Anzahl an Zellen für die Durchführung der Versuche. Bei der Isolierung von murinen Zellen liegt die Schwierigkeit schon in der geringen Menge des Blutvolumens und der damit einhergehenden Zellzahl. So ist die Verwendung humaner Zellen zu präferieren.

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Das Zusammenspiel der neutrophilen Granulozyten, Monozyten/ Makrophagen und Thrombozyten bei der sterilen Inflammation

Bei der akuten Entzündungsreaktion ist eine Fülle an verschiedenen Zellen beteiligt, die während der Prozesse der Inflammation miteinander interagieren müssen. Bisher wurden diese Mechanismen primär im Gefäßsystem akribisch untersucht⁷⁵. Dabei standen die Interaktionen der myeloiden Zellen mit dem Endothel im Fokus. Die Rekrutierungsmechanismen nach Übertritt der Zellen in den interstitiellen Raum sind noch weitgehend unerforscht und waren der Schwerpunkt der hier vorliegenden Arbeit. Es wurden verschiedene Beobachtungszonen eingeteilt und analysiert. So wurde zum einen das Gefäßsystem, eine Nekrose-ferne (<100µm) und eine -nahe (>100 µm) Zone gebildet. Die beiden Zonen wurden untersucht, da McDonald et al²⁰⁴ zeigen konnte, dass neutrophile Granulozyten in Richtung des nekrotischen Stimulus zwei unterschiedlichen Wegen folgen können. So wurde gezeigt, dass die neutrophilen Granulozyten zuerst einem Chemokingradienten durch IL-8 folgen. Umso näher die Zellen zur Verletzung migrierten wurde dieser von endogenen Signalstoffen (Danger- Signal- Gradient), die direkt aus der Gewebsverletzung stammen (wie z.B. N- formyl Peptide) abgelöst¹⁴⁴. Dort läuft die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten primär über FPR1 ab und nicht mehr über CXCR2²⁰⁴. So wird den neutrophilen Granulozyten die Fähigkeiten zugeschrieben, zum einen zwischen verschiedenen Gradienten unterscheiden zu können und zum anderen den Weg zur Verletzung durch die Wahl des passenden Migrationsmodus im interstitiellen Gewebe treffen zu können^{204,205}.

Im Gefäßsystem zeigt sich, dass nach Setzen eines Entzündungsreizes vor allem die neutrophilen Granulozyten die ersten Zellen sind, die schon nach wenigen Minuten rekrutiert werden und die Monozyten erst in einer zweiten Welle angelockt und ins Gewebe übertreten²⁰⁶. Die eigenen Beobachtungen stimmen mit der Theorie von Söhnlein und Lindbom¹⁹⁶ überein, in dem in der ersten Phase einer Gewebsverletzung die patrouillierenden Monozyten das Gefahrensignal registrieren und mit einer Cytokine- und Chemokin-Ausschüttung reagieren und damit die neutrophilen Granulozyten anlocken. Dies konnte in dem Beobachtungszeitraum durch einen stetigen Anstieg der neutrophilen Granulozyten gesehen werden. Diese setzen beim Übertreten ins Gewebe ihre Granula frei, die weitere neutrophile Granulozyten anlocken, was zu einem stetigen Anstieg an neutrophilen Granulozyten führt. Auch die inflammatorischen Monozyten werden durch die freigesetzten Granula rekrutiert, aber

zeigen erst einem Anstieg nach mehreren Stunden.

Ebenso konnte im Gewebe zuerst der starke Anstieg an neutrophilen Granulozyten beobachtet werden, dem eine zweite Rekrutierungswelle folgt. Dieses Phänomen ist von Weninger⁷⁸ als drei-Phasen-Kaskade publiziert. Darin wird beschrieben, dass teilweise die neutrophilen Granulozyten schon in nicht entzündlichen Gewebe vorliegen und somit als erste Reaktionszellen („first responder“) vorliegen⁷⁸. Dies erklärt den sofortigen Anstieg an Zellen nach der Verletzung, die in der ersten Phase sofort zu der Verletzung migrieren (erste Wellen an Zellen). Die zweite Phase wird durch die schon vorliegenden neutrophilen Granulozyten eingeleitet. Diese sehr kurzlebigen Zellen²⁰⁶ gehen zugrunde und setzen dabei ein Leukotrien (LTB₄) frei, das als parakrines Kommunikationssignal weitere neutrophile Granulozyten über weite Strecken zum Ort der Verletzung rekrutiert^{78,145}. Diese zweite Welle an neutrophilen Granulozyten konnten auch in den eigenen Versuchsansätzen beobachtet werden. Zudem konnte die Akkumulation der Monozyten im Gewebe charakterisiert werden

Hier zeigte sich, dass verschiedene Rekrutierungsmuster in den beiden Kompartimenten Gefäß und Gewebe zugrunde liegen.

4.1.1. Interaktionen zwischen Thrombozyten mit myeloiden Leukozyten

Während den Analysen konnten intravaskuläre Interaktionen zwischen den neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und den Thrombozyten *in vivo* beobachtet werden. Plättchen bildeten dabei keine Aggregate in den Gefäßen aus, aber es waren transiente Kontakte mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten zu sehen. Da Thrombozyten im Gefäßsystem zirkulieren sind ihre Interaktionen mit Immunzellen bei einer Entzündung auf dieses Kompartiment beschränkt. Es ist schon eine Plättchen- Leukozyten- Komplexbildung in der Literatur beschrieben¹⁹⁸, die durch einen Entzündungsreiz entsteht. Dabei wird im Milieu einer Entzündung durch Cytokine das Endothel aktiviert, welches zu einer Plättchenaktivierung und der daraus resultierenden P-Selektinfreisetzung über PSGL-1 zur Leukozytenrekrutierung führt. Es wurde aktivierten Plättchen auch eine Serotonin- Freisetzung und der daraus resultierenden Leukozyten Adhäsion nachgewiesen⁸⁹.

Auch bei dem *in vitro* Experimenten konnte hier gezeigt werden, dass Plättchen auf DAMPs reagieren. In dem hier gewonnenen nekrotischen Zelllysate konnte schon Mezayen et al nachweisen das HMGB1 in diesem vorhanden ist und eine signifikante

proinflammatorische Cytokinausschüttung hervorruf²⁰⁷. In dieser Veröffentlichung konnte auch gezeigt werden, dass die Nekrose endogene Stoffe freisetzt, auf die das Immunsystem mit einer Entzündungsantwort reagiert²⁰⁷. So konnte in der Aggregometrie gezeigt werden, dass durch HMGB1 eine Aktivierung der Thrombozyten möglich war. Selbst nach Hitze-Inaktivierung der proteinogenen Signale war noch eine Aktivierung der Plättchen möglich, so dass davon auszugehen ist, dass in dem nekrotischen Zelllysate noch Signalmoleküle enthalten sind.

Da durch die Interaktionen und die *in vitro* Versuche den Plättchen eine Rolle im Entzündungsgeschehen zu zuschreiben ist, wurden diese nun mittels eines Antikörpers entfernt. Es sollte hier vor allem der Effekt auf die Zellzahlen über die Zeit im Gefäß und im Gewebe untersucht werden, aber auch das Migrationsmuster der Zellen im interstitiellen Raum betrachtet werden. Ein erst kürzlich veröffentlichtes Paper von Sreeramkumar et al.¹⁹⁹ postulierte, dass Plättchen mit neutrophilen Granulozyten interagieren und das Gefäßsystem nach aktivierten Plättchen abtasten, um dann dort vermehrt auszutreten. In unserer Betrachtung über den Analysezeitraum von vier Stunden konnte im Gefäß keine veränderten Zellzahlen an neutrophilen Granulozyten festgestellt werden. Im Gewebe zeigten die neutrophilen Granulozyten in der Gruppe in der die Thrombozyten fehlten (Depletionsgruppe), eine signifikante Reduzierung in ihrer Geschwindigkeit. Diese Beobachtung der Geschwindigkeitsreduzierung machte die Gruppe um Sreeramkumar et al. auch im Gefäßsystem nach Depletion der Thrombozyten und konnte zusätzlich noch demonstrieren, dass das Kriechen (crawling) der neutrophilen Granulozyten vermindert war, welches ein Signal für die Aktivierung der Zelle darstellt. Die Beweglichkeit der neutrophilen Granulozyten war in der Depletionsgruppe auch signifikant vermindert. Um zu sehen in wie weit der Effekt der fehlenden Thrombozyten sich auf die neutrophilen Granulozyten auswirkt wurden die Migrationsstrecke nochmals unterteilt in welchem Kompartiment sie sich im Bereich der Verletzung befanden. Dabei zeigte sich, dass die fehlenden Plättchen nur einen Effekt direkt nach dem Übertritt ins Gewebe haben und in der Zone direkt um die Verletzung keine Unterschiede mehr festzustellen sind. Es kann festgestellt werden, dass der Effekt nur nach dem Austreten der neutrophilen Granulozyten ins Gewebe vorhanden ist. Es kann angenommen werden, dass dieser Effekt auf eine nicht ausreichende Aktivierung zurückgeführt werden kann. In dem weiteren Verlauf zeigt sich, dass die neutrophilen Granulozyten Strukturen im Gewebe heranziehen, die unabhängig von Plättchen sind.

Die Auswirkungen des Fehlens der Thrombozyten auf die Monozyten konnte in einer geringeren Zellzahl über den beobachteten Zeitrahmen festgestellt werden. Es kann diskutiert werden, ob durch das Fehlen der Thrombozyten und der daraus resultierenden nicht vorhandenen Aktivierung der Plättchen, weniger PAF freigesetzt wird¹⁹⁸. Die Freisetzung von PAF resultiert in einer Abgabe des Chemokines CCL2 durch Leukozyten, welches wiederum zur Folge eine Monozytenrekrutierung hätte¹⁹⁸. CCL2 wirkt als ein Signalstoff in der Anlockung der Monozyten²⁰⁸. So könnten die verminderte Monozytenrekrutierung erklärt werden.

4.1.2. Interaktion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/ Makrophagen im intravaskulären, perivaskulären und interstitiellen Raum

Auch hier zeigten sich Berührungspunkte zwischen den neutrophilen Granulozyten mit den Monozyten im Gefäß, ebenso wie im Gewebe mit perivaskulären Makrophagen.

Im Gefäßsystem konnte gezeigt werden, dass die myeloiden Leukozyten bevorzugte Austrittsstellen im Bereich der postkapillären Venolen zeigen. Dieses Verhalten konnte sowohl für die neutrophilen Granulozyten als auch die Monozyten dargestellt werden. Diese Beobachtung kann in Bezug gesetzt werden zu Immunofluoreszenz-Untersuchungen, die Bereiche im Gefäßsystem aufgezeigt, die eine dünnere Basalmembran besitzen. Diese LER (low expression regions) sind vergesellschaftet mit Perizyten, die bei der Bildung der Basalmembran beteiligt sind und auch durch ihre Rezeptorenausstattung und Chemokinfreisetzung der Transmigration dieser Zellen assistieren²⁰⁹⁻²¹². Deshalb können LERs auch als Pforte „Gates“ für transmigrierenden myeloide Leukozyten gesehen werden.

Die meisten Monozyten kommen bei einem sterilen Entzündungsreiz aus dem Gefäß und treten als Makrophagen ins Gewebe über. In der Publikation von Abtin et al. konnte gezeigt werden, dass perivaskuläre Makrophagen, die um das Gefäß gelagert sind, fähig sind CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL3 und CCL4 zu bilden¹⁴⁰. Somit entsteht ein Chemogradienten im Gewebe, welcher durch diese Makrophagen aufrechterhalten wird. Diese können durch ihre Rezeptorenausstattung und ihre Chemokinsekretion dazu beitragen, dass die myeloiden Leukozyten durch das Gewebe geleitet werden¹⁴⁰. Es gibt aber auch im Gewebe vorliegende Gewebsmakrophagen, die zu einem

späteren Zeitpunkt bei der Inflammation lange dendritische Ausläufer ausbilden. Mit diesen Ausläufern nehmen sie Kontakt mit im Interstitium migrierenden neutrophilen Granulozyten auf. Die Interaktionen konnten durch eine Verlangsamung in der Migrationsgeschwindigkeit festgehalten werden. Es könnte angenommen werden, dass die perivaskulären Makrophagen dazu beitragen die neutrophilen Granulozyten von dem Entzündungsherd fortzuleiten, um die Entzündungsreaktion in Schach zu halten und eine überschießende Inflammationsreaktion zu verhindern.

Zudem konnte im interstitiellen Raum gezeigt werden, dass es zu Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Gewebsmakrophagen kommt, die nach mehreren Kontakten mit neutrophilen Granulozyten beginnen sich in Richtung der Verletzung zu bewegen. Dies deutet darauf hin, dass die vorerst immobilien Gewebsmakrophagen im späteren Verlauf einer Entzündung aktiviert werden, um die Verletzung zu begrenzen bzw. die Entzündung zu beenden und den Detritus abzuräumen.

Ein weiterer Aspekt war auch den Einfluss der neutrophilen Granulozyten auf das Migrationsverhalten von Monozyten zu studieren. Es zeigte sich, dass ein Fehlen der neutrophilen Granulozyten tendenziell zu einer geringeren Anzahl an Monozyten über den beobachteten Zeitraum führt. Es konnte gesehen werden, dass die neutrophilen Granulozyten besonders in der späteren Phase der Entzündung eine Rolle bei der Rekrutierung der Monozyten spielen. Auch in der näheren Aufschlüsselung zeigte sich, dass im Gefäß etwas mehr Monozyten über die Zeit kommen, aber nicht ins Gewebe übertreten. So kann behauptet werden, dass die neutrophilen Granulozyten einen Einfluss auf den Übertritt der Monozyten ins interstitielle Gewebe haben und primär in der späten Phase der Entzündung eine Rolle spielen. Eine Erklärung hierfür kann die fehlenden Cytokin- und Chemokinfreisetzung durch die neutrophilen Granulozyten angenommen werden¹⁹⁶.

Im Bewegungsmuster der Monozyten zeigte sich im weiter entfernten Bereich um die Nekrosezone, dass die Monozyten ohne die neutrophilen Granulozyten zielgerichteter durch den interstitiellen Raum wandern. Auch in der Geschwindigkeit durch das Gewebe zeigten sie eine signifikant schnellere Migration auf den sterilen Stimulus hin. In der Zone direkt um die Verletzung beobachtete man eine Verlangsamung im Vergleich zu der Gruppe in der die neutrophilen Granulozyten noch vorhanden waren. Es kann postuliert werden, dass durch das Fehlen der neutrophilen Granulozyten die Monozyten in ihrer Bewegung nicht mehr durch diese eingeschränkt sind und sie für die Migration durch das Gewebe unabhängig sind.

4.2. Beeinflussung der Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten durch Fraktalkin bei der sterilen Inflammation

Das Chemokin Fraktalkin stellt einen wichtigen Faktor in der Rekrutierung der Monozyten, insbesondere für die inflammatorischen Monozyten dar. Es kann die Wirkung eines Adhäsionsmoleküls als auch eines chemoaktiven Signalstoffs im Organismus einnehmen. Im Whole Mount Staining zeichnete sich eine gefäßnahe Anlagerung des CX3CL1 ab, welches sich vor allem um die postkapillären Venolen und die dort gelegenen Fibroblasten anreichert.

Die Rolle von mesenchymalen Zellen im Gewebe bei der Rekrutierung der Immunzellen ist noch relativ unbekannt. In der Publikation von Stark et al¹⁰⁰ konnte demonstriert werden, dass dabei Perizyten eine Rolle spielen können. Perizyten sind direkt um das Gefäß gelagert und helfen durch ihre Rezeptorausstattung und Freisetzung von Chemokinen wie MIF myeloiden Leukozyten zielgerichteter auf einen Entzündungsreiz zu wandern¹⁰⁰. In der hier vorliegenden Arbeit lag ein Schwerpunkt in der Ausarbeitung weiterer mesenchymaler Zellen, die bei der Migration durch das Gewebe eine Rolle spielen könnten. Hierfür wurden Fibroblasten mit nekrotischen Zelllysats stimuliert, um ihre Sekretion auf bestimmte Chemokine zu demonstrieren. Mit dem nekrotischen Zelllysats konnte in der Publikation von Mezayen et al. gezeigt werden, dass darin eine Fülle an verschiedenen Substanzen enthalten sind, die einen Cytokin- und Chemokinausschüttung bei myeloiden Leukozyten auslösen²⁰⁷. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur Zellen des Immunsystems auf den Stimulus des nekrotischen Zelllysats reagieren, sondern auch die Fibroblasten auf einen sterilen Entzündungsstimulus reagieren können. Dabei zeigte sich in der rtPCR, dass Fraktalkin in seiner Expression hochreguliert wird und auch aktiv sezerniert wird, welches anhand der ELISA Daten gezeigt werden konnte. Für die Rekrutierung der Monozyten ist Fraktalkin erst in der späten Phase der sterilen Inflammation von Bedeutung. Dies könnte seine Bedeutung in chronischen Prozessen erklären. In verschiedenen Studien zeigte sich bei chronischen Prozessen, wie bspw. bei der Arteriosklerose eine erhöhte Fraktalkinexpression²¹³. Dort stellen die zirkulierenden Monozyten, die späteren Schaumzellen in dem arteriosklerotischen Plaque dar²¹⁴.

Die Anzahl an neutrophilen Granulozyten unterschied sich signifikant im Gewebe gegenüber der Gruppe, die keinen Fraktalkinrezeptor mehr hatte. Dies weist darauf hin, dass neutrophile Granulozyten von Monozyten ein Signal erhalten, welches die Transmigration der neutrophilen Granulozyten in das Gewebe fördert. Können die Monozyten in Abwesenheit von CX3CR1 nicht aktiviert werden, bleibt auch das Signal

an die neutrophilen Granulozyten aus, welche dann im Gefäß akkumulieren, aber nicht in das Gewebe übertreten. Da die neutrophilen Granulozyten keinen Fraktalkinrezeptor besitzen, ist der Effekt auf diese Subpopulation also indirekt durch Monozyten vermittelt.

Im Bewegungsmuster der einzelnen Zellen zeigte sich bei den Monozyten der Verlust des Rezeptors durch eine schnellere Migration im Gewebe. Dieses Phänomen konnte in der nekroseferneren Zone festgestellt werden. Die schnellere Geschwindigkeit der Monozyten ohne CX3CR1 könnte erklärt werden mit einer fehlenden Rezeptor-Bindung im interstitiellen Raum an die dort vorhandenen Strukturen. Der Unterschied bestand nur in der Geschwindigkeit, CX3CR1 hatte keinen Einfluss auf die Zielgerichtetheit der Zellen im Gewebe. Zudem zeigte sich, dass der Fraktalkinrezeptor auf das Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten im Gewebe keinen Einfluss nahm.

4.3. Selektive Regulation der Monozytenakkumulation durch HMGB1 für die Immunzellrekrutierung bei der sterilen Entzündung

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist es, die molekularen Mechanismen hinter der sterilen Entzündung zu verstehen, um pharmakologisch eingreifen zu können. Gerade Damage-associated molecular patterns (DAMPs) triggern die sterile Entzündungsantwort und können in einem exzessiven Ausmaß zu Gewebsschäden bis zum Tod führen²¹⁵. HMGB1 als Prototyp eines DAMPs steht dabei im Fokus der aktuellen Forschung. Dass HMGB1 die sterile Entzündung verstärkt und auslöst wurde schon vielfach publiziert^{216,217}. In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich bei der Anwendung des Inhibitors BoxA ein starker Effekt auf die Monozyten. So konnten gesehen werden, dass schon eine geringe Anzahl an dieser Zellpopulation im Gefäß rekrutiert werden, die dann im Zuge dessen auch nicht ins Gewebe übertreten konnten. Es zeigte sich ebenso, dass die Monozyten in ihrer Migration sowohl im Milieu des Chemokingradienten, als auch im Bereich um die Nekrosezone in ihrer Bewegung eingeschränkt waren. Hierfür kann vermutet werden, dass BoxA die Wirkung von HMGB1 an seinen Rezeptoren (RAGE- oder TLR4-Rezeptor) unterbindet und so einen antiinflammatorischen Effekt hat. Die neutrophilen Granulozyten zeigten keine Veränderungen in der Zellzahl und auch in Ihrer Bewegung durch das Interstitium. Hier kann angenommen werden, dass BoxA keinen Effekt zeigt bzw. die

neutrophilen Granulozyten auf noch weitere Mediatoren im Milieu einer Entzündung zurückgreifen können. BoxA hat somit in diesem Modell der sterilen Inflammation einen selektiven Effekt auf die Rekrutierung von Monozyten, während neutrophile Granulozyten nicht beeinflusst werden.

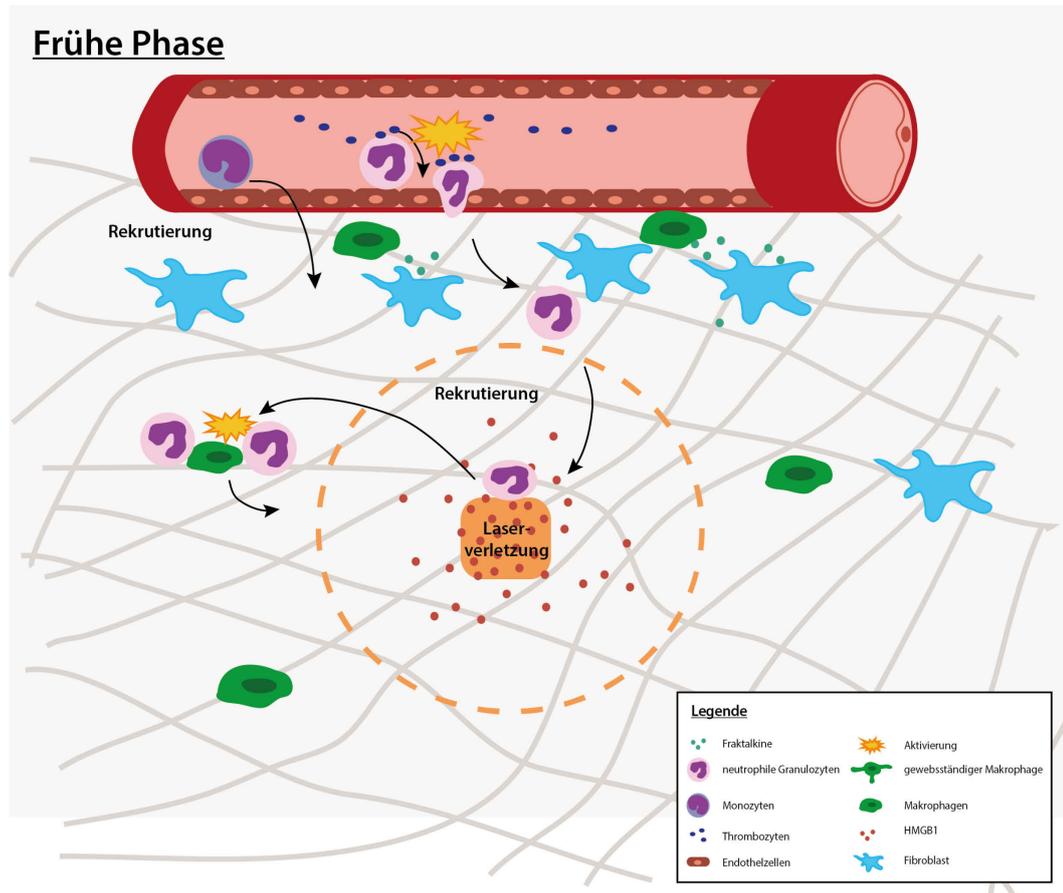


Abbildung 66: Zusammenspiel der myeloiden Leukozyten in der Frühphase der sterilen Inflammation

Freisetzung von DAMPs (HMGB1) nach Laser-Verletzung, welches eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten mittels Aktivierung der Thrombozyten zur Folge hat. Diese treten ins Gewebe über und aktivieren zum einen gewebsständige Makrophagen und bewirken auch eine Rekrutierung der Monozyten. Die Ausschüttung von HMGB1 bewirkt eine Freisetzung von CX3CL1 durch dermale Fibroblasten. Patrouillierende Monozyten werden durch die Freisetzung von HMGB1 ebenso zum Übertritt der Zellen ins Gewebe veranlasst.

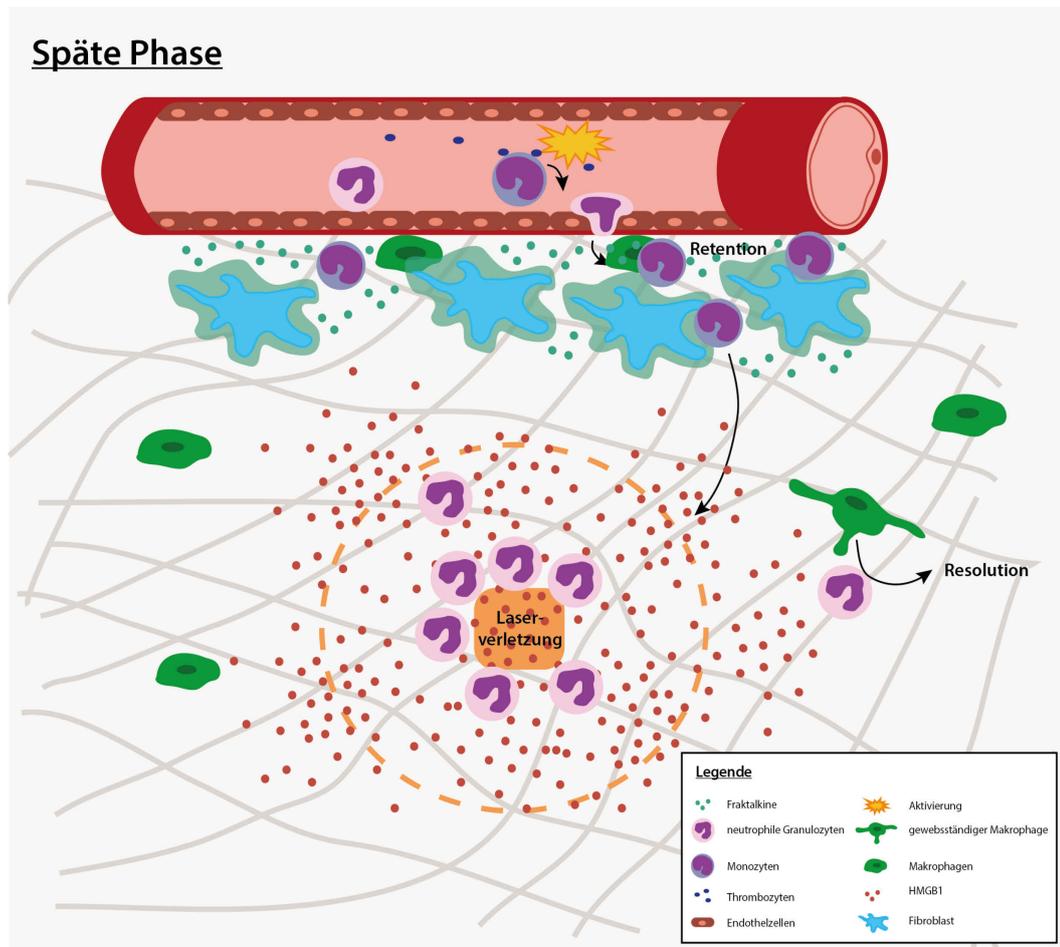


Abbildung 67: Zusammenspiel der myeloiden Leukozyten in der Spätphase der sterilen Inflammation

Die aktivierten Thrombozyten vermitteln einen vermehrten Übertritt an Monozyten ins Gewebe, die durch einen Chemokingradienten an CX3CL1 im Bereich der Austrittsstelle zurückgehalten werden bevor sie in Richtung Verletzung wandern. Gewebsmakrophagen bilden Ausläufer aus, die in Kontakt treten mit neutrophilen Granulozyten und leiten sie von der Verletzung fort, um die Entzündung zu kontrollieren und eine überschießende Entzündungsantwort zu vermeiden.

5. Ausblick

Es konnten zahlreiche Interaktionen der myeloiden Leukozyten im intravaskulären und interstitiellen Raum *in vivo* gezeigt und auf zellulärer Ebene charakterisiert werden. Die molekulare Mechanismen hinter der Migration und der wechselseitigen Beeinflussung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen im Gewebe sollte noch weiter analysiert werden. Hierfür sollten noch weitere *in vitro* Experimente durchgeführt werden, um die Mediatoren zu untersuchen, die bei einer Nekrose von den Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und den Monozyten/ Makrophagen ausgeschüttet werden. Interessant wäre auch diese darauf zu untersuchen, wie sie weiterer Zellen im Gewebe, wie z.B. die humanen Fibroblasten oder Perizyten dadurch beeinflussen können. Ein weiterer Aspekt läge in der Depletierung der Monozyten und Makrophagen im Gewebe, um deren Einfluss im Entzündungsgeschehen besser zu verstehen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Interaktionen von Monozyten/ Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten bei steriler Inflammation im Gewebe

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Interaktionen von Thrombozyten und myeloiden Zellen im intravaskulären und interstitiellen Raum *in vivo* bei steriler Inflammation untersucht. Diese Analysen fanden mittels intravitraler 2-Photonen Mikroskopie im Mausmodell statt. Im Ohrmodell wurde mit Hilfe eines Lasers eine Gewebsverletzung gesetzt, die eine sterile Entzündung erzeugt. In den postkapillären Venolen konnte gezeigt werden, dass durch den Laserstimulus eine Rekrutierung und enge Interaktion zwischen Plättchen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen ausgelöst wird. Innerhalb der postkapillären Venolen fördern kurzzeitige Kontakte zwischen Thrombozyten und myeloiden Leukozyten die Transmigration und Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten. Die beiden letzteren Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems beeinflussen sich auch gegenseitig und treten an bestimmten Stellen bevorzugt ins Gewebe über. Innerhalb des interstitiellen Gewebes konnten Bereiche definiert werden, in denen unterschiedliche Leukozytenmigrationsmuster, abhängig von der Entfernung zur Verletzung, stattfanden. Diese verschiedenen Bewegungsmuster zeigen sich auch auf zellulärer und molekularer Ebene. Die myeloiden Zellen wiesen in dem entfernteren Bereich um die Verletzung eine zielgerichtete Bewegung auf als in direkter Umgebung zur Nekrose. Dort zeigte sich eine ungerichtete Migration auf die Verletzung hin. Dies ist auch durch die Fraktalkin- Freisetzung der Fibroblasten beeinflusst, die Monozyten im Bereich der postkapillären Venolen zurück halten. Außerdem zeigte sich ein Einfluss des Danger- associated molecular patterns HMGB1 auf die Monozyten/Makrophagen, welches direkt um die Nekrosezone freigesetzt wird. Zudem setzen neutrophile Granulozyten Faktoren frei, die eine essentielle Rolle spielen für die Migration der Monozyten/ Makrophagen. Gewebsmakrophagen treten im interstitiellen Raum in Kontakt mit migrierenden neutrophilen Granulozyten und schwächen deren Reaktion. Dabei kommt es jedoch zu einer Aktivierung des Gewebsmakrophagen, die nach mehreren Kontakten mit neutrophilen Granulozyten beginnen sich zu bewegen. In dieser Arbeit konnten mehrere Interaktionen zwischen Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten/ Makrophagen während einer sterilen Entzündung entdeckt werden, die zu neuen Therapieansätzen für Krankheiten wie Trauma, Schlaganfall und Herzinfarkt führen könnten.

VIII. SUMMARY

Tissue interactions between monocytes/ macrophages, neutrophils and platelets in the background of sterile inflammation

This thesis investigated the mechanisms of platelet and myeloid leukocyte recruitment during sterile inflammation *in vivo*. Using intravital 2-photon microscopy in a mouse model of tissue injury we could show that there is a high degree of interdependence regarding the recruitment of platelets, neutrophils, and monocytes/macrophages. Within postcapillary venules, transient interactions between platelets and myeloid leukocytes promote the transmigration and activation of neutrophils and monocytes. These innate immune cells also interact and form sites for preferential transmigration across the endothelial cell layer into the interstitial space. Within the tissue, we could define areas of differential leukocyte migration depending on the distance from the injury and define cellular and molecular mechanisms involved. Specifically, myeloid leukocytes migrate more directed further away from the tissue injury and show a random migration pattern in close proximity of the necrosis. This is influenced by CX3CL1 released from perivascular fibroblasts, which retain monocytes around postcapillary venules. In addition, the danger associated molecular pattern HMGB1 released from necrotic cells regulates monocyte/macrophage migration, while neutrophil derived factors are essential mediators influencing monocytes/macrophages close to the focus of sterile inflammation. Tissue resident macrophages get into contact with neutrophils during interstitial migration and dampen the neutrophil response, while getting activated by sequential contacts to neutrophils and eventually starting to migrate. In summary, we could uncover a complex interplay between platelets, neutrophils, and monocytes/macrophages during sterile inflammation, which could lead to new therapeutic approaches for diseases like trauma, stroke, or myocardial infarction.

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius	bspw.	beispielsweise
3D	drei dimensional	bzw.	beziehungsweise
7AAD	7-Amino- Actinomycin	ca.	circa
AAALAC	Association for Assessment and Accreditation of Laboratory animal care International	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
Abb.	Abbildung	CD	Cluster of Differentiation
ADAM10	A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	cm	Zentimeter
AK	Antikörper	CPDA	Citrat-Phosphat- Dextrose-Adenin
ARDS	acute respiratory distress syndrom	CX3CL1	Fraktalkin
ATP	Adenosin-Tri- Phosphat	CX3CR1	Fraktalkinrezeptor
AUC	berechnete Gesamtfläche unter der Kurve (Area under the curve)	CXCR1	Chemokine (C-X-C motif) receptor= Interleukin-8 Rezeptor
BLAD	Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency	d.h.	das heißt
BM	Basalmembran	DAMPs	damage- associated molecular patterns
BSA	bovines Serumalbumin	Fa.	Firma
		FCS	fetale calf serum (fetales Kälberserum)
		fMLP	<i>N</i> - formyl- methionyl- leucyl- phenylalanine

g	Erdschwere- beschleunigung	LAD	leukocyte adhesion deficiencies
g	Gramm	LER	low expression regions (Regionen mit einer geringen Dichte an Extrazellulären Matrix Proteinen)
eGFP	verstärktes Grün fluoreszierendes Protein		
h	Stunde		
HEPA	High-Efficiency Particulate Air	LFA-1	lymphocyte function- associated antigen-1
HMGB1	High Mobility Group Box1	LPS	Lipopolysaccharide
i.p.	intraperitoneal	LTB4	Leukotriene B4
i.v.	intravenös	M.	Musculus (lat.)
ICAM-1	intrazelluläres Adäsionsmolekül-1 (inter- cellular adhesion molecule 1)	Mac-1	macrophages-1 antigen
		MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
IL	Interleukin	mg	Milligramm
IVC	individually ventilated cages	MHC	Haupthisto- kompatibilitäts- komplex (Major Histocompatibility Complex)
IVM	Intravital- Mikroskopie		
kg	Kilogramm		
ki	knock-in	MI	Index für die Zielgerichtetheit (Meandering Index)
KM	Knochenmark		
kond.	konditioniert	MIF	Makrophagen- Migrations- Inhibitions- Faktor

min	Minuten	PMN	Polymorphkernige neutrophile Leukozyten
mind.	mindestens		
mL	Milliliter	PRP	Thrombozyten- reiches- Plasma (platelets rich plasma)
mM	millimolar		
mm/s	Millimeter pro Sekunde		
ms	Millisekunde	PVEU	perivaskuläre Extravasations- einheit
MW	Mittelwert		
NaCl	Natriumchlorid	rcf	relative centrifugal force (relative Zentral- beschleunigung)
NAD	Nicotinamid- Adenin- Dinukleotid		
NK	natürliche Killerzelle	s	Sekunde
nm	Nanometer	s.c.	subkutan
NOD- like Rezeptor	nucleotide-binding oligomerization domain receptors	SD	Standardabweichun g (Standard derivation)
NZL	nekrotisches Zelllysät	SEM	Standardfehler (Standard error of the mean)
PBS	phosphate buffered saline	SPF	spezifisch- pathogen- frei
PE	Phycoerythrin	Tab.	Tabelle
PFA	Paraformaldehyd	TACE	TNF- α - converting enzyme
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- aktivität	TLR-7	Toll- like- Rezeptor-7
plt	Plättchen	TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha

V.	Vena (lat.)	z.B.	zum Beispiel
V.	Vena (lat.)	ZNS	Zentrales Nervensystem
VAA	vollständig antagonisierbare Anästhesie	μg μL	Mikrogramm Mikroliter
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1	μm μM	Mikrometer mikromolar
vs.	versus		
wt	Wildtyp		

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Nekrose mit der daraus resultierenden Entzündungsantwort	4
Abbildung 2: Struktur von HMGB1 mit seinen zwei DNA- bindenden Domänen BoxA und B und dem negativ geladenen Säureendstück.....	5
Abbildung 3: HMGB1 während der Entzündungsreaktion verursacht durch eine Nekrose.....	6
Abbildung 4: Ursprung und Differenzierungsschema der myeloiden Zellen	7
Abbildung 5: Das murine Monozyten- Kontinuum.....	9
Abbildung 6: Leukozyten Adhäsionskaskade während der Inflammation	15
Abbildung 7: Chemokinklassen mit ihren unterschiedlichen Rezeptoren.....	16
Abbildung 8: Rolle des Fraktalkins in der Adhäsionskaskade	17
Abbildung 9: Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten und Monozyten in der postkapillären Venole der Haut.....	19
Abbildung 10: Die perivaskuläre Extravasation bei der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten	21
Abbildung 11: Prinzip der Leukozyten-Substrat Interaktion	22
Abbildung 12: Die 3 Phasen der myeloiden Leukozytenrekrutierung in der Haut.....	23
Abbildung 13: Darstellung der anatomischen Strukturen am Mäuseschwanz.....	32
Abbildung 14: Durchführung des Femoraliskatheter mit seinen einzelnen Operationsschritten.....	33
Abbildung 15: Strukturformel von TRITC	38
Abbildung 16: Jablonski Diagramm A) und der Stokes Shift B)	39
Abbildung 17: Schematischer Aufbau des 2-Photonenmikroskops mit OPO	42
Abbildung 18: Prozess der in-vivo Datengewinnung bis zur Analyse.....	43
Abbildung 19: Darstellung des Sichtfeldes durch ein 2-Photonemikroskop.....	44
Abbildung 20: Darstellung der Displacement rate und dem Meandering Index.....	45
Abbildung 21: Ohrgestell für die Präparation und Aufbau des 2-Photonen Mikroskops.....	46
Abbildung 22: Schematischer Kurvenverlauf bei der Lichttransmissions- Aggregometrie nach Born	58
Abbildung 23: Darstellung der 2-Photonenmikroskopischen Analyse über den zu untersuchenden Zeitraum	64
Abbildung 24: Zeitverlauf der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten.....	65

Abbildung 25: Zeitverlauf der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im Gefäßsystem und im Gewebe.....	68
Abbildung 26: Zeitverlauf der Rekrutierung von Monozyten im Gefäßsystem und Gewebe abhängig von der Laser-Verletzung	70
Abbildung 27: Übersicht über Interaktionen von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten bei steriler Entzündung	72
Abbildung 28: Transiente Interaktionen der Thrombozyten mit neutrophilen Granulozyten im vaskulären Gefäßsystem.....	73
Abbildung 29: Kontakt transmigrierender Monozyt mit Plättchen.....	73
Abbildung 30: Gegenüberstellung Bereich vermehrter Zellaustritt vs. Ausschnitt mit geringem Zellaustritt	74
Abbildung 31: Migrationsweg eines neutrophilen Granulozyten, der in Kontakt mit einem perivaskulären Makrophagen tritt.....	75
Abbildung 32: Ausläuferbildung eines perivaskulärer Makrophagen, der in Kontakt mit einem neutrophilen Granulozyt tritt	76
Abbildung 33: intravaskuläre Interaktionen zwischen neutrophilen Granulozyten und Monozyten.....	76
Abbildung 34: Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, der beginnt sich nach Kontakt zu bewegen.....	77
Abbildung 35: Aggregometrie von Thrombozyten nach Stimulation mit nekrotischem Zelllysat.....	79
Abbildung 36: Zellzahlen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei Thrombozyten-depletierten Tieren vs. Kontrolle.....	80
Abbildung 37: Interstitielles Migrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten in der Abwesenheit von Thrombozyten	82
Abbildung 38: Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit zum Abstand vom Nekrosefokus bei der Depletion von Thrombozyten	83
Abbildung 39: Verhalten der Monozyten bei der Thrombozyten-Depletion	85
Abbildung 40: Verhalten der Monozyten bei Thrombozyten depletierten Tieren mit einem Gradienten.....	86
Abbildung 41: Monozytenrekrutierung über die Zeit bei neutrophilen Granulozyten depletierten Tieren.....	87
Abbildung 42: Monozytenrekrutierung im Gefäß und im Gewebe über die Zeit bei Depletion neutrophiler Granulozyten.....	89

Abbildung 43: Interstitielles Migrationsverhalten von Monozyten bei Depletion neutrophiler Granulozyten	91
Abbildung 44: Interstitielles Migrationsverhalten von Monozyten bei Depletion neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Entfernung zur Laser-Verletzung	92
Abbildung 45: Perivaskuläre Lokalisation von CX3CL1	94
Abbildung 46: Expression von verschiedenen Chemokinen auf humanen Fibroblasten bei steriler Inflammation	95
Abbildung 47: Fraktalkin im Überstand stimulierter humaner Fibroblasten	96
Abbildung 48: Rekrutierung myeloider Leukozyten in Abhängigkeit von Fraktalkin	97
Abbildung 49: Differenzierung des Effekts von CX3CR1 auf die intravaskuläre und interstitielle Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten	98
Abbildung 50: Rekrutierung von Monozyten im Zeitverlauf abhängig von CX3CR1	99
Abbildung 51: Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Zeitverlauf abhängig von CX3CR1	100
Abbildung 52: Rekrutierung von Monozyten über die Zeit im Gefäß oder im Gewebe abhängig von CX3CR1	102
Abbildung 53: Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Zeitverlauf im Gefäß oder im interstitiellen Raum abhängig von CX3CR1	104
Abbildung 54: Interstitielles Bewegungsmuster von Monozyten/Makrophagen in Abhängigkeit von CX3CR1 bei steriler Inflammation.....	106
Abbildung 55: Interstitielles Migrationsmuster von Monozyten/Makrophagen in Abhängigkeit vom Abstand zur Laser-Verletzung und der Unterscheidung in die Parameter Geschwindigkeit, Beweglichkeit und Zielgerichtetheit.....	108
Abbildung 56: Interstitielles Bewegungsmuster der neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit von CX3CR1 bei Laser-Verletzung.....	109
Abbildung 57: Interstitielles Bewegungsmuster neutrophiler Granulozyten abhängig von CX3CR1 mit Differenzierung abhängig von der Entfernung zur Laser-Verletzung	111
Abbildung 58: Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen in Abhängigkeit von HMGB1	113

Abbildung 59: Zellzahl an Monozyten, die unter Einfluss von BoxA im Gefäß und im Gewebe rekrutiert werden.....	114
Abbildung 60: Effekte von BoxA auf die interstitielle Monozytenmigration	116
Abbildung 61: Effekt von BoxA auf die interstitielle Migration von Monozyten/Makrophagen in Abhängigkeit zum Abstand zur Laserverletzung.....	117
Abbildung 62: Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten abhängig von HMGB1	118
Abbildung 63: Zellzahl an neutrophilen Granulozyten im Gefäß und im Gewebe unter Einfluss von BoxA.....	120
Abbildung 64: Effekt von BoxA auf die interstitielle Migration neutrophiler Granulozyten.....	122
Abbildung 65: Effekt von BoxA auf das interstitielle Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit zum Abstand zur Laserverletzung.....	123
Abbildung 66: Zusammenspiel der myeloiden Leukozyten in der Frühphase der sterilen Inflammation	133
Abbildung 67: Zusammenspiel der myeloiden Leukozyten in der Spätphase der sterilen Inflammation	134

XI. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Dosierung der vollständig antagonisierbaren Narkose bei der Maus ¹⁶⁷	36
Tabelle 2:	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe für die Gefäßdarstellung	37
Tabelle 3:	Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile der 2-Photonentechnik	41
Tabelle 4:	verwendete Antikörper (AK) für die Doppelfärbung des Whole Mount Stainings	51
Tabelle 5:	Primerauswahl für die real time-PCR	56
Tabelle 6:	C57BL6- Mäuse zur Durchführung der histologischen Färbung	59
Tabelle 7:	Untersuchung mittels ELISA auf Chemokine	59
Tabelle 8:	Untersuchung mittels rt-PCR auf Chemokine und deren Rezeptoren	59
Tabelle 9:	C57BL6- Tiere zur Durchführung der Aggregationsmessungen	59
Tabelle 10:	Fraktalkin-Tiere mit und ohne Laserverletzung	60
Tabelle 11:	Fraktalkin- Tiere zur Thrombozyten-Färbung	60
Tabelle 12:	Fraktalkin- Tiere zur Durchführung der Thrombozyten-Depletion	60
Tabelle 13:	LysM- Tiere zur Durchführung der Thrombozyten-Depletion	60
Tabelle 14:	Fraktalkin- Tiere zur Durchführung der Neutrophilen-Depletion	61
Tabelle 15:	Fraktalkin zur Untersuchung des CX3CR1- Rezeptors	61
Tabelle 16:	BoxA-Gruppe an LysM-Tieren	61
Tabelle 17:	BoxA-Gruppe an Fraktalkin-Tieren	61
Tabelle 18:	Zusammenfassung der statistische Werte der neutrophilen Granulozyten Gesamtzellzahl/ Gesichtsfeld mit vs. ohne Entzündungsreiz	66
Tabelle 19:	Zusammenfassung der statistische Werte der Monozyten Gesamtzellzahl/ Gesichtsfeld mit vs. ohne Entzündungsreiz	67
Tabelle 20:	Zusammenfassung der statistische Werte der neutrophilen Granulozyten/ Gesichtsfeld im Gefäß A) oder Gewebe B) mit vs. ohne Entzündungsreiz	69
Tabelle 21:	Zusammenfassung der statistische Werte der Monozyten/ Gesichtsfeld im Gefäß A) oder Gewebe B) mit vs. ohne Entzündungsreiz	71
Tabelle 22:	Statistische Werte der neutrophilen Granulozyten Zellzahl über die Zeit bei der Depletion der Thrombozyten vs. Kontrolle	81
Tabelle 23:	Statistische Werte der Monozyten über die Zeit bei der Depletion der Thrombozyten vs. Kontrolle	81

Tabelle 24: Statistische Werte der Monozytengesamtzahl über die Zeit bei Depletion der neutrophilen Granulozyten	88
Tabelle 25: Statistische Werte der Monozytenzahl im Gefäßsystem und Gewebe über die Zeit bei der Depletion der neutrophilen Granulozyten	90
Tabelle 26: Statistische Werte der Monozyten- und neutrophilen Granulozytenzahl im Gefäß und Gewebe über die Zeit bei der Untergliederung ohne (kiki) oder mit Fraktalkinrezeptor (kiwt)	101
Tabelle 27: Statistische Werte der Monozytenzahl im Gefäß und Gewebe über die Zeit bei der Untergliederung ohne (kiki) oder mit Fraktalkinrezeptor (kiwt)	103
Tabelle 28: Statistische Werte der neutrophilen Granulozytenanzahl im Gefäß und Gewebe über die Zeit bei der Untergliederung ohne (kiki) oder mit Fraktalkinrezeptor (kiwt)	105
Tabelle 29: Statistische Werte über die Zellzahl der Monozyten unter Einfluss von BoxA.....	113
Tabelle 30: Statistische Werte der Monozytenzahl im Gefäßsystem und Gewebe über die Zeit unter Einfluss von BoxA	115
Tabelle 31: Statistische Werte der Zellzahl neutrophiler Granulozyten unter Einfluss von BoxA.....	119
Tabelle 32: Statistische Werte neutrophiler Granulozyten im Gefäß und im Gewebe unter Einfluss von BoxA.....	121

XII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Rock, K.L., Latz, E., Ontiveros, F., Kono, H. The Sterile Inflammatory Response. In: Hrgs, Annual Review of Immunology, Vol 28. Annual Review of Immunology. 28. Palo Alto: Annual Reviews; 2010. S. 321-342.
2. von Brühl, M.-L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., Khandoga, A., Tirniceriu, A., Coletti, R., Köllnberger, M., Byrne, R.A., Laitinen, I., Walch, A., Brill, A., Pfeiler, S., Manukyan, D., Braun, S., Lange, P., Riegger, J., Ware, J., Eckart, A., Haidari, S., Rudelius, M., Schulz, C., Echtler, K., Brinkmann, V., Schwaiger, M., Preissner, K.T., Wagner, D.D., Mackman, N., Engelmann, B., Massberg, S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 209, S. 819-835 (2012).
3. Engelmann, B., Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, S. 34-45 (2013).
4. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, S. 991-1045 (1994).
5. Kono, H., Rock, K.L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8, S. 279-289 (2008).
6. Acha-Orbea, H., Godrick, E., Gold, M., McKay, D. Principles of innate and adaptive immunity. In: Hrgs, Janeway's Immunobiology. 888. 8th ed: Garland Science; 2011. S. 1-36.
7. Imhof, B.A., Aurrand-Lions, M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* 4, S. 432-444 (2004).
8. Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S. Robbins Pathologic Basis of Disease. Saunders W.B.; 1994. p. 6-11.
9. Chen, G.Y., Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10, S. 826-837 (2010).
10. Mbitikon-Kobo, F.M. Characterization of a CD44/CD122int memory CD8 T cell subset generated under sterile inflammatory conditions. *J Immunol* 182, S. 3846-3854 (2009).
11. Coussens, L.M., Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* 420, S. 860-867 (2002).
12. Weiner, H.L., Frenkel, D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nature Rev Immunol* 6, S. 404-416 (2006).
13. Ross, R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 340, S. 115-126 (1999).
14. Takeuchi, O., Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, S. 805-820 (2010).
15. Tsan, M.F., Gao, B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukocyte Biol* 76, S. 514-519 (2004).

16. Bianchi, M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukocyte Biol* 81, S. 1-5 (2006).
17. Janeway, C.A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54, S. 1-13 (1989).
18. Baumgärtner, W., Gruber, A.D. Entzündung. In: Hrgs, *Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin*. 180-221. Stuttgart: Enke Verlag; 2011. S. 375.
19. Dostert, C. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320, S. 674-677 (2008).
20. Scaffidi, P., Misteli, T., Bianchi, M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, S. 191-195 (2002).
21. Yu, M. HMGB1 signals through Toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 26, S. 174-179 (2006).
22. Hori, O. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 270, S. 25752-25761 (1995).
23. Tian, J. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nature Immunol* 8, S. 487-496 (2007).
24. Bours, M.J., Swennen, E.L., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., Dagnelie, P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112, S. 358-404 (2006).
25. Kono, H., Chen, C.J., Ontiveros, F., Rock, K.L. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *J Clin Invest* 120, S. 1939-1949 (2010).
26. Venereau, E., Schiraldi, M., Uguccioni, M., Bianchi, M.E. HMGB1 and leukocyte migration during trauma and sterile inflammation. *Mol Immunol* 55, S. 76-82 (2013).
27. Venereau, E., Casalgrandi, M., Schiraldi, M., Antoine, D.J., Cattaneo, A., De Marchis, F., Liu, J., Antonelli, A., Preti, A., Raeli, L., Shams, S.S., Yang, H., Varani, L., Andersson, U., Tracey, K.J., Bachi, A., Uguccioni, M., Bianchi, M.E. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *The Journal of Experimental Medicine* 209, S. 1519-1528 (2012).
28. Celona, B., Weiner, A., Di Felice, F., Mancuso, F.M., Cesarini, E., Rossi, R.L., Gregory, L., Baban, D., Rossetti, G., Grianti, P., Pagani, M., Bonaldi, T., Ragoussis, J., Friedman, N., Camilloni, G., Bianchi, M.E., Agresti, A. Substantial histone reduction modulates genomewide nucleosomal occupancy and global transcriptional output. *PLoS Biol* 9, S. e1001086 (2011).
29. Schiraldi, M., Raucci, A., Muñoz, L.M., Livoti, E., Celona, B., Venereau, E., Apuzzo, T., De Marchis, F., Pedotti, M., Bachi, A., Thelen, M., Varani, L., Mellado, M., Proudfoot, A., Bianchi, M.E., Uguccioni, M. HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *The Journal of Experimental Medicine* 209, S. 551-563 (2012).

30. Andersson, U., Tracey, K.J. HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. In: Hrgs, Annual Review of Immunology, Vol 29. Annual Review of Immunology. 29. Palo Alto: Annual Reviews; 2011. S. 139-162.
31. Tang, D., Kang, R., Zeh, H.J., 3rd, Lotze, M.T. High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxid Redox Signal* 14, S. 1315-1335 (2011).
32. Hoppe, G., Talcott, K.E., Bhattacharya, S.K., Crabb, J.W., Sears, J.E. Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgb1. *Exp Cell Res* 312, S. 3526-3538 (2006).
33. Yang, H., Hreggvidsdottir, H.S., Palmblad, K., Wang, H., Ochani, M., Li, J., Lu, B., Chavan, S., Rosas-Ballina, M., Al-Abed, Y., Akira, S., Bierhaus, A., Erlandsson-Harris, H., Andersson, U., Tracey, K.J. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, S. 11942-11947 (2010).
34. Pisetsky, D.S., Erlandsson-Harris, H., Andersson, U. High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 10, S. 209 (2008).
35. Kokkola, R., Li, J., Sundberg, E., Aveberger, A.C., Palmblad, K., Yang, H., Tracey, K.J., Andersson, U., Harris, H.E. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum* 48, S. 2052-2058 (2003).
36. Williams, M.J. Drosophila Hemopoiesis and Cellular Immunity. *The Journal of Immunology* 178, S. 4711-4716 (2007).
37. Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, S. 669-692 (2009).
38. Swirski, F.K. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, S. 612-616 (2009).
39. van Furth, R., Cohn, Z.A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128, S. 415-435 (1968).
40. Serbina, N.V., Pamer, E.G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunol* 7, S. 311-317 (2006).
41. Varol, C. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 204, S. 171-180 (2007).
42. Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., Muller, W.A. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11, S. 753-761 (1999).
43. Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, S. 71-82 (2003).
44. Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., Pamer, E.G. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26, S. 421-452 (2008).

45. Saha, P., Geissmann, F. Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunol Cell Biol* 89, S. 2-4 (2011).
46. Woollard, K.J., Geissmann, F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature Rev Cardiol* 7, S. 77-86 (2010).
47. Shi, C., Pamer, E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11, S. 762-774 (2011).
48. Peranzoni, E. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* 22, S. 238-244 (2010).
49. Palframan, R.T. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* 194, S. 1361-1373 (2001).
50. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81, S. 584-592 (2007).
51. Ziegler-Heitbrock, L. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, S. e74-e80 (2010).
52. Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, David A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* 38, S. 79-91 (2013).
53. Auffray, C. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, S. 666-670 (2007).
54. Ginhoux, F., Jung, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, S. 392-404 (2014).
55. Nahrendorf, M. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204, S. 3037-3047 (2007).
56. Carlin, L.M., Stamatiades, E.G., Auffray, C., Hanna, R.N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., Hedrick, C.C., Cook, H.T., Diebold, S., Geissmann, F. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* 153, S. 362-375 (2013).
57. Santiago-Raber, M.-L., Amano, H., Amano, E., Baudino, L., Otani, M., Lin, Q., Nimmerjahn, F., Verbeek, J.S., Ravetch, J.V., Takasaki, Y., Hirose, S., Izui, S. Fcγ receptor-dependent expansion of a hyperactive monocyte subset in lupus-prone mice. *Arthritis Rheum* 60, S. 2408-2417 (2009).
58. Belge, K.U. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168, S. 3536-3542 (2002).
59. Grage-Griebenow, E., Flad, H.D., Ernst, M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 69, S. 11-20 (2001).
60. Ingersoll, M.A. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115, S. e10-e19 (2010).

61. Napoli, C. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 100, S. 2680-2690 (1997).
62. Nahrendorf, M., Pittet, M.J., Swirski, F.K. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* 121, S. 2437-2445 (2010).
63. Shizuo, A., Nunez, G., Rosenstiel, P., Tenner, A. Innate Immunity: The first lines of defense. In: Hrgs, Janeway's immunobiology. 888. 8th ed: Garland Science; 2011. S. 37- 73.
64. Malissen, B., Tamoutounour, S., Henri, S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol* 14, S. 417-428 (2014).
65. Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33, S. 657-670 (2010).
66. Hager, M., Cowland, J.B., Borregaard, N. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med* 268, S. 25-34 (2010).
67. Galli, S.J., Borregaard, N., Wynn, T.A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunol* 12, S. 1035-1044 (2011).
68. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, S. 1532-1535 (2004).
69. Phillipson, M., Kubes, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 17, S. 1381-1390 (2011).
70. Summers, C., Rankin, S.M., Condliffe, A.M., Singh, N., Peters, A.M., Chilvers, E.R. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31, S. 318-324 (2010).
71. Peters, A.M. Just how big is the pulmonary granulocyte pool? *Clin Sci (Lond)* 94, S. 7-19 (1998).
72. Borregaard, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33, S. 657-670 (2010).
73. Pillay, J. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116, S. 625-627 (2010).
74. Kolaczkowska, E., Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13, S. 159-175 (2013).
75. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, S. 678-689 (2007).
76. Chertov, O., Ueda, H., Xu, L.L., Tani, K., Murphy, W.J., Wang, J.M., Howard, O.M.Z., Sayers, T.J., Oppenheim, J.J. Identification of Human Neutrophil-derived Cathepsin G and Azurocidin/CAP37 as Chemoattractants for Mononuclear Cells and Neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine* 186, S. 739-747 (1997).

77. Territo, M.C., Ganz, T., Selsted, M.E., Lehrer, R. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation* 84, S. 2017-2020 (1989).
78. Ng, L.G., Qin, J.S., Roediger, B., Wang, Y., Jain, R., Cavanagh, L.L., Smith, A.L., Jones, C.A., de Veer, M., Grimbaldston, M.A., Meeusen, E.N., Weninger, W. Visualizing the Neutrophil Response to Sterile Tissue Injury in Mouse Dermis Reveals a Three-Phase Cascade of Events. *J Invest Dermatol* 131, S. 2058-2068 (2011).
79. Smith, J.A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56, S. 672-686 (1994).
80. Segel, G.B., Halterman, M.W., Lichtman, M.A. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol* 89, S. 359-372 (2011).
81. Gaudry, M., Brégerie, O., Andrieu, V., El Benna, J., Pocardalo, M.-A., Hakim, J. Intracellular Pool of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Neutrophils (1997).
82. Ardi, V.C., Kupriyanova, T.A., Deryugina, E.I., Quigley, J.P. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, S. 20262-20267 (2007).
83. Thon, J.N., Italiano, J.E. Platelet formation. *Semin. Hematol* 47, S. 220-226 (2010).
84. Patel, S.R. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* 106, S. 4076-4085 (2005).
85. Kaushansky, K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med* 354, S. 2034-2045 (2006).
86. Semple, J.W., Italiano, J.E., Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology* 11, S. 264-274 (2011).
87. Rendu, F., Brohard-Bohn, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 12, S. 261-273 (2001).
88. Malissen, B., Reinherz, E., Stanfield, R., Wilson, I. The induced responses of innate immunity. In: Hrgs, Janeway's immunobiology. 888. 8th ed: Garland Science; 2011. S. 75- 122.
89. Duerschmied, D., Suidan, G.L., Demers, M., Herr, N., Carbo, C., Brill, A., Cifuni, S.M., Mauler, M., Cicko, S., Bader, M., Idzko, M., Bode, C., Wagner, D.D. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* 121, S. 1008-1015 (2013).
90. Jenne, C.N., Urrutia, R., Kubes, P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *International Journal of Laboratory Hematology* 35, S. 254-261 (2013).
91. Postea, O., Vasina, E.M., Cauwenberghs, S., Projahn, D., Liehn, E.A., Lievens, D., Theelen, W., Kramp, B.K., Butoi, E.D., Soehnlein, O., Heemskerk, J.W.M., Ludwig, A., Weber, C., Koenen, R.R. Contribution of Platelet CX3CR1 to Platelet-Monocyte Complex Formation and Vascular Recruitment During Hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, S. 1186-1193 (2012).

92. Projahn, D., Koenen, R.R. Platelets: key players in vascular inflammation. *J Leukoc Biol* 92, S. 1167-1175 (2012).
93. Aslam, R. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-[alpha] production in vivo. *Blood* 107, S. 637-641 (2006).
94. Semple, J.W., Aslam, R., Kim, M., Speck, E.R., Freedman, J. Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. *Blood* 109, S. 4803-4805 (2007).
95. Ståhl, A.L. Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets via TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood* 108, S. 167-176 (2006).
96. Grommes, J., Soehnlein, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med* 17, S. 293-307 (2011).
97. Zarbock, A., Singbartl, K., Ley, K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest* 116, S. 3211-3219 (2006).
98. Boilard, E. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 327, S. 580-583 (2010).
99. von Bruhl, M.L. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 209, S. 819-835 (2012).
100. Stark, K., Eckart, A., Haidari, S., Tirniceriu, A., Lorenz, M., von Bruhl, M.-L., Gartner, F., Khandoga, A.G., Legate, K.R., Pless, R., Hepper, I., Lauber, K., Walzog, B., Massberg, S. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol* 14, S. 41-51 (2013).
101. Nourshargh, S., Hordijk, P.L., Sixt, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, S. 366-378 (2010).
102. Hynes, R.O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 110, S. 673-687 (2002).
103. Shattil, S.J., Kim, C., Ginsberg, M.H. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, S. 288-300 (2010).
104. Alon, R., Kassner, P.D., Carr, M.W., Finger, E.B., Hemler, M.E., Springer, T.A. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *The Journal of Cell Biology* 128, S. 1243-1253 (1995).
105. Dunne, J.L., Collins, R.G., Beaudet, A.L., Ballantyne, C.M., Ley, K. Mac-1, but Not LFA-1, Uses Intercellular Adhesion Molecule-1 to Mediate Slow Leukocyte Rolling in TNF- α -Induced Inflammation. *The Journal of Immunology* 171, S. 6105-6111 (2003).
106. Schmidt, S., Moser, M., Sperandio, M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol Immunol* 55, S. 49-58 (2013).

107. Hagemoser, W.A., Roth, J.A., Lofstedt, J., Fagerland, J.A. Granulocytopeny in a Holstein heifer. *J Am Vet Med Assoc* 183, S. 1093-1094 (1983).
108. Nagahata, H. Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD): A Review. *J Vet Med Sci* 66, S. 1475-1482 (2004).
109. Rot, A., von Andrian, U.H. Chemokines in Innate and Adaptive Host Defense: Basic Chemokine Grammar for Immune Cells. *Annu Rev Immunol* 22, S. 891-928 (2004).
110. Luster, A.D. Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *N Engl J Med* 338, S. 436-445 (1998).
111. Pierce, K.L., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, S. 639-650 (2002).
112. Rollins, B.J. Chemokines. *Blood* 90, S. 909-928 (1997).
113. Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. Human Chemokines: An Update. *Annu Rev Immunol* 15, S. 675-705 (1997).
114. Rollins, B.J., Pober, J.S. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am J Pathol* 138, S. 1315-1319 (1991).
115. B, M., P, L. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2, S. 123 (2001).
116. A, Z., O, Y. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, S. 121 (2000).
117. Charo, I.F., Ransohoff, R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354, S. 610-621 (2006).
118. Raport, C.J., Gosling, J., Schweickart, V.L., Gray, P.W., Charo, I.F. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 β , and MIP-1 α . *J Biol Chem* 271, S. 17161-17166 (1996).
119. Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., Schall, T.J. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385, S. 640-644 (1997).
120. Pan, Y., Lloyd, C., Zhou, H., Dolich, S., Deeds, J., Gonzalo, J.-A., Vath, J., Gosselin, M., Ma, J., Dussault, B., Woolf, E., Alperin, G., Culpepper, J., Gutierrez-Ramos, J.C., Gearing, D. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387, S. 611-617 (1997).
121. Umehara, H., Bloom, E.T., Okazaki, T., Nagano, Y., Yoshie, O., Imai, T. Fractalkine in Vascular Biology: From Basic Research to Clinical Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, S. 34-40 (2004).
122. Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiyama, H., Schall, T.J., Yoshie, O. Identification and Molecular Characterization of Fractalkine Receptor CX3CR1, which Mediates Both Leukocyte Migration and Adhesion. *Cell* 91, S. 521-530 (1997).

123. Garton, K.J., Gough, P.J., Blobel, C.P., Murphy, G., Greaves, D.R., Dempsey, P.J., Raines, E.W. Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme (ADAM17) Mediates the Cleavage and Shedding of Fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 276, S. 37993-38001 (2001).
124. Tsou, C.-L., Haskell, C.A., Charo, I.F. Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme Mediates the Inducible Cleavage of Fractalkine. *J Biol Chem* 276, S. 44622-44626 (2001).
125. Goda, S., Imai, T., Yoshie, O., Yoneda, O., Inoue, H., Nagano, Y., Okazaki, T., Imai, H., Bloom, E.T., Domae, N., Umehara, H. CX3C-Chemokine, Fractalkine-Enhanced Adhesion of THP-1 Cells to Endothelial Cells Through Integrin-Dependent and -Independent Mechanisms. *The Journal of Immunology* 164, S. 4313-4320 (2000).
126. Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S.K., Lusciuskas, F.W., Gabuzda, D. Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16+ Monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 197, S. 1701-1707 (2003).
127. Jones, B.A., Beamer, M., Ahmed, S. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv* 10, S. 263-270 (2010).
128. Weninger, W., Ulfman, L.H., Cheng, G., Souchkova, N., Quackenbush, E.J., Lowe, J.B., von Andrian, U.H. Specialized Contributions by $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase-IV and FucT-VII during Leukocyte Rolling in Dermal Microvessels. *Immunity* 12, S. 665-676 (2000).
129. Hickey, M.J., Kubes, P. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat Rev Immunol* 9, S. 364-375 (2009).
130. Friedl, P., Weigelin, B. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol* 9, S. 960-969 (2008).
131. Jain, R., Weninger, W. Shedding light on cutaneous innate immune responses: the intravital microscopy approach. *Immunol Cell Biol* 91, S. 263-270 (2013).
132. Coombes, J.L., Robey, E.A. Dynamic imaging of host-pathogen interactions in vivo. *Nat Rev Immunol* 10, S. 353-364 (2010).
133. Germain, R.N., Robey, E.A., Cahalan, M.D. A Decade of Imaging Cellular Motility and Interaction Dynamics in the Immune System. *Science* 336, S. 1676-1681 (2012).
134. Lammermann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Worbs, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Forster, R., Critchley, D.R., Fassler, R., Sixt, M. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453, S. 51-55 (2008).
135. Weninger, W., Biro, M., Jain, R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat Rev Immunol* 14, S. 232-246 (2014).
136. Shepro, D., Morel, N.M. Pericyte physiology. *The FASEB Journal* 7, S. 1031-1038 (1993).

137. Proebstl, D., Voisin, M.-B., Woodfin, A., Whiteford, J., D'Acquisto, F., Jones, G.E., Rowe, D., Nourshargh, S. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 209, S. 1219-1234 (2012).
138. Hyun, Y.-M., Sumagin, R., Sarangi, P.P., Lomakina, E., Overstreet, M.G., Baker, C.M., Fowell, D.J., Waugh, R.E., Sarelius, I.H., Kim, M. Uropod elongation is a common final step in leukocyte extravasation through inflamed vessels. *The Journal of Experimental Medicine* 209, S. 1349-1362 (2012).
139. Sontheimer, R.D. Perivascular dendritic macrophages as immunobiological constituents of the human dermal microvascular unit. *J Invest Dermatol* 93, S. 96-101 (1989).
140. Abtin, A., Jain, R., Mitchell, A.J., Roediger, B., Brzoska, A.J., Tikoo, S., Cheng, Q., Ng, L.G., Cavanagh, L.L., von Andrian, U.H., Hickey, M.J., Firth, N., Weninger, W. Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection. *Nat Immunol* 15, S. 45-53 (2014).
141. Woodfin, A., Voisin, M.-B., Beyrau, M., Colom, B., Caille, D., Diapouli, F.-M., Nash, G.B., Chavakis, T., Albelda, S.M., Rainger, G.E., Meda, P., Imhof, B.A., Nourshargh, S. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol* 12, S. 761-769 (2011).
142. Abraham, S.N., St. John, A.L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 10, S. 440-452 (2010).
143. Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, B.N.V., Zbytnuik, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., Malawista, S.E., de Boisleury Chevance, A., Zhang, K., Conly, J., Kubes, P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med advance online publication* (2012).
144. McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G.B., Hirota, S.A., Slaba, I., Waterhouse, C.C.M., Beck, P.L., Muruve, D.A., Kubes, P. Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation. *Science* 330, S. 362-366 (2010).
145. Lammermann, T., Afonso, P.V., Angermann, B.R., Wang, J.M., Kastenmuller, W., Parent, C.A., Germain, R.N. Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature* 498, S. 371-375 (2013).
146. Chtanova, T., Schaeffer, M., Han, S.-J., van Dooren, G.G., Nollmann, M., Herzmark, P., Chan, S.W., Satija, H., Camfield, K., Aaron, H., Striepen, B., Robey, E.A. Dynamics of Neutrophil Migration in Lymph Nodes during Infection. *Immunity* 29, S. 487-496 (2008).
147. Sun, H.W., Bernhagen, J., Bucala, R., Lolis, E. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, S. 5191-5196 (1996).
148. Partida-Sanchez, S., Cockayne, D.A., Monard, S., Jacobson, E.L., Oppenheimer, N., Garvy, B., Kusser, K., Goodrich, S., Howard, M., Harmsen, A., Randall, T.D., Lund, F.E. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is

- required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med* 7, S. 1209-1216 (2001).
149. Baez, S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res* 5, S. 384-394 (1973).
150. Ng, L.G., Hsu, A., Mandell, M.A., Roediger, B., Hoeller, C., Mrass, P., Iparraguirre, A., Cavanagh, L.L., Triccas, J.A., Beverley, S.M., Scott, P., Weninger, W. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog* 4, S. e1000222 (2008).
151. Khandoga, A.G., Khandoga, A., Reichel, C.A., Bihari, P., Rehberg, M., Krombach, F. In vivo imaging and quantitative analysis of leukocyte directional migration and polarization in inflamed tissue. *PLoS ONE* 4, S. e4693 (2009).
152. Roediger, B., Ng, L., Smith, A., de St Groth, B., Weninger, W. Visualizing dendritic cell migration within the skin. *Histochem Cell Biol* 130, S. 1131-1146 (2008).
153. Hoeller, C., Richardson, S.K., Ng, L.G., Valero, T., Wysocka, M., Rook, A.H., Weninger, W. In vivo Imaging of Cutaneous T-Cell Lymphoma Migration to the Skin. *Cancer Res* 69, S. 2704-2708 (2009).
154. Sumaria, N., Roediger, B., Ng, L.G., Qin, J., Pinto, R., Cavanagh, L.L., Shklovskaya, E., Fazekas de St. Groth, B., Triccas, J.A., Weninger, W. Cutaneous immunosurveillance by self-renewing dermal $\gamma\delta$ T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 208, S. 505-518 (2011).
155. Hickman, H.D., Bennink, J.R., Yewdell, J.W. Caught in the Act: Intravital Multiphoton Microscopy of Host-Pathogen Interactions. *Cell Host Microbe* 5, S. 13-21 (2009).
156. Hierck, B.P., Iperen, L.V., Gittenberger-De Groot, A.C., Poelmann, R.E. Modified indirect immunodetection allows study of murine tissue with mouse monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 42, S. 1499-1502 (1994).
157. Belkaid, Y., Jouin, H., Milon, G. A method to recover, enumerate and identify lymphomyeloid cells present in an inflammatory dermal site: a study in laboratory mice. *J Immunol Methods* 199, S. 5-25 (1996).
158. Helft, J., Merad, M. Isolation of cutaneous dendritic cells. *Methods Mol Biol* 595, S. 231-233 (2010).
159. Li, J.L., Goh, C.C., Keeble, J.L., Qin, J.S., Roediger, B., Jain, R., Wang, Y., Chew, W.K., Weninger, W., Ng, L.G. Intravital multiphoton imaging of immune responses in the mouse ear skin. *Nat Protocols* 7, S. 221-234 (2012).
160. Solas, G.-. Tiergerechte Haltung: Labormäuse [Zugriff am 18.05.2014]. verfügbar unter: http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publikation/hal_maushaltung.pdf.
161. Laboratory, J. JAX Mice Database - 000664 C57BL/6J [Zugriff am 25.06.2014]. verfügbar unter: <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>.
162. Faust, N., Varas, F., Kelly, L.M., Heck, S., Graf, T. Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* 96, S. 719-726 (2000).

163. Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., Littman, D.R. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20, S. 4106-4114 (2000).
164. Ehrhardt, W., Henke, J., Haberstroh, J. Präanästhetische Untersuchung und Einschätzung der Anästhesiefähigkeit. In: Hrgs, Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2004. S. 281-307.
165. Löscher, W. Pharmaka mit Wirkung auf das Zentralnervensystem. In: Hrgs, Pharmakotherapie bei Haus - und Nutztieren. Stuttgart: Enke Verlag; 2010. S. 64- 131.
166. Cruz, J.I., Loste, J.M., Burzaco, O.H. Observations on the use of medetomidine/ketamine and its reversal with atipamezole for chemical restraint in the mouse. *Lab Anim* 32, S. 18-22 (1998).
167. Ehrhardt, W., Henke, J., Kroker, R. Pharmaka im Rahmen der Anästhesie und der perioperativen Schmerzlinderung. In: Hrgs, Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2004. S. 15- 138.
168. Technologies, L. Dextran, Tetramethylrhodamine, 2.000.000 MW, Lysine Fixable [Zugriff am 15.06.2014]. verfügbar unter: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/D7139>.
169. Cahalan, M.D., Parker, I., Wei, S.H., Miller, M.J. Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nat Rev Immunol* 2, S. 872-880 (2002).
170. Grzybowski, A., Pietrzak, K. Maria Goepfert-Mayer (1906–1972): Two-photon effect on dermatology. *Clin Dermatol* 31, S. 221-225 (2013).
171. Denk, W., Strickler, J.H., Webb, W.W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, S. 73-76 (1990).
172. Potter, S.M. Vital imaging: Two photons are better than one. *Curr Biol* 6, S. 1595-1598 (1996).
173. Helmchen, F., Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Meth* 2, S. 932-940 (2005).
174. Oheim, M., Michael, D.J., Geisbauer, M., Madsen, D., Chow, R.H. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, S. 788-808 (2006).
175. Volgger, M.M. Lichtmikroskop -Theorie und Anwendung- Wien2008 [Zugriff am 15.06.2014]. verfügbar unter: <http://www.univie.ac.at/mikroskopie/>.
176. Drobizhev, M., Makarov, N.S., Tillo, S.E., Hughes, T.E., Rebane, A. Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nat Meth* 8, S. 393-399 (2011).
177. Oheim, M., Beaupaire, E., Chaigneau, E., Mertz, J., Charpak, S. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *J*

- Neurosci Methods 111, S. 29-37 (2001).
178. Mohler, W., Millard, A.C., Campagnola, P.J. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods* 29, S. 97-109 (2003).
179. Campagnola, P.J., Loew, L.M. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nat Biotech* 21, S. 1356-1360 (2003).
180. Herz, J., Siffrin, V., Hauser, A.E., Brandt, A.U., Leuenberger, T., Radbruch, H., Zipp, F., Niesner, R.A. Expanding Two-Photon Intravital Microscopy to the Infrared by Means of Optical Parametric Oscillator. *Biophys J* 98, S. 715-723 (2010).
181. Sumen, C., Mempel, T.R., Mazo, I.B., von Andrian, U.H. Intravital Microscopy: Visualizing Immunity in Context. *Immunity* 21, S. 315-329 (2004).
182. Beltman, J.B., Maree, A.F.M., de Boer, R.J. Analysing immune cell migration. *Nat Rev Immunol* 9, S. 789-798 (2009).
183. Benhamou, S. How to reliably estimate the tortuosity of an animal's path:: straightness, sinuosity, or fractal dimension? *J Theor Biol* 229, S. 209-220 (2004).
184. Daley, J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S., Albina, J.E. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 83, S. 64-70 (2008).
185. analytics, e. Product Info and Order Antibodies for Platelet Depletion in Mice [Zugriff am 13.06.2014]. verfügbar unter: http://www.emfret.com/uploads/tx_beproducts/R300_plt_depletion.pdf.
186. analytics, e. Product Info and Order negativ control polyclonal non-immune rat immunoglobulins [Zugriff am 13.06.2014]. verfügbar unter: http://www.emfret.com/uploads/tx_beproducts/C301_control_igG.pdf.
187. Sitia, G., Iannacone, M., Muller, S., Bianchi, M.E., Guidotti, L.G. Treatment with HMGB1 inhibitors diminishes CTL-induced liver disease in HBV transgenic mice. *J Leukoc Biol* 81, S. 100-107 (2007).
188. Yang, H., Ochani, M., Li, J., Qiang, X., Tanovic, M., Harris, H.E., Susarla, S.M., Ulloa, L., Wang, H., DiRaimo, R., Czura, C.J., Wang, H., Roth, J., Warren, H.S., Fink, M.P., Fenton, M.J., Andersson, U., Tracey, K.J. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, S. 296-301 (2004).
189. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D. Quantitative Immunoassays. In: Hrgs, *Der Experimentator Immunologie*. 304. 3 ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2009. S. 107-134.
190. Li, M., Carpio, D.F., Zheng, Y., Bruzzo, P., Singh, V., Ouaz, F., Medzhitov, R.M., Beg, A.A. An Essential Role of the NF- κ B/Toll-Like Receptor Pathway in Induction of Inflammatory and Tissue-Repair Gene Expression by Necrotic Cells. *The Journal of Immunology* 166, S. 7128-7135 (2001).

191. Gawaz, M. Blood platelets- Physiology, Pathophysiology, Membrane Receptors, Antiplatelet Principles, and Therapy for atherothrombotic disease (Thieme Verlag, Stuttgart, 2001).
192. Bland, M. Comparing the means of small samples. In: Hrgs, An introduction to medical statistics 424 pages. Third edition ed. Oxford, U.S.A.: Oxford University Press; 2009. S. 156-184.
193. Nakagawa, S., Cuthill, I.C. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biological Reviews* 82, S. 591-605 (2007).
194. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, S. 402-408 (2001).
195. Schymeinsky, J., Sperandio, M., Walzog, B. The mammalian actin-binding protein 1 (mAbp1): a novel molecular player in leukocyte biology. *Trends Cell Biol* 21, S. 247-255 (2011).
196. Soehnlein, O., Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10, S. 427-439 (2010).
197. Maugeri, N., Baldini, M., Ramirez, G.A., Rovere-Querini, P., Manfredi, A.A. Platelet-leukocyte deregulated interactions foster sterile inflammation and tissue damage in immune-mediated vessel diseases. *Thromb Res* 129, S. 267-273 (2012).
198. Wagner, D.D., Frenette, P.S. The vessel wall and its interactions 2008).
199. Sreeramkumar, V., Adrover, J.M., Ballesteros, I., Cuartero, M.I., Rossaint, J., Bilbao, I., Náchter, M., Pitaval, C., Radovanovic, I., Fukui, Y., McEver, R.P., Filippi, M.-D., Lizasoain, I., Ruiz-Cabello, J., Zarbock, A., Moro, M.A., Hidalgo, A. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 346, S. 1234-1238 (2014).
200. Fahy, O.L., Coates, N.J., McColl, S.R. Inhibition of cytokine-induced fractalkine production by bacterial invasion of human-dermal fibroblasts. *Lab Invest* 83, S. 721-730 (2003).
201. Chapman, G.A., Moores, K.E., Gohil, J., Berkhout, T.A., Patel, L., Green, P., Macphée, C.H., Stewart, B.R. The role of fractalkine in the recruitment of monocytes to the endothelium. *Eur J Pharmacol* 392, S. 189-195 (2000).
202. Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zernecke, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S.R., Bucala, R., Hickey, M.J., Weber, C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 13, S. 587-596 (2007).
203. Hungerford, J.E., Sessa, W.C., Segal, S.S. Vasomotor control in arterioles of the mouse cremaster muscle. *The FASEB Journal* 14, S. 197-207 (2000).
204. McDonald, B., Kubes, P. Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. *J Mol Med* 89, S. 1079-1088 (2011).

205. Foxman, E.F., Campbell, J.J., Butcher, E.C. Multistep Navigation and the Combinatorial Control of Leukocyte Chemotaxis. *The Journal of Cell Biology* 139, S. 1349-1360 (1997).
206. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, S. 173-182 (2006).
207. El Mezayen, R., El Gazzar, M., Seeds, M.C., McCall, C.E., Dreskin, S.C., Nicolls, M.R. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol Lett* 111, S. 36-44 (2007).
208. Weyrich, A.S., McIntyre, T.M., McEver, R.P., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *The Journal of Clinical Investigation* 95, S. 2297-2303 (1995).
209. Voisin, M.B., Nourshargh, S. Neutrophil Transmigration: Emergence of an Adhesive Cascade within Venular Walls. *J Innate Immun* 5, S. 336-347 (2013).
210. Voisin, M.B., Woodfin, A., Nourshargh, S. Monocytes and neutrophils exhibit both distinct and common mechanisms in penetrating the vascular basement membrane in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, S. 1193-1199 (2009).
211. Voisin, M.B., Proebstl, D., Nourshargh, S. Venular basement membranes ubiquitously express matrix protein low expression regions: characterisation in multiple tissues and remodelling during inflammation. *Am J Pathol* 176, S. 482-495 (2010).
212. Wang, S. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J Exp Med* 203, S. 1519-1532 (2006).
213. Greaves, D.R., Häkkinen, T., Lucas, A.D., Liddiard, K., Jones, E., Quinn, C.M., Senaratne, J., Green, F.R., Tyson, K., Boyle, J., Shanahan, C., Weissberg, P.L., Gordon, S., Ylä-Herttualla, S. Linked Chromosome 16q13 Chemokines, Macrophage-Derived Chemokine, Fractalkine, and Thymus- and Activation-Regulated Chemokine, Are Expressed in Human Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, S. 923-929 (2001).
214. Lesnik, P., Haskell, C.A., Charo, I.F. Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 111, S. 333-340 (2003).
215. Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., Krysko, Dmitri V. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity* 38, S. 209-223 (2013).
216. Bianchi, M.E. HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol* 86, S. 573-576 (2009).
217. Hreggvidsdottir, H.S., Östberg, T., Wähämaa, H., Schierbeck, H., Aveberger, A.-C., Klevenvall, L., Palmblad, K., Ottosson, L., Andersson, U., Harris, H.E. The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *J Leukoc Biol* 86, S. 655-662 (2009).

XIII. ANHANG

Im Rahmen des IRTG (Integrated Research Training Group) des SFB 914 „Trafficking of Immune Cells in Inflammation, Development and Disease“ wurden teilweise die Daten als Posterpräsentation „Recruitment of monocytes to sterile inflammation-The role of fractalkine-“, im Wintersymposium des SFB 914 in Obergurgl vorgestellt. Zusätzlich fand ein Vortrag „Recruitment of neutrophils to sterile inflammation- The role of HMGB1-“ im Rahmen eines Retreats am Comer See (21- 24.10.2013) statt.

XIV. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg bedanken, unter deren Leitung ich die Möglichkeit erhalten habe diese Arbeit angefertigt zu dürfen. Ebenso für seine kompetente wissenschaftliche Betreuung.

Für die Übernahme der vorliegenden Dissertation, deren Durchsicht und Einreichung an der Tiermedizinischen Fakultät der LMU München möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Thomas Göbel bedanken.

Bei Herrn Dr. med. Konstantin Stark möchte ich mich ganz besonders bedanken. Sein Engagement und Enthusiasmus hat mir ermöglicht diese wissenschaftlich interessante Arbeit anzufertigen und Freude am wissenschaftlichen Arbeiten vermittelt. Außerdem für sein kompetentes, wissenschaftlich- fundiertes Wissen mit dem er mir jederzeit konstruktiv zur Seite stand und durch seine Ideen und Gedanken dem Thema immer neue Impulse gesetzt hat.

Ganz herzlich möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Massberg bedanken, in der jeder seinen Teil zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Einige Menschen möchte ich nochmals besonders hervorheben. Zuerst möchte ich besonders Dr. med. vet. Annekathrin Eckart erwähnen: für ihre äußerst kompetente Einarbeitung, Ihre Bereitschaft und positiven Einstellung mir jederzeit helfend zur Seite zu stehen. Bei der Unterstützung bei so manch einem Computerproblem bin ich Henrik Herbert für sein fundiertes Fachwissen sehr dankbar, aber auch für seinen Humor, die Musik und seine Unterstützung im Laboralltag bei vielen Fragestellungen. Bei Michael Lorenz möchte ich mich für seine kundige, wissenschaftliche Erfahrung danken, der mir bei so einigen labortechnischen Problemen behilflich zur Seite stand. Außerdem zu erwähnen ist Raffaele Coletti und Christin Lehmann, die mir bei den verschiedensten Zwei- photonenmikroskopischen Problemen unterstützend zur Seite standen. Anca Bartos für ihr Erfahrung und Wissen bei den Anfertigungen einiger *in vitro* Versuche. Nicole Urtz für ihr Fachwissen auf dem Gebiet der Aggregometrie. Sebastian Helmer bedanke ich mich für seine Hilfe bei der Genotypisierung der transgenen Linien. Zusätzlich möchte ich mich bei Dr. med. vet. Sue Chandraratne für Ihre engagierte Hilfe und Unterstützung bei jeglichen Problemen bedanken. Bei Johanna Busse und Vanessa Philippi möchte ich mich für ihre Unterstützung bedanken und für die gemeinsame Zeit als „Leidensgenossen“ in der Anfertigung der Dissertation.

Herrn PD Dr. med. vet. Reese möchte ich mich recht herzlich bedanken für seine Zeit und Bemühungen mir bei meinen Daten statistisch beratende behilflich gewesen zu sein.

Bei den Tierpflegern im ZNP, insbesondere Nicole Blount, möchte ich mich bedanken für die kompetente, verantwortungsbewusste und zuverlässige Betreuung der Tiere.

Für den zusätzlichen wissenschaftlichen Austausch im IRTG des SFB 914 bin ich allen Personen, die dazu beigetragen haben sehr dankbar.

Lisa Beffort für ihre beratende und unterstützende Hilfe als erfahrene Promovendin, die mir bei so manchen auftretenden Problemen während der Anfertigung der Dissertation helfend zur Seite stand.

Meiner Familie will ich von Herzen Danken, für Ihren Beistand und ohne die ich nicht die Stärke erlangt hätte, diese Promotion zu bestreiten. Insbesondere meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben, mich in meinen Vorhaben gefördert und immer an mich geglaubt haben.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank an meinen Partner Carsten Fleck, der zu keiner Zeit an mir gezweifelt hat und durch seine aufbauenden und motivierenden Worte vieles leichter gemacht hat.