

**Aus dem
Institut für Chirurgische Forschung
(im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl**

**DIE BEDEUTUNG DER PLASMINOGENAKTIVATOREN TISSUE-
TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR UND
UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR
FÜR DEN ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN**



DISSERTATION

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

vorgelegt von Bernd Uhl
aus Bad Saulgau
2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med.vet. Dr.med.habil. Fritz Krombach

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Steffen Massberg
Prof. Dr. Bernhard Kuch
Prof. Dr. Bruno Meiser

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Christoph Andreas Reichel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2015

Eidesstattliche Versicherung

Uhl, Bernd

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Bedeutung der Plasminogenaktivatoren *tissue-type-plasminogen activator* und *urokinase-type plasminogen activator* für den Ischämie-Reperfusionsschaden

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

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

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	8
1.	Ischämie-Reperfusion.....	8
1.1	Einführung.....	8
1.2	Epidemiologie.....	9
1.3	Pathogenese.....	11
2.	Leukozyten.....	15
2.1	Leukozyten des angeborenen Immunsystems bei Ischämie/Reperfusion (I/R).....	16
2.2	Leukozyten des adaptiven Immunsystems bei I/R.....	20
3.	Leukozytenrekretierung.....	23
4.	Fibrinolytisches System.....	28
4.1	Nicht-fibrinolytische Eigenschaften des fibrinolytischen Systems.....	31
4.2	Bedeutung des fibrinolytischen Systems für die Pathogenese des Ischämie-Reperfusionsschadens.....	32
II.	Zielsetzung.....	35
III.	Material und Methoden.....	36
1.	Vorbemerkungen.....	36
2.	Modelle.....	36
2.1	Versuchstiere.....	36
2.2	Narkose.....	37
2.3	Chirurgische Technik.....	38
2.4	Intravitalmikroskopie.....	41
2.5	Konfokalmikroskopie.....	43
2.6	Quantifizierung der Leukozytenkinetik und der mikrohämodynamischen Parameter.....	43
2.7	Systemische Leukozytenzahl.....	44
2.8	Analyse der Leukozyten-Transmigrationswege.....	45
2.9	Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität <i>in vivo</i>	45
2.10	Bestimmung der Permeabilität von Endothelzellschichten.....	46
2.11	Mastzellfärbung.....	47
2.12	mRNA Expressionsanalyse (qRT-PCR).....	47
2.13	Durchflusszytometrie.....	48
2.14	Immunhistochemie.....	49

2.15	Zymographie.....	50
3.	Versuchsprotokolle	51
3.1	Analyse der Leukozytenrekutierung im Kremastermuskel der Maus.....	51
3.2	Analyse der mikrovaskulären Permeabilität im Kremastermuskel der Maus.....	53
3.3	Analyse der Rekrutierung fluoreszenzmarkierter transfundierter Leukozyten im Kremastermuskel der Maus	55
3.4	Analyse des Gewebes Schadens und der Leukozytenrekutierung in der Leber der Maus nach Ischämie und Reperfusion	56
4.	Statistik.....	57
IV.	Ergebnisse	58
1.	Ergebnisse uPA	58
1.1	Die Bedeutung von uPA und uPAR für die Leukozytenrekutierung nach Ischämie-Reperfusion	58
1.2	Die Bedeutung von Mac-1 für die Leukozytenrekutierung nach Ischämie-Reperfusion .	60
1.3	Der Einfluss von uPA auf Rollen, feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten ...	61
1.4	Die Bedeutung von leukozytärem versus nicht-leukozytärem uPA für die postischämische Leukozytenantwort	65
1.5	Postischämische leukozytäre Transmigrationswege.....	67
1.6	Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten.....	69
1.7	Die Bedeutung von uPA und des uPA Rezeptors für die Regulation der postischämischen mikrovaskulären Permeabilität	69
1.8	Einfluss von WX-340 auf die postischämische Leukozytenrekutierung und mikrovaskuläre Permeabilität	71
1.9	Einfluss von WX-340 auf die Leukozyteninfiltration und den Gewebes Schaden der Leber nach Ischämie-Reperfusion	72
1.10	Plasmaaktivität von uPA.....	73
1.11	Systemische Leukozytenzahlen und mikrohämodynamische Parameter	74
2.	Ergebnisse tPA.....	77
2.1	Die Bedeutung von tPA für die Leukozytenrekutierung nach Ischämie-Reperfusion	77
2.2	Der Einfluss von murinem rekombinanten tPA sowie von tPA-Mutanten auf die Leukozytenrekutierung	82
2.3	Die Bedeutung von Plasmin und Gelatinasen für die tPA-induzierte Leukozytenrekutierung	86
2.4	Die Rolle von Mastzellen, der Proteinsynthese sowie Lipid-mediatoren für die tPA-abhängige Leukozytenrekutierung	89
2.5	Die Bedeutung von tPA für die mikrovaskuläre Permeabilität	95
2.6	Systemische Leukozytenzahlen und mikrohämodynamische Parameter	98

V. Diskussion.....	102
1. Ischämie-Reperfusion.....	102
2. Bedeutung von uPA und tPA für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in postischämisches Gewebe	103
3. Einfluss des leukozytären sowie nicht-leukozytären uPA und tPA auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in postischämisches Gewebe.....	106
4. Transmigrationswege von neutrophilen Granulozyten im postischämischen Gewebe	108
5. Auswirkungen von uPA und tPA auf die Extravasation von neutrophilen Granulozyten	109
6. Charakterisierung der Mechanismen der durch uPA induzierten Extravasation von neutrophilen Granulozyten	110
7. Charakterisierung der Mechanismen der durch tPA induzierten Extravasation von neutrophilen Granulozyten	113
8. Einfluss von uPA und tPA auf die postischämische mikrovaskuläre Permeabilität	117
9. Auswirkungen einer Blockade von uPA auf die Leukozyteninfiltration und den Gewebeschaden der Leber nach Ischämie und Reperfusion	119
10. Schlussfolgerungen.....	121
VI. Zusammenfassung.....	123
VII. Literaturverzeichnis.....	126
VIII. Abkürzungsverzeichnis	146
IX. Danksagung	148
X. Publikationen.....	151

I. Einleitung

1. Ischämie-Reperfusion

1.1 Einführung

Die Behandlung akuter und chronischer Entzündungserkrankungen stellt die Medizin noch immer vor große Herausforderungen [1]. Eine herausragende Stellung nimmt in diesem Zusammenhang der Ischämie-Reperfusionsschaden ein. Diese spezielle Form einer sterilen Entzündungsreaktion beschreibt einen komplexen biologischen Prozess, welcher durch eine passager unterbrochene (Ischämie) und im Anschluss wiederhergestellte Blutversorgung (Reperfusion) eines Gewebes oder Organs charakterisiert ist. Die Folge der Ischämie ist eine gravierende Differenz zwischen Angebot und Nachfrage von Sauerstoff und Nährstoffen. Diese Mangelversorgung führt zu einem Gewebeschaden und insbesondere während der Reperusionsphase zu einer ausgeprägten mikrovaskulären Entzündungsreaktion. Paradoxerweise verstärkt diese durch die unumgängliche Reperfusion des Gewebes verursachte inflammatorische Antwort den bereits bestehenden ischämischen Gewebeschaden [2].

Aus der Bedeutung, die der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) in der Pathogenese von unterschiedlichsten Krankheitsbildern einnimmt, ergibt sich seine hohe klinische und wissenschaftliche Relevanz. Er gilt nach wie vor als die Hauptursache für Organversagen und -dysfunktion nach Herzinfarkt, Schlaganfall, hämorrhagischem Schock und Transplantation [2]. Die weitere Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen ist daher essentiell für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte sowie der Optimierung bestehender Therapiekonzepte in der Klinik [3-5].

1.2 Epidemiologie

Im Jahre 2012 stellten zwei Krankheitsbilder, die pathophysiologisch in direktem Zusammenhang mit dem Ischämie-Reperfusionprozess stehen, im globalen Vergleich die häufigsten Todesursachen dar: Die ischämische Herzkrankheit und der Schlaganfall (Vgl. Abb. I/1). Ein Vergleich der häufigsten Todesursachen der Jahre 2000 und 2012 zeigt, dass der relative Anteil dieser Krankheitsbilder an den Todesursachen weltweit tendenziell ansteigt (Vgl. Abb. I/2). Eine mögliche Erklärung für diese Entwicklung könnte in der erheblichen Zunahme dieser Krankheiten in den Entwicklungsländern liegen [WHO World Health Statistics 2014; www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/en/]. Diese Daten verdeutlichen die Bedeutung des IRS für die Gesundheit und Lebenserwartung der Weltbevölkerung.

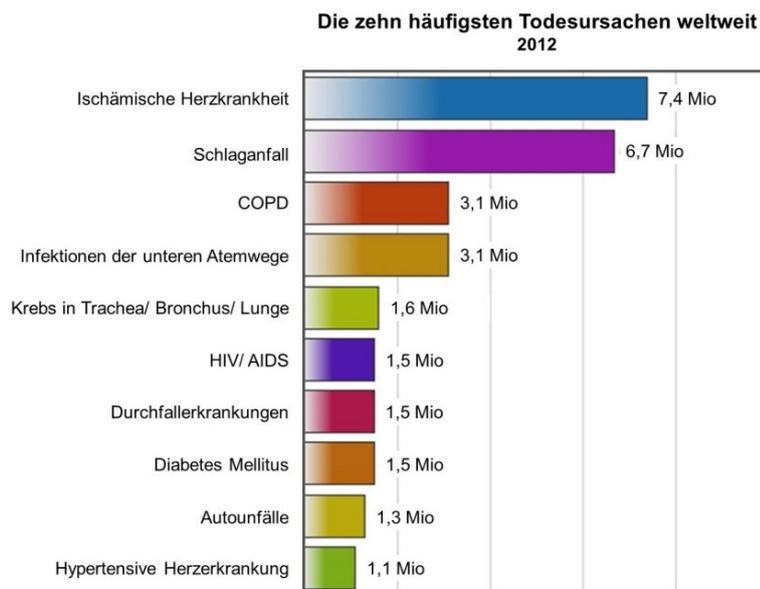


Abb. I/1: Anzahl der zehn häufigsten Todesursachen weltweit im Jahr 2012 [in Anlehnung an WHO Fact sheet N°310; 2014; www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/].

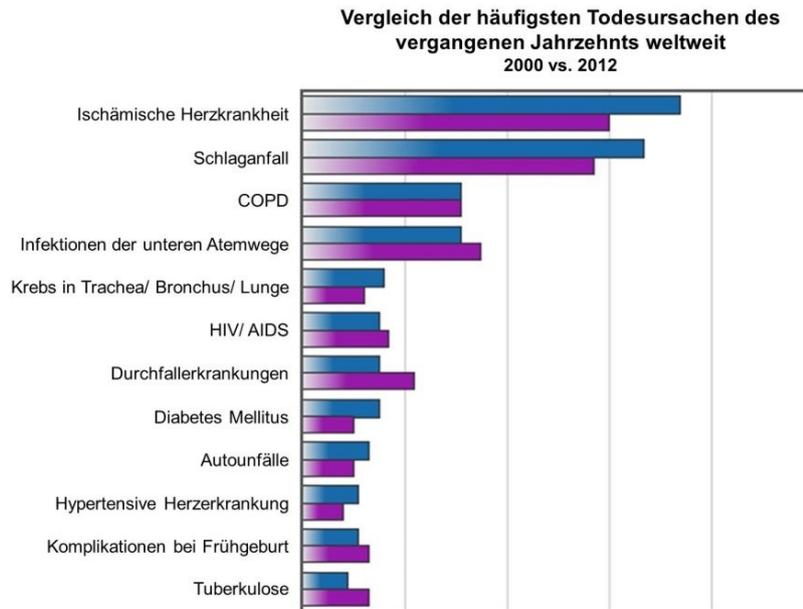


Abb. I/2: Vergleich der Anzahl der häufigsten Todesursachen der Jahre 2000 (lila) und 2012 (blau) [in Anlehnung an WHO Fact sheet N°310; 2014; www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/].

In der Bundesrepublik Deutschland verstarben im Jahr 2012 869.582 Personen. Als Todesursache wurde bei 52.516 dieser Personen ein akuter Herzinfarkt und bei 20.387 Personen ein Schlaganfall festgestellt. An der Spitze der Todesursachenliste steht die chronisch-ischämische Herzkrankheit mit 71.655 Todesfällen. Damit stehen an Platz eins, zwei und acht der häufigsten Todesursachen im Jahre 2012 auch in Deutschland Krankheiten, welche pathophysiologisch in direktem Zusammenhang mit Ischämie-Reperfusion stehen (Vgl. Abb. I/3). Darüber hinaus sind als wesentliche Krankheitsbilder, die pathophysiologisch mit Ischämie und Reperfusion assoziiert sind, die Organischämie in der Transplantationsmedizin und der Zustand nach hämorrhagischem Schock oder Gefäßverletzungen in der Traumatologie zu nennen. Weiterhin zählen zu dieser Gruppe auch chronische Ischämieschäden, die beispielsweise im Rahmen von Autoimmunkrankheiten durch rezidivierend entzündete Gefäße und dadurch verminderten Blutfluss entstehen.

Häufigste Todesursachen 2012

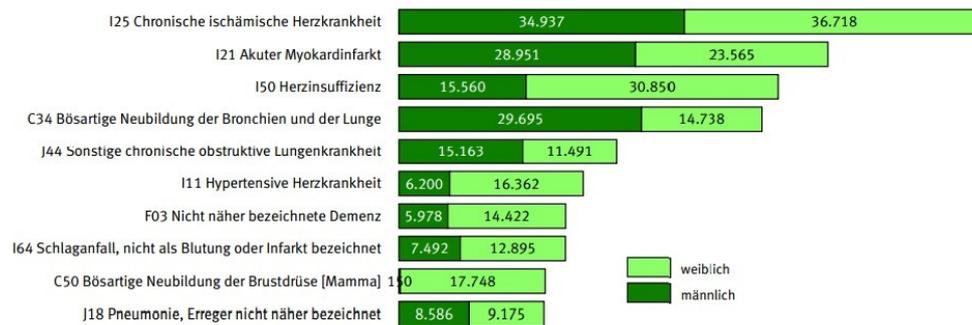


Abb. I/3: Anzahl der zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland des Jahres 2012 [nach Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4; 2012; Statistisches Bundesamt; www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400127004.pdf?__blob=publicationFile].

1.3 Pathogenese

Während der Ischämiephase induziert die Unterversorgung eines Gewebes mit Sauerstoff, Adenosintriphosphat (ATP), Glukose und anderen Faktoren eine kaskadenartig ablaufende Reaktion [6]. Betroffene Zellen wechseln in einen anaeroben Metabolismus, welcher mit der Produktion von Laktat und H^+ -Ionen sowie einem sinkenden pH-Wert einhergeht [7]. Der Ausfall von Ionenpumpen (zum Beispiel der Na^+/K^+ -ATPase) führt zu einer weiteren Störung der Elektrolythomöostase, wodurch die intrazellulären Natrium- und Kalziumspiegel ansteigen [7]. Darüber hinaus werden freie Radikale, reaktive Sauerstoffspezies und kalziumabhängige Enzyme, wie Phospholipasen, freigesetzt, welche den Zusammenbruch der Barrierefunktion und die Permeabilisierung der Zellmembran bewirken [2, 7]. Dies führt wiederum zur Zersetzung der Mitochondrien und zur Freisetzung von Toxinen [7]. Schließlich werden verschiedene Zelltodprogramme wie Apoptose, Nekroptose und Autophagie eingeleitet [7]. Parallel dazu werden Zellen durch direkte Schädigung, onkotische Prozesse und andere Mechanismen nekrotisch, wodurch zusätzliche inflammatorische Substanzen freigesetzt werden [7]. Gewebeständige Makrophagen und Mastzellen reagieren auf den

Gewebescheiden und schütten ihrerseits Histamin, Tumornekrosefaktor (TNF) und andere Zytokine wie Plättchenaktivierenden Faktor (PAF), Interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 oder IL-18 aus [7, 8]. Weiterhin werden bei Ischämie Hypoxie-sensitive Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel *hypoxia-inducible factor* (HIF) aktiviert, welche die Synthese von pro-inflammatorischen Mediatoren initiieren [9]. Dieser Prozess aktiviert einerseits die Endothelzellen in der Mikrozirkulation, welche mit der Expression von Adhäsionsmolekülen reagieren. Andererseits bildet sich durch eine gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität ein Gewebeödem aus [7, 10, 11].

Das primäre Ziel bei ischämischen Ereignissen besteht in der schnellstmöglichen Wiederherstellung der Organperfusion [12]. Obgleich diese Maßnahme die einzige Therapiemöglichkeit darstellt, führt die Wiederherstellung der Durchblutung zu einer massiven Entzündungsreaktion und einem gesteigerten Gewebescheiden [13]. Im Rahmen der Reperfusion führt die Akkumulation von Thrombozyten und Leukozyten (überwiegend von neutrophilen Granulozyten) in den Kapillaren und Mikrogefäßen zum sogenannten „*capillary plugging*“ [14]. Dieser Prozess erschwert in Kombination mit einer Schwellung kapillärer Endothelzellen und einer Erhöhung der lokalen Blutviskosität eine suffiziente Reperfusion des postischämischen Gewebes. Die direkte Folge daraus ist ein erneuter Perfusionsausfall postischämischer Gewebeareale („*no-reflow*-Phänomen“). In Gewebearealen mit wiederhergestelltem Blutfluss wird erneut Sauerstoff in das ischämische Gewebe transportiert, welcher über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies Membranen, DNA (*deoxyribonucleic acid*) und Proteine der Gefäß- und Gewebezellen direkt schädigt [7]. Außerdem ermöglicht das erneut gebildete ATP eine Wiederaufnahme der Funktion des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers. Gemeinsam mit einer gestörten Kalziumaufnahme und -abgabe des geschädigten, sarkoplasmatischen Retikulums verstärkt es die intrazelluläre Kalziumüberladung [13]. In mit Kalzium überladenen und geschädigten Zellen werden *mitochondrial permeability transition*-Poren geöffnet, welche die Permeabilität der mitochondrialen Membranen erhöhen und damit den Zelltod einleiten [15]. Durch das aktivierte Endothel in postkapillären Venolen und darauf präsentierte Chemokine werden Leukozyten – in der frühen Reperusionsphase

hauptsächlich neutrophile Granulozyten – in das geschädigte Gewebe rekrutiert [7, 16]. Dort phagozytieren sie abgestorbene Zellen, greifen jedoch durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen, Zytokinen und Proteasen das durch die Ischämie bereits vorgeschädigte Organ gleichzeitig weiter an („*reflow*-Paradoxon“) [17]. Eine entscheidende Rolle für die Verstärkung der Entzündungsreaktion scheinen darüber hinaus auch die Deposition von Antikörpern, die Aktivierung von Proteasen und des Komplementsystems zu spielen [18]. Obgleich die rekrutierten Leukozyten initial den Gewebeschaden verstärken, leiten diese Immunzellen jedoch gleichzeitig die Geweberegeneration ein [19, 20]. Insgesamt stellt die Rekrutierung von Leukozyten damit ein Schlüsselereignis in der Pathogenese des IRS dar [21-27].

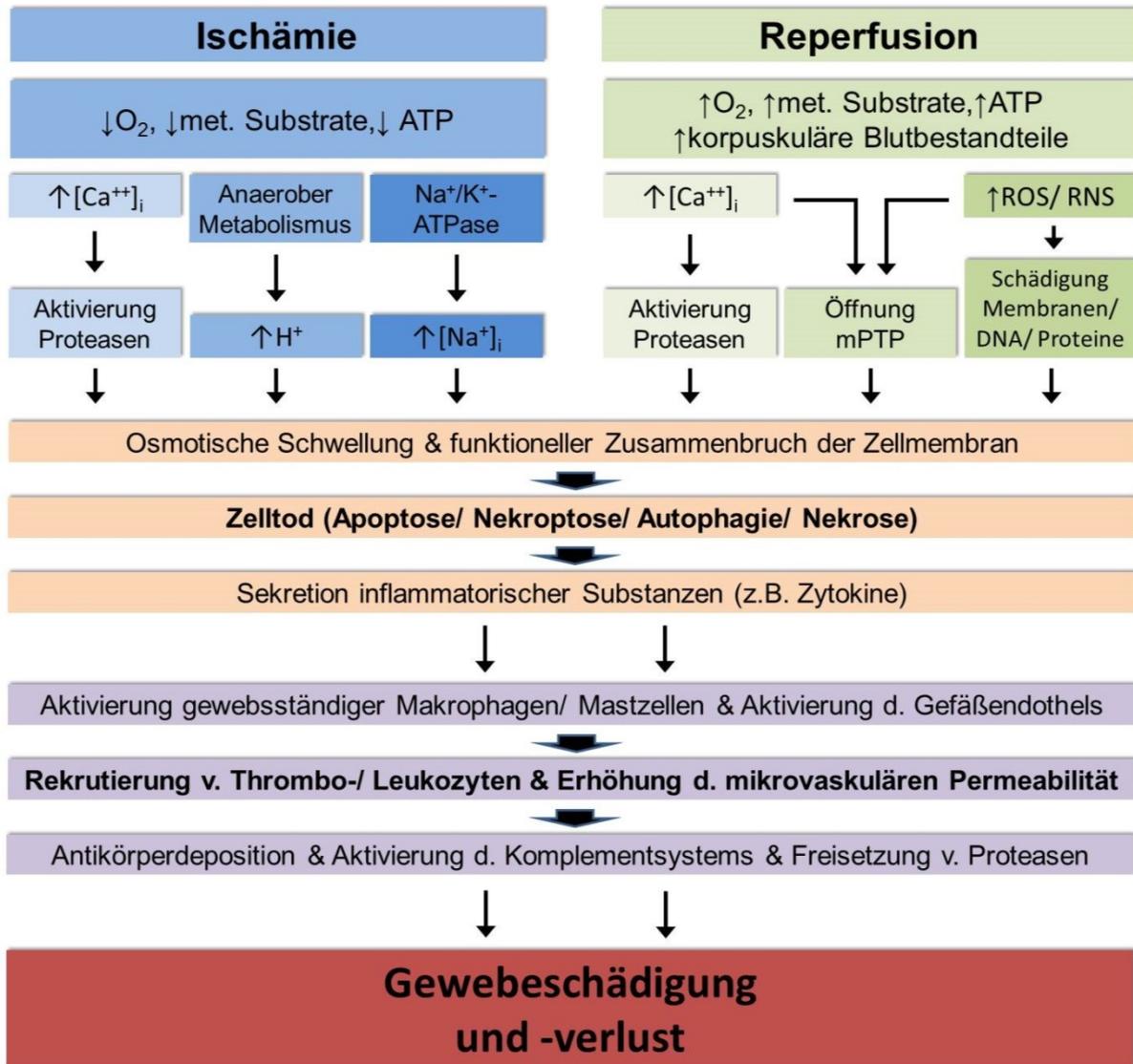


Abb. I/4: Schematische Darstellung wesentlicher Ereignisse bei der Pathogenese des Ischämie-Reperfusionsschadens; Abkürzungen: ROS (Reaktive Sauerstoffspezies); RNS (Reaktive Stickstoffspezies); mPTP (mitochondrial permeability transition pore)

2. Leukozyten

Leukozyten sind dem Immunsystem zuzuordnende, unterschiedlich spezialisierte Zellen. Integriert in dieses System spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Abwehr unbelebter und belebter Noxen wie etwa Bakterien, Viren, Parasiten und Fremdkörpern. Sie sind darüber hinaus wesentlich für die Wachstumskontrolle körpereigener Zellen und damit für die Hemmung der Tumorentstehung sowie für sterile Entzündungsvorgänge wie dem Ischämie-Reperfusionprozess. Nach der Bildung und Reifung im Knochenmark beziehungsweise den lymphatischen Organen zirkulieren die Immunzellen im Blut. Aus den Gefäßen wandern sie in das Gewebe aus und nehmen dort den größten Teil ihrer spezifischen Aufgaben wahr. Abgebaut werden überalterte Leukozyten vorwiegend in Milz, Leber und Knochenmark.

Das angeborene, unspezifische Immunsystem, welches das phylogenetisch ältere Immunsystem repräsentiert, wehrt Pathogene vorrangig mit Hilfe unspezifischer Mechanismen ab. Dazu zählen beispielsweise die Haut-Schleimhaut-Barriere als physikalisches Hindernis, aber auch die Magensäure oder Enzyme im Speichel als humorale Faktoren. Granulozyten, natürliche Killerzellen und Monozyten beziehungsweise Makrophagen sind die bestimmenden Effektorzellen dieses Immunsystems [28].

Das spezifische, adaptive Immunsystem ermöglicht dem Organismus die Unterscheidung zwischen „eigen“ und „fremd“. Es wirkt damit im Gegensatz zum unspezifischen, angeborenen Immunsystem sehr differenziert. Zellulär wird es in erster Linie durch T- und B-Lymphozyten repräsentiert. Nach der Bildung im Knochenmark reifen diese Zellen in Thymus und Knochenmark, den primären lymphatischen Organen. Ein Teil der Zellpopulation wandert anschließend in das sekundär lymphatische Gewebe von Milz, Lymphknoten, Tonsillen und mukosaassoziiertem lymphatischem Gewebe (MALT) ein [28].

Einschränkend ist zu erwähnen, dass die Einteilung in angeborenes und adaptives Immunsystem nur bedingt zutrifft, da die Leukozytensubpopulationen jeweils Funktionen für beide Systeme wahrnehmen können [28, 29].

2.1 Leukozyten des angeborenen Immunsystems bei Ischämie/- Reperfusion (I/R)

2.1.1 Granulozyten

Die Granulozyten, auch polymorphkernige Leukozyten genannt, werden entsprechend dem histochemischen Färbeverhalten ihrer spezifischen Granula in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten eingeteilt. Die Hauptaufgabe dieser Immunzellen des angeborenen Immunsystems besteht in der unspezifischen Bekämpfung von Bakterien, Parasiten und Pilzen [28].

Die neutrophilen Granulozyten werden nach der Morphologie ihres Zellkerns in jugendliche, stabkernige und reife, segmentkernige Populationen unterteilt. Ein herausragendes Merkmal der neutrophilen Granulozyten ist das hohe Phagozytosepotential, wodurch sie bei der Abwehr bakterieller Infektionen von entscheidender Bedeutung sind [28].

Während I/R zählen die neutrophilen Granulozyten zu den ersten Immunzellen, welche in das betroffene Gewebe rekrutiert werden [16]. Durch die Depletion von neutrophilen Granulozyten oder die Blockade von für die Extravasation dieser Immunzellen notwendigen Adhäsionsmoleküle (Selektine, Integrine oder Integrinliganden) kann die Infiltration des postischämischen Gewebes mit neutrophilen Granulozyten reduziert werden. Aus weiteren Studien ist bekannt, dass Organe dadurch vor einem IRS im akuten Stadium geschützt werden können [30-33]. Zusätzlich mehren sich die Hinweise, dass neutrophile Granulozyten die adaptive Immunantwort zum Beispiel über die Produktion von IL-17 regulieren können. IL-17 vermittelt die Aktivierung von natürlichen Killer-T-Zellen, die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) und einen ausgedehnten Gewebeschaden [34]. Insgesamt ist es in der Literatur unumstritten, dass diese Leukozytensubpopulation insbesondere in der frühen Reperfusionsphase wesentlich an der Ausbildung des IRS beteiligt ist. Die Inhibition und Regulation der Invasion von neutrophilen Granulozyten in das postischämische Gewebe scheint dabei ein vielversprechender Ansatz zu sein [29].

Eosinophile Granulozyten sind von entscheidender Bedeutung für die Bekämpfung von Parasiten. Die Bindung von IgE-Antikörpern an diese Immunzellen induziert die Freisetzung basischer Proteine, welche neben der Abwehr von Krankheitserregern auch der Anlockung weiterer Leukozyten dient. Weiterhin sind sie entscheidend in die Pathogenese von allergischen Reaktionen und Asthma involviert. Das Phagozytosepotential der eosinophilen Granulozyten scheint jedoch schwach ausgeprägt zu sein. Im Rahmen von Ischämie und Reperfusion spielen sie vermutlich eine vernachlässigbare Rolle [35].

Basophile Granulozyten können über membranständige IgE-Rezeptoren aktiviert werden. Dies induziert eine Degranulation, wodurch beispielsweise vasoaktives Histamin und gerinnungshemmendes Heparin sezerniert werden. Weiterhin sind basophile Granulozyten relevant für die Pathophysiologie der Krankheiten Asthma, atopisches Ekzem und Heufieber [28].

2.1.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen eliminieren als Teil des angeborenen Immunsystems diejenigen Zellen, welche auf der Zelloberfläche kein oder abnormes MHC-I exprimieren. In diesem Zusammenhang spielen sie bei I/R aber auch in der Immunreaktion auf virale Infekte und Tumoren eine entscheidende Rolle. Die Fähigkeit, beschädigte oder abnorme Zellen ohne Antikörper oder den Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*; MHC) zu erkennen, unterscheidet sie von anderen Immunzellen und erlaubt eine schnellere Immunreaktion. Darüber hinaus sind sie essentiell für die Ausbildung der Selbst-Toleranz und damit auch für die adaptive Immunität. Natürliche Killer-T-Zellen sind demgegenüber lymphozytäre Zellen und exprimieren T-Zell-Antigenrezeptoren oder CD3/ Pan-T-Zell-Marker [28, 36-38].

Die Funktion der natürlichen Killerzellen bei I/R ist nicht hinreichend geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass sich die Depletion von natürlichen Killerzellen protektiv auf den IRS auswirkt

[39]. In anderen Studien wurde gezeigt, dass nur natürliche Killer-T-Zellen, jedoch nicht natürliche Killerzellen, für die Entstehung des renalen IRS mitverantwortlich sind [40, 41].

2.1.3 Monozyten/Makrophagen/dendritische Zellen

Als heterogene Gruppe von Immunzellen besitzen Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität eine Schlüsselfunktion im Immunsystem.

Monozyten sind eine Zellpopulation myeloiden Ursprungs, die im Blut ungefähr 4 - 10 % aller Leukozyten darstellt. Unter physiologischen Bedingungen befindet sich ungefähr die Hälfte der Population in der Milz. Nach Oberflächenrepertoire (human: CD14, CD16; murin: CCR2, Ly6C) und Funktion können mindestens drei Monozytenpopulationen unterschieden werden: Klassische (eher pro-inflammatorische), intermediäre und nicht-klassische (eher anti-inflammatorische, residente) Monozyten. In der Folge einer Gewebeschädigung oder Entzündung werden Monozyten in das Gewebe rekrutiert und können sich zu Makrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren [42-44].

Makrophagen sind eine wichtige Komponente des Immunsystems und im Gewebe für die Erkennung und Abwehr von fremdem respektive schädlichem (Zell)material zuständig und damit wesentlich für die Gewebemöostase. Es werden zwei Haupttypen unterschieden. Klassische, sogenannte M1-Makrophagen, besitzen einen proinflammatorischen Phänotyp. Sie besitzen die Fähigkeit zur gesteigerten Phagozytose, der Produktion von großen Mengen an proinflammatorischen Zytokinen sowie der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies. Dem stehen die M2-Makrophagen gegenüber, die tendenziell abschwächend auf eine Immunreaktion wirken und zur Abwehr von Parasiten beitragen. Weiterhin vermitteln Makrophagen insgesamt den Gewebeumbau und damit den Heilungsprozess eines Gewebes nach einer Schädigung [45].

Dendritische Zellen regulieren als primäre antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems und als Bindeglied zwischen angeborener sowie adaptiver Immunität die Aktivität von Lymphozyten gegen fremde Antigene, die Immuntoleranz und damit die Autoimmunität [46-49]. Sie entstehen aus monozytären oder lymphoiden Knochenmarksvorläuferzellen und migrieren durch die systemische Zirkulation zu nicht-lymphatischen Geweben. Dort besitzen sie zunächst einen nicht-reifen Phänotyp [50]. Bei Antigenkontakt differenzieren sie sich zu reifen dendritischen Zellen und gewinnen die Fähigkeit zur Phagozytose. Dendritische Zellen sind die einzigen Zellen des Immunsystems, welche durch die Aktivierung naiver T-Zellen eine primäre Immunantwort induzieren können [29].

Die Funktion von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen bei Ischämie und Reperfusion wird kontrovers diskutiert. In unterschiedlichen Modellen zeigten sich sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf die Ausbildung eines IRS [51, 52]. Neuere Daten bezüglich der Rolle von Makrophagen bei I/R zeigen interessanterweise, dass der Zeitpunkt und der Subtyp entscheidend für die Rolle in diesem Prozess sind. Beispielsweise zeigten S. Lee und Kollegen, dass in der frühen Phase des Ischämie-Reperusionsprozesses M1-Makrophagen zum Schaden beitragen. Dagegen scheinen M2-Makrophagen zu späteren Zeitpunkten entscheidend für die Erholung der Niere nach Ischämie und Reperfusion zu sein [53].

2.2 Leukozyten des adaptiven Immunsystems bei I/R

2.2.1 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten, welche zum adaptiven Immunsystem gehören, werden im Knochenmark gebildet und besiedeln vor allem die B-Zell-Regionen der lymphatischen Organe. Sie können durch die Anwesenheit von Immunglobulinen auf ihrer Oberfläche freie Antigene erkennen. Durch diese Eigenschaft unterscheiden sie sich von den T-Lymphozyten. Die beiden wichtigsten Aufgaben der B-Lymphozyten stellen die Antigenerkennung und die Antikörperproduktion dar. Damit sind sie die Träger der humoralen, adaptiven Immunität. Nach ihrer Aktivierung können sie sich zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen differenzieren. Alternativ wandeln sich aktivierte B-Zellen auch in Gedächtniszellen um, welche über Jahrzehnte hinweg im Körper persistieren können. Da sie immunmodulierende Moleküle und Zytokine produzieren, sind sie darüber hinaus wichtige Effektorzellen in der Immunreaktion bei Ischämie und Reperfusion [54, 55].

In einer Studie, in der ein Modell des intestinalen IRS angewandt wurde, erwies sich eine B-Zell-Depletion bezüglich des Gewebeschadens als protektive Therapiemaßnahme [56]. Eine B-Zell-Defizienz führte bezüglich des Gewebeschadens der Niere nach I/R jedoch zu kontroversen Ergebnissen: Während die Versuchsmäuse in einer Studie von der B-Zell-Defizienz profitierten, konnte in einer anderen Studie ein verstärkter Gewebeschaden nachgewiesen werden [55, 57].

2.2.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten zählen ebenfalls zu den Zellen der adaptiven Immunantwort. Sie werden im Knochenmark gebildet und wandern anschließend in den Thymus, den Ort ihrer Ausreifung. Diejenigen T-Lymphozyten, die auf körpereigene Proteine reagieren, werden im Thymus abgebaut. Die restlichen T-Zellen reagieren nur auf körperfremde Antigene. Sie erkennen

diese Antigene anhand sogenannter T-Zell-Rezeptoren (TCR), welche Proteine in der Zellmembran darstellen. Die Antigene müssen dafür jedoch auf der Oberfläche anderer Zellen an deren MHC gebunden sein. T-Zellen können in verschiedene Gruppen unterteilt werden, deren wichtigste Vertreter anhand von Oberflächenmarkern und unterschiedlichen Funktionen differenziert werden: CD4-positive T-Helferzellen, CD8-positive zytotoxische T-Zellen, T-Regulatorzellen, T-Suppressorzellen und natürliche Killer T-Zellen [58, 59].

T-Helferzellen exprimieren auf der Zelloberfläche CD4-Korezeptoren. Durch MHC-II-Moleküle auf Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Lymphozyten präsentierte Antigene können von diesen T-Lymphozyten erkannt werden. Es sind verschiedene Subtypen von T-Helferzellen beschrieben, welche die Immunantwort verschieden modulieren können. TH1-Helferzellen aktivieren über die Produktion von IFN- γ und IL-2 Makrophagen und zytotoxische T-Lymphozyten und leiten darüber eine zelluläre Immunantwort ein. Demgegenüber schütten aktivierte TH2-Helferzellen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 aus und induzieren über die Aktivierung von B-Lymphozyten, welche neutralisierende Antikörper bilden, tendenziell eine humorale Immunantwort [28].

Zytotoxische T-Lymphozyten besitzen CD8-Korezeptoren auf der Zelloberfläche. Kernhaltige Zellen können über MHC-I-Moleküle Antigene präsentieren, welche von diesen Immunzellen erkannt werden. Nach der Bindung können körperfremde, virusinfizierte oder genetisch veränderte Zellen von zytotoxische T-Lymphozyten direkt zerstört werden [60].

Die Bedeutung von T-Suppressorzellen, T-Regulatorzellen und natürlichen Killer-T-Zellen ist nur unzulänglich verstanden. Sie scheinen vorwiegend in der Ausbildung und Regulation der Immuntoleranz involviert zu sein [61]. Darüber hinaus finden sich unter anderem im lymphatischen System des Darmes und der Haut $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, deren Funktion ebenfalls nur teilweise geklärt ist [62].

Der Einfluss unterschiedlicher T-Zellen auf die Ausbildung des IRS wurde in zahlreichen Studien und in unterschiedlichen Organen analysiert. Grundsätzlich zeigen sowohl eine CD4-Defizienz als auch eine CD8-Defizienz protektive Effekte nach Ischämie und

Reperfusion. Dies weist darauf hin, dass CD4- und CD8-positive Lymphozyten an der Entstehung des IRS beteiligt sind. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Depletion der T-regulatorischen Zellen in einem gesteigerten IRS resultiert. Insgesamt scheint die Relevanz der T-Zell-Subpopulationen für die Entstehung eines Gewebeschadens je nach Phase des Ischämie-Reperfusionprozesses zu variieren. Außerdem sind T-Zellen jedoch nicht nur in der Ausbildung eines Schadens involviert, sondern auch für die Regenerationsphase unverzichtbar [63-66].

3. Leukozytenrekrutierung

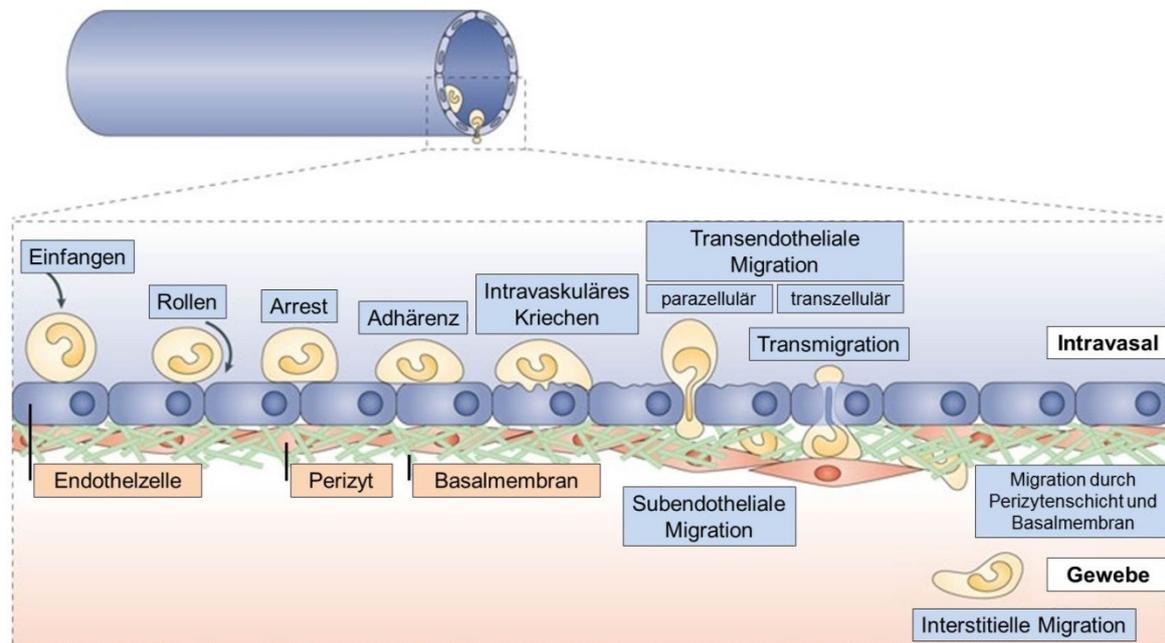


Abb. 1/5: Darstellung der einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierungskaskade [in Anlehnung an [22]].

Eine effiziente Rekrutierung von Leukozyten aus Mikrogefäßen zum Ort eines Gewebeschadens bzw. einer Entzündung stellt das Fundament einer funktionierenden Immunabwehr dar. Am Ort des Schadens werden verschiedene proinflammatorische Faktoren, beispielsweise Chemokine und andere Zytokine sowie Sauerstoffradikale, freigesetzt. Infolgedessen wird das Gefäßendothel der umliegenden Mikrogefäße aktiviert. Die aktivierten Endothelzellen exprimieren Adhäsionsmoleküle und präsentieren Chemokine auf ihrer luminalen Seite. Dadurch beginnen im Blutstrom zirkulierende Leukozyten mit dem Endothel zu interagieren. Der Vorgang des Einfangens von Leukozyten durch das Endothel charakterisiert den ersten Schritt der Leukozytenrekrutierung. Anschließend beginnen die Leukozyten auf dem Endothel in Richtung des Blutstromes zu rollen [21, 22]. Das Rollen wird vorrangig über L-Selektin, P-Selektin und E-Selektin vermittelt, die mit den entsprechenden Liganden interagieren [67]. L-Selektin wird von den meisten Leukozyten exprimiert [68, 69]. Im Gegensatz dazu werden E-Selektin und P-Selektin von aktivierten Endothelzellen exprimiert

[70, 71]. Unter mehreren glykosylierten Liganden stellt *P-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL-1) den wichtigsten Bindungspartner der Selektine dar [72]. Erst die Interaktion dieser Selektine mit den entsprechenden Liganden erlaubt den Leukozyten die Kontaktbildung mit dem Endothel unter Flussbedingungen [73]. Neben den Selektinen besitzen auch die Integrine einen Einfluss auf das Rollen von Leukozyten. Zu den in diesem Zusammenhang bedeutsamen Molekülen zählen *macrophage-1 antigen* (MAC-1), *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1), *very late antigen 4* (VLA-4), *mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1* (MADCAM-1) und *vascular cell-adhesion molecule 1* (VCAM-1) [74-79].

Durch auf Endothelzellen präsentierte Chemokine oder andere chemische Lockstoffe können rollende Leukozyten weiter aktiviert werden [80, 81]. Dieser Vorgang induziert unter anderem eine Affinitätsänderung leukozytärer Integrine. Dadurch intensivieren sich deren Interaktionen mit endothelial exprimierten Proteinen der Immunglobulinsuperfamilie wie ICAM-1 oder VCAM-1. Diese Interaktionen initiieren ein langsames, sequentielles Abstoppen der leukozytären Rollbewegung. Als Folge adhären die Leukozyten fest am Gefäßendothel. An diesem Vorgang beteiligte Integrine sind VLA-4, das hauptsächlich mit VCAM-1 interagiert, sowie LFA-1 und MAC-1, die vorrangig mit ICAM-1 interagieren [21, 82-87].

Anschließend beginnen Leukozyten den Transmigrationsprozess durch die Gefäßwand in das entzündete Gewebe. Zu diesem Zweck bewegen sich fest adhärenente neutrophile Granulozyten und Monozyten kriechend auf dem intravaskulären Endothel. Dieses Kriechen wird vorrangig durch MAC-1 und ICAM-1 vermittelt [88, 89]. Auf diese Weise sondieren sie die Endothelzellschicht nach einer passenden Stelle zur Transmigration [21]. Wegweisend dafür sind luminal präsentierte chemische Lockstoffe in Verbindung mit der flussbedingten Wandscherrate [90]. Zusätzlich übt die Wechselwirkung von Integrinen mit ICAM-1 und VCAM-1 einen wesentlichen Einfluss aus [91]. Während der Transmigration müssen Leukozyten drei strukturelle Barrieren überwinden: An erster Stelle steht die Endothelzellschicht, gefolgt von der Basalmembran der Endothelzellen und einer Perizyten-schicht.

Grundsätzlich ist zwischen dem transzellulären und dem von Leukozyten vorwiegend genutzten parazellulären Transmigrationsweges zu unterscheiden [21]. Beim parazellulären Transmigrationsweg scheinen die durch Endothelzell-Leukozyten-Kontakte gebundenen Moleküle zu einem schwächeren Endothelzell-Endothelzellkontakt zu führen und dadurch die Migration von Leukozyten zwischen Endothelzellen hindurch zu erleichtern. Zusätzlich verändern durch Entzündung aktivierte Endothelzellen das Expressionsmuster ihrer Moleküle, die für die Kontakte mit anderen Endothelzellen bedeutend sind und unterstützen damit die Transmigration von Leukozyten [92]. Beispielsweise werden Moleküle wie VE-Cadherin, welche die Emigration behindern, von Endothelzell-Endothelzellkontaktstellen abtransportiert [93]. Andererseits werden endotheliale Moleküle, die als Interaktionspartner für leukozytäre Moleküle fungieren (wie *platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1* (PECAM-1) und *junctional adhesion molecule A* (JAM-A)), zur luminalen Oberfläche transportiert [94]. Verschiedene Moleküle, welche die Endothelzell-Endothelzellkontakte bilden, vermitteln zudem aktiv die transendotheliale Migration von Leukozyten [95]. Zu diesen Molekülen zählen die Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie PECAM-1, ICAM-1, ICAM-2, JAM-A, JAM-B, JAM-C, *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM) und CD99, welches kein Immunglobulin ist [21]. Der transendotheliale Zellmigrationsweg wird nur von einem kleinen Teil der Leukozyten zur Transmigration genutzt [96]. Sie spielt wahrscheinlich vorwiegend im zentralen Nervensystem und in speziellen Entzündungssituationen eine Rolle [97, 98]. Vermutlich sind dieselben Moleküle, welche die parazelluläre Transmigration vermitteln, ebenfalls in die transzelluläre Transmigration involviert [98]. Abhängig von der Leukozytensubpopulation existieren unterschiedliche, spezifische Transmigrationsmodi. Welcher Transmigrationsmodus von den Leukozyten gewählt wird, hängt wahrscheinlich von der Menge leukozytärer Liganden ab, die direkt oder indirekt in der Rekrutierung eines speziellen Endothelzellkontaktmoleküls während des Transmigrationsprozesses involviert sind [21].

Nachdem die Leukozyten die Endothelzellschicht überwunden haben, müssen sie deren Basalmembran sowie die Perizytschicht durchdringen [21]. Die endotheliale Basal-

membran besteht aus zwei Proteinnetzwerken. Eines der Netzwerke wird von den Gefäßlamininen Laminin-8 und Laminin-10 gebildet, während das andere vorwiegend aus Kollagen Typ IV besteht. Die beiden Netzwerke sind über Bindungen mit Molekülen wie Nodogen-2 und dem Heparinsulfat-Proteoglycan Perlecan verbunden [99]. In jedem Netzwerk befinden sich Abschnitte, an denen eine geringere Expression der Moleküle vorliegt. Diese Abschnitte geringer Expression dehnen sich im Rahmen einer Entzündung weiter aus. Sie befinden sich regelmäßig in der Nähe von Lücken zwischen Perizyten [100, 101]. Darüber hinaus sind sie wahrscheinlich durchlässiger für Chemokine und könnten so über einen Chemokingradienten transmigrierende Leukozyten während des Emigrationsprozesses in das perivaskuläre Gewebe leiten [102]. Für neutrophile Granulozyten wurde bereits gezeigt, dass sie während der Transmigration die Basalmembran bevorzugt an Abschnitten geringerer Proteinexpression durchqueren. Einerseits „quetscht“ sich der Granulozyt in diesem Zusammenhang durch die Strukturen der Gefäßwand. Andererseits kann er deren Proteine auch aktiv durch auf der Oberfläche exprimierte Proteasen spalten [100, 101]. Darüber hinaus ist aus früheren Untersuchungen bekannt, dass die transendotheliale Migration einen starken Einfluss auf den Phänotyp der Leukozyten und deren Verhaltensweise bei der interstitiellen Migration ausübt. Beispiele derartiger Modifizierungen sind veränderte Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen oder Proteasen [103, 104].

Haben Leukozyten ihre Transmigration abgeschlossen, migrieren sie durch das interstitielle Gewebe zielgerichtet zum Ort des Schadens beziehungsweise der Entzündung. Das interstitielle Gewebe stellt sich entweder als lockeres fibrilläres Netzwerk oder als ein mit Zellen gefülltes Gewebe, zum Beispiel ein Organparenchym oder lymphatisches Gewebe, dar [22]. Leukozyten scheinen bei der interstitiellen Migration das amöboide Migrationsmuster von einzelligen Eukaryoten zu imitieren. Dabei bewegen sich die Leukozyten vorwärts, indem sie innerhalb kurzer Zeit ihr Zellgerüst verändern [105]. In welchem Ausmaß Leukozyten die extrazellulären Strukturen als Leitstruktur für die interstitielle Migration benutzen ist noch nicht vollständig geklärt. Interessanterweise bevorzugen Leukozyten während der Migration jedoch weitgehend unabhängig von der molekularen Zusammen-

setzung der extrazellulären Umgebung weniger dichte Gewebeareale [22, 104]. Chemokine und Lipidmediatoren bestimmen in diesem Prozess den Aktivitätsstatus und die Migrationsrichtung der Leukozyten [22].

Proteasen sind während der Transmigration an mehreren Punkten involviert. Diese Enzyme wirken beispielsweise durch die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren [106, 107]. Des Weiteren spalten sie Chemokine und bestimmte Rezeptoren, können die Affinität von leukozytären Adhäsions- oder Signalmolekülen beeinflussen oder fungieren selbst als Chemokine [108-114]. Dadurch können sie von der Aktivierung von Endothel und Leukozyten über die Adhärenz bis hin zur Transmigration und interstitiellen Migration alle Schritte der Leukozytenrekrutierung beeinflussen. Die wichtigsten Vertreter der Proteasen sind in diesem Kontext Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und bestimmte Serinproteasen. Neuere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass auch die Proteasen des fibrinolytischen Systems einen signifikanten Beitrag zur Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe leisten. Dazu zählen die Effektorprotease Plasmin sowie die Plasminogenaktivatoren *tissue-type plasminogen activator* (tPA) und *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) [111, 115-118].

4. Fibrinolytisches System

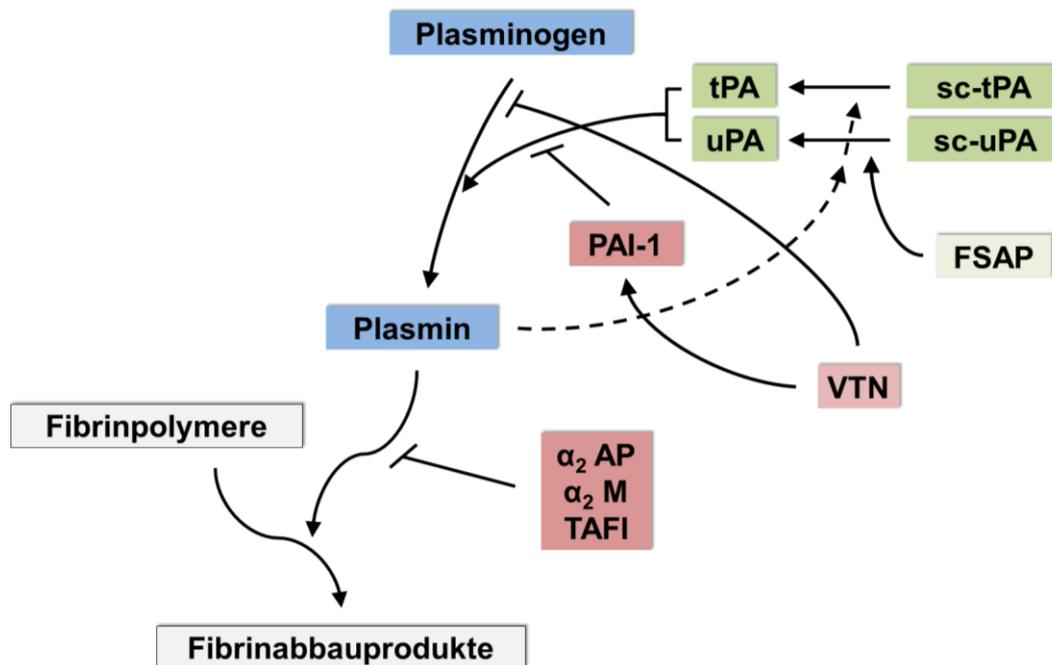


Abb. 1/6: Schematischer Überblick über das fibrinolytische System.

Die Fibrinolyse beschreibt einen elementaren biologischen Prozess, dessen Hauptaufgabe in der Auflösung nicht notwendiger und potentiell schädlicher Hämostaseprodukte besteht. Als Gegenspieler zur Hämostase steht die Fibrinolyse mit dieser in einem ständigen Gleichgewicht. Das funktionelle Zentrum des Systems bildet die Serinprotease Plasmin, welche in den Gefäßen abgelagerte Fibrinpolymere in einzelne Fibrinabbauprodukte spaltet. Plasmin wird als das inaktive Zymogen Plasminogen in der Leber gebildet und von dort in den Blutkreislauf ausgeschüttet. Aktiviert wird es hauptsächlich von den Plasminogenaktivatoren *tissue-type plasminogen activator* (tPA) und *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) durch hydrolytische Spaltung [119, 120].

Das Gefäßendothel setzt kontinuierlich Einzelstrang-tPA und in kleineren Mengen Einzelstrang-uPA frei. Die Sekretion dieser Plasminogenaktivatoren findet vor allem im Endothel präkapillärer Arteriolen und postkapillärer Venolen mit geringem Durchmesser sowie in den *Vasa vasorum* statt. Im Vergleich dazu ist die Sekretion aus Endothelzellen

größerer Arterien und Venen gering [119, 121]. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Aufrechterhaltung einer konstanten Fibrinolyse im gesamten Blutkreislauf und damit die Sicherstellung der Kreislauffunktion. Einzelstrang-tPA stellt eine limitiert aktive Form dar. In Anwesenheit von Fibrin besitzt sie jedoch eine mit Doppelstrang-tPA vergleichbare Effektivität in Bezug auf die Plasminogenaktivierung. Einzelstrang-uPA (entspricht pro-uPA) weist im Kontrast dazu keine nennenswerte enzymatische Aktivität auf. Daher ist insbesondere tPA für die konstante lokale Plasminaktivierung und damit Fibrinolyse in der Mikrozirkulation verantwortlich. Über einen Feedbackmechanismus kann aktives Plasmin die Einzelstrangformen von tPA und uPA in Doppelstrangformen spalten, die eine deutlich höhere enzymatische Aktivität aufweisen [119]. Einzelstrang-uPA kann darüber hinaus auch durch die *factor VII activating protease* (FSAP), Faktor XIIa, Trypsin oder die Cystein-Proteasen Kathepsin B und Kathepsin L gespalten und damit gleichzeitig aktiviert werden [122-125].

Fibrin stellt das Hauptsubstrat von Plasmin dar, welches sowohl an tPA als auch an Plasmin bindet. Dadurch führt es diese Proteine zusammen und reguliert darüber den eigenen Abbau. Interessanterweise ist die Aktivität von Doppelstrang-tPA im Vergleich zur Aktivität des Einzelstrang-tPAs in Abwesenheit von Fibrin als Stimulator um ein Zehnfaches erhöht. Das Molekül zeigt jedoch eine vergleichbare enzymatische Aktivität in Anwesenheit von Fibrin. uPA bindet selbst nicht an Fibrin. Die Potenz der uPA-Doppelstrangform in Bezug auf die Aktivierung von Plasminogen ist in Anwesenheit von Fibrin jedoch ebenfalls erhöht. Dies lässt sich wahrscheinlich auf eine Konformationsänderung des Plasminogenmoleküls zurückführen, die durch die Bindung an Fibrin verursacht wird. Insgesamt stellen diese Eigenschaften eine in Anwesenheit von Fibrin effektive Fibrinolyse sicher [119].

Diesem System, das die Aktivierung von Plasmin reguliert, steht eine Gruppe von Molekülen gegenüber, welche die Fibrinolyse hemmen. Dazu gehören die den Serpinen zuzuordnenden Plasminogenaktivator-Inhibitoren, dessen wichtigster Vertreter *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1) darstellt. Dieser bildet ein Pseudosubstrat für die Plasminogenaktivatoren

um deren proteolytische Aktivität durch die Bildung eines Komplexes zu inaktiven [126]. PAI-1 wird sowohl ständig vom Endothel als auch von aktivierten Thrombozyten während einer Gerinnungsphase sezerniert und ermöglicht damit lokal die Gerinnung [127, 128]. Über 80 % des PAI-1 im Blut liegt in den Thrombozyten gespeichert vor [129]. Ein weiteres wichtiges Molekül ist das Glykoprotein Vitronektin (VTN). Es bindet über seine Somatomedin-B-Domäne an PAI-1 und stabilisiert dadurch das Molekül und dessen Funktion [130, 131]. Darüber hinaus bindet es an Plasminogen und inhibiert die Fibrinogen-induzierte Aktivierung durch tPA [132]. Weitere wichtige antifibrinolytisch wirksame Proteine sind α 2-Antiplasmin (α 2AP), α 2-Makroglobulin (α 2M) und der *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor* (TAFI) [133-135]. Diese Moleküle fungieren als direkte Inhibitoren der Plasmin-vermittelten Fibrinolyse.

Im Zusammenspiel ergibt sich ein komplex ausbalanciertes System der Gerinnung und Fibrinolyse, welches die Grundlage für einen funktionsfähigen Blutkreislauf bildet. Bei einem Ungleichgewicht in diesem System kommt es entweder zu Blutungen (bei verminderter Gerinnungsleistung) oder zu Thrombosen und Embolien (bei Hyperkoagulation).

4.1 Nicht-fibrinolytische Eigenschaften des fibrinolytischen Systems

Neben der Degradierung von Fibrinpolymeren sind die einzelnen Komponenten des fibrinolytischen Systems durch proteolytische oder nicht-proteolytische Interaktionen in vielen weiteren physiologischen und pathophysiologischen Prozessen involviert.

Plasmin, die Effektorprotease des fibrinolytischen Systems, spaltet Moleküle der endothelialen Basalmembran wie Laminin, Thrombospondin und Fibronectin oder aktiviert und inaktiviert Faktoren der Gerinnung (zum Beispiel Fibrinogen). Zusätzlich kann Plasmin Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) aktivieren. Diese MMPs degradieren Matrixproteine wie Kollagene, Laminin, Fibronectin oder Elastin. Darüber hinaus können MMPs beispielsweise die Funktion von Zytokinen oder deren Rezeptoren durch enzymatische Spaltung beeinflussen. Über diese und weitere Mechanismen ist Plasmin in Entzündungsvorgänge, Wundheilung, Tumorzellinvasion, Tumormetastasierung, Embryogenese, Ovulation, die Entwicklung des Nervensystems oder der Aktivierung von Hormonvorstufen involviert [119]. Die anderen Faktoren des fibrinolytischen Systems wirken einerseits durch Modulation der Plasminaktivität auf diese Prozesse ein. Andererseits modulieren sie verschiedene biologische Prozesse im Körper über eigene, spezifische Signalwege unabhängig von Plasmin. Beispielsweise kann uPA unabhängig von Plasmin über den uPA-Rezeptor als Lockstoff für polymorphkernige Granulozyten fungieren [114]. PAI-1 wirkt darüber hinaus unabhängig von Plasmin über Vitronectin auf die Zelladhäsion und die Migration von Tumorzellen [136].

Als besonders wichtig erscheint das fibrinolytische System vor allem für Entzündungsvorgänge. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass das inflammatorische und das fibrinolytische System nicht parallel und unabhängig voneinander existieren, sondern sich wechselseitig beeinflussen. Einerseits sind Komponenten des Immunsystems in Gerinnung und Fibrinolyse involviert, andererseits spielen die Komponenten des Gerinnungssystems für Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle [137].

Plasmin spaltet beispielsweise Fibrinpolymere, deren Abbauprodukte wiederum die mikrovaskuläre Permeabilität erhöhen können. Darüber hinaus bindet und inhibiert Plasminogen die Komplementfaktoren C3 und C5. Aktiviertes Plasmin degradiert den Komplementfaktor C3 sowie in Anwesenheit von C6 auch den Komplementfaktor C5. Beide Proteine wirken damit inhibitorisch auf das Komplementsystem [138]. Weiterhin aktiviert Plasmin Kollagenasen und spaltet Fibronectin, Thrombospondin, Laminin und von-Willebrand-Faktor. Auf diese Weise vereinfacht Plasmin beispielsweise die Extravasation von Leukozyten und erhöht die mikrovaskuläre Permeabilität [119]. Auch der aktivierte TAFI wirkt über die Inaktivierung des Komplementfaktors C5a anti-inflammatorisch [139, 140]. Ein weiteres Beispiel ist die Hemmung der Produktion von Tumornekrosefaktor (TNF) durch PAI-1, einem starken Entzündungsmediator. TNF wiederum senkt die fibrinolytische Aktivität durch Stimulation von PAI-1 und die Verminderung der tPA-Expression in Endothelzellen [141]. Bei Patienten, die sich im septischen Schock befanden, korrelierten erhöhte TNF-Werte mit einer deutlichen Reduktion der tPA-Spiegel im Blut [142]. Die Verkettung von Fibrinolyse und Entzündung wurde auch in Studien an Fibrinogen-defizienten Mäusen beobachtet. Diese Mäuse zeigen eine reduzierte Leukozytenrekrutierung und eine geringere Zytokinproduktion während eines Entzündungsprozesses [143, 144].

Diese Beispiele illustrieren die Bedeutung des fibrinolytischen Systems für weitere physiologische und pathophysiologische Prozesse und veranschaulichen darüber hinaus deren enge Vernetzung.

4.2 Bedeutung des fibrinolytischen Systems für die Pathogenese des Ischämie-Reperfusionsschadens

In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass die Hauptkomponenten des fibrinolytischen Systems in die Pathogenese des IRS unterschiedlicher Organe und Spezies involviert sind. In einem Modell des myokardialen IRS wurde belegt, dass Plasmin den Gewebeschaden

über die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und die Induktion von Apoptose und Nekrose in Herzmuskelzellen erhöht. Weiterhin reduzierte eine Blockade der proteolytischen Plasminaktivität nach warmer Ischämie der Lunge den Gewebeschaden. Damit einhergehend verbesserte sich auch die Organfunktion [145, 146]. Der Einfluss der Plasminogenaktivatoren auf den IRS wurde ebenfalls untersucht. In Modellen des IRS der Niere waren sowohl endogenes uPA als auch der uPA Rezeptor in der Entstehung des Schadens involviert [147]. Außerdem führte die tPA-Defizienz in Ischämie-Reperfusionsschadensmodellen der Niere oder Lunge zu einem verminderten Gewebeschaden. Dieser Effekt wurde durch eine herabgesetzte Neutrophilenrekrutierung in das postischämische Gewebe erklärt [148, 149]. Darüber hinaus scheint auch PAI-1, der Inhibitor von tPA und uPA, an der Pathogenese des IRS involviert zu sein. Eine PAI-1-Defizienz oder die Blockade von PAI-1 führte zu einem verminderten Gewebeschaden [150, 151]. Insgesamt zeigen die bisherigen Forschungsergebnisse in verschiedenen Modellen einen deutlichen Einfluss von Komponenten des fibrinolytischen Systems auf die Entstehung des IRS. Die zugrunde liegenden Mechanismen blieben jedoch weitgehend unverstanden.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in diesem Kontext in vorausgegangenen Studien belegen, dass zirkulierendes Plasmin(ogen) in der initialen Reperfusionsphase in das postischämische Gewebe extravasiiert und dort perivaskuläre Mastzellen aktiviert. Im postischämischen Gewebe werden als Reaktion darauf unter anderem Lipidmediatoren wie Leukotrien B₄ (LTB₄) oder PAF freigesetzt, welche die intravaskuläre Adhärenz und Transmigration von neutrophilen Granulozyten in das postischämische Gewebe vermitteln. Gleichzeitig scheint Plasmin über die Aktivierung von MMP-2 und -9 selektiv die Transmigration von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gewebe zu medieren. Plasmin scheint in diesem Kontext ebenfalls in den postischämischen Umbauprozessen der perivenulären Basalmembran involviert zu sein. Diese Ergebnisse untermauern andere Beobachtungen, in denen eine systemische Applikation der Plasmininhibitoren ϵ -Aminocaprinsäure (EACA) oder Tranexamsäure (TXA) vor Induktion von Ischämie und Reperfusion eine deutliche

Verminderung der Akkumulation von Leukozyten im reperfundierten Gewebe zufolge hatte [101, 145, 146].

Wie die Plasminogenaktivatoren uPA und tPA die Entstehung des IRS beeinflussen, ist jedoch weiterhin nicht vollständig geklärt.

II. Zielsetzung

Folgende Ziele wurden für diese Studie definiert:

- a) Die Bedeutung des Plasminogenaktivators *tissue-type-plasminogen activator* (tPA) für die Rekrutierung von Leukozyten in das postischämische Gewebe zu analysieren sowie die zugrunde liegenden Mechanismen zu identifizieren.

- b) Die funktionelle Relevanz des Plasminogenaktivators *urokinase-type-plasminogen activator* (uPA) für die Extravasation von Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe nach Ischämie-Reperfusion zu definieren sowie die zugrunde liegenden Mechanismen zu charakterisieren.

III. Material und Methoden

1. Vorbemerkungen

Die folgenden Untersuchungen wurden in der Zeit von Oktober 2008 bis März 2014 mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (AZ 55.2-1-54-2531.84/09 und 55.2-1-54-2532-115-12) am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

2. Modelle

2.1 Versuchstiere

Zur Durchführung der Experimente wurden Mäuse unterschiedlicher Zuchtlinien als Versuchstiere verwendet. Die Bedeutung von tPA für die Leukozytenrekrutierung nach I/R sowie die Aufschlüsselung der zugrunde liegenden Mechanismen wurde anhand von männlichen Wildtyp (WT) C57BL/6 Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) und männlichen tPA-defizienten Mäusen (generiert aus kryokonservierten Embryonen auf dem C57BL/6-Hintergrund durch *The Jackson Laboratory*, Bar Harbor, Maine, USA) untersucht.

Zur Untersuchung der Bedeutung von uPA für die Leukozytenrekrutierung nach I/R sowie der Aufschlüsselung der zugrunde liegenden Mechanismen wurden männliche WT C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) und männliche uPA-defiziente Mäuse (generiert aus kryokonservierten Embryonen auf dem C57BL/6-Hintergrund durch *The Jackson Laboratory* und zur Verfügung gestellt von Sandip Kanse, Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, Deutschland) verwendet.

Die Versuchstiere wurden im Alter von 8 bis 12 Wochen mit einem Körpergewicht von 20 bis 25 g Körpergewicht in den Versuchen eingesetzt. Sie wurden durch die hauseigene

Tierhaltung in Gruppen von 3 bis 5 Tieren in Makrolon-Käfigen gehalten. Es wurde auf die Einhaltung des Tag- und Nachtrhythmus, freien Zugang zu Standardfutter und Wasser sowie die Vermeidung von Stressfaktoren geachtet.

2.2 Narkose

Zur Anästhesie der Versuchstiere vor Durchführung der Experimente wurde in einem ersten Schritt eine Kurznarkose mit einem Gemisch aus Isofluran (5,0 Vol.%; Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und N₂O bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0,35 eingeleitet. Anschließend wurde eine Kombination aus Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht (KG)), Xylazin (10 mg/kg KG) und Kochsalzlösung im Verhältnis 2,5 : 0,5 : 7 mittels intraperitonealer Injektion appliziert. Die Narkose wurde durch wiederholte Injektionen mit einer Kombination aus Ketamin (100 mg/kg KG) und Kochsalzlösung im Verhältnis 3 : 7 aufrechterhalten. Durch den Einsatz von Heizplatten und Heizstrahlern wurde die Körpertemperatur der Versuchstiere während der Narkose der Versuchstiere konstant gehalten.

Zur intraskrotalen Injektion und Applikation von Reagenzien wurde eine einminütige Kurznarkose mit einem Gemisch aus Isofluran (Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und N₂O bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0,35 angewandt. Initial wurden zur Einleitung der Narkose 5,0 Vol.% Isofluran eingesetzt und diese mit 1,0 – 2,0 Vol.% Isofluran aufrechterhalten.

2.3 Chirurgische Technik

2.3.1 Präparation des *M. Cremaster* und Katheterisierung der *A.*

femoralis

Die Präparation des Kremastermuskels bietet eine hervorragende Möglichkeit, Zugang zur Mikrozirkulation eines lebenden Tieres zu erlangen. In Verbindung mit Transilluminations- oder Fluoreszenzintravitalmikroskopie können in Echtzeit verschiedenste Vorgänge in der Mikrozirkulation visualisiert werden.

Die Durchführung der chirurgischen Präparation des Kremastermuskels erfolgte unter Verwendung eines Operationsmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland, 5 – 42-fache Vergrößerung) mit kleineren Modifikationen nach der Erstbeschreibung von Baez [152].

Die Einleitung der Narkose erfolgte wie in Kapitel III/2.2 beschrieben. Anschließend wurden die Mäuse auf einer beheizbaren Plattform fixiert. Danach wurde die Haut über der linken Leistenregion der Maus eröffnet, die *A. femoralis* aus der Gefäß-Nerven-Scheide des linken Beines präpariert und retrograd mit einem Polypropylenkatheter (Innendurchmesser 0,28 mm, Portex, Lythe, Großbritannien) kanüliert. Der Katheter wurde mittels zweier Ligaturen fixiert und die Wunde fortlaufend vernäht. Während der folgenden chirurgischen Präparation des *M. cremaster* wurde das Gewebe mit einer ~ 37°C warmen, gepufferten physiologischen Salzlösung superfundiert. Zur Präparation wurde der rechte Hoden freigelegt, indem das Skrotum ventral inzidiert und das Bindegewebe vom Hoden entfernt wurde. Der Kremastermuskel wurde nach Elektrokoagulation mittels einer bipolaren Pinzette vorsichtig ventral eröffnet und über einem transparenten Podest einer spezialgefertigten Bühne aufgespannt. Daraufhin wurden Nebenhoden und Hoden mittels Elektrokoagulation der bipolaren Pinzette vom Kremastermuskel getrennt und vorsichtig zurück in die Bauchhöhle geschoben, wodurch der Muskel optimal für die Intravitalmikroskopie zugänglich wurde.

2.3.2 Stimulation des *M. cremaster* durch intraskrotale Injektion

Zur Vorbereitung der intraskrotalen Injektion wurde das Versuchstier mittels Kurznarkose anästhesiert (vgl. Kapitel III/2.2) und auf einer beheizbaren Platte fixiert. Entsprechend des anzuwendenden Versuchsprotokolls wurde die zu applizierende Substanz mit einer feinen Kanüle (30 G) intraskrotal injiziert. Nach Wiedererwachen der Tiere wurden diese in Einzelkäfigen gehalten und hatten bis zur chirurgischen Präparation freien Zugang zu Wasser sowie Standardfutter (ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland).

2.3.3 Reversible, globale Ischämie und Reperfusion des *M.*

cremaster

Um die Effekte einer reversiblen, globalen Ischämie und Reperfusion auf die Mikrozirkulation zu untersuchen, wurde ein Katheter in die linke *A. femoralis* gelegt und der Kremastermuskel präpariert (Vgl. Kap. III/2.3.1). Durch Abklemmen des freipräparierten *M. cremaster* an seiner Basis mit einer Gefäßklemme (Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), kam es zu einer Unterbrechung des Blutflusses in den zu- wie auch abführenden Gefäßen und damit einer globalen Ischämie des Muskels. Die Reperfusion wurde durch das Entfernen der Klemme eingeleitet. Die erfolgreiche Induktion der Ischämie respektive Reperfusion wurde intravitalmikroskopisch verifiziert. Die Ischämie- und Reperfusionszeiten sowie die Untersuchungszeitpunkte und -modalitäten wurden nach dem anzuwendenden Versuchsprotokoll gewählt. Für Kontrolltiere (scheinoperierte Tiere) wurde dasselbe chirurgische Protokoll benutzt. Die Gefäßklemme an der Basis des *M. cremaster* wurde jedoch nur kurz – für etwa drei Sekunden – angesetzt und geschlossen. Anschließend wurde die Zeit der „Ischämiephase“ abgewartet und danach, entsprechend dem Versuchsprotokoll, der weitere Versuch durchgeführt.

2.3.4 Reversible Ischämie und Reperfusion der Leber

Die Versuchstiere wurden, wie in Kapitel III/2.2 beschrieben, narkotisiert. Zusätzlich wurde wegen der Schwere des Eingriffes ein Opiat intraperitoneal appliziert. Zu Beginn des Experiments, nach Einleitung der Narkose, wurde der Bauchraum durch eine Laparotomie über einen Medianschnitt eröffnet. Wie bereits beschrieben, wurde eine warme Ischämie des linken Leberlappens für 90 Minuten durch das reversible Abklemmen der versorgenden Gefäße mit einer Gefäßklemme (Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) erzielt [153]. Am Ende jedes Experimentes – nach 90 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion – wurden Gewebe- und Blutproben entnommen. Die Blutproben wurden zeitnah bei ~750 g für 10 Minuten zentrifugiert und bei -80° C gelagert. Die Aktivität der Serumenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT) und Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT) wurde mit Hilfe eines automatisierten Analysegeräts (Hitachi 917, Roche-Boehringer Mannheim Co., Deutschland) in Kombination mit einem standardisierten Testsystem (HiCo GOT and HiCo GPT, Roche-Boehringer Mannheim Co., Deutschland) gemessen. Der linke Leberlappen wurde zur Quantifizierung und Phänotypisierung der transmigrierten Leukozyten für immunhistochemische Färbungen fixiert und in Paraffin eingebettet.

2.3.5 Isolation und Transfer von Knochenmarksleukozyten

Um den Einfluss der leukozytären Expression von tPA beziehungsweise uPA von dem der nicht-leukozytären Expression von tPA beziehungsweise uPA auf die Leukozytenrekrutierung zu differenzieren, wurde eine Zelltransfertechnik, wie bereits beschrieben, angewandt [154]. In einem ersten Schritt wurden die Röhrenknochen *Femur* und *Tibia* aus Versuchstieren nach deren Tötung (zervikale Dislokation unter Narkose) präpariert. Knochenmarkszellen (> 90 % neutrophile Granulozyten) wurden anschließend durch vorsichtiges Spülen von *Femur* und *Tibia* mit gekühltem PBS (*phosphate buffered saline*)

isoliert. Die gewonnenen Zellen wurden gesiebt (Cell Strainer, 70 µm, white; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) und gezählt (Coulter® AC-T-Serie; Coulter Corporation) und anschließend mit Calcein-AM (10 µM Lösung bei RT für 30 Minuten) gefärbt. Nach zwei Waschgängen mit PBS wurden die Zellen einer Empfängermaus mittels Schwanzvenenpunktion intravenös transfundiert (10⁷ Zellen/ Empfängermaus). 120 Minuten nach Transfusion der Zellen wurde mit der chirurgischen Präparation des Kremastermuskels begonnen (Vgl. Kapitel III/2.3). Die fluoreszierenden Zellen wurden in 175 Gesichtsfeldern pro Kremastermuskel ausgezählt. Die Anzahl der Gesichtsfelder entspricht in etwa der kompletten quantifizierbaren Fläche eines aufgespannten Kremastermuskels. Die Ergebnisse wurden als Anzahl der adhären oder transmigrierten Calcein-positiven Zellen pro Gesichtsfeld dargestellt.

2.4 Intravitalmikroskopie

2.4.1 *Reflected Light Oblique Transillumination*-Mikroskopie

Zur Durchführung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde ein Olympus BX 50 Aufrecht-Mikroskop (Olympus Mikroskopie, Hamburg, Deutschland) benutzt. Als Lichtquelle wurde eine 75-W Xenonlampe eingesetzt, deren Licht mittels eines galvanometrischen Scanners (Polychrome II, TILL Photonics, Gräfelfing, Deutschland) monochromatischem Licht der Wellenlänge 700 angenähert und anschließend auf das Untersuchungsobjekt geleitet wird. Ein Teil des ankommenden Lichts wird dabei vom Gewebe reflektiert, der andere Teil des Lichts wird durch das Gewebe geleitet, anschließend durch eine schräge, spiegelnde Oberfläche (Reflektor) direkt unterhalb des Untersuchungsobjekts reflektiert und zurück durch das Gewebe geleitet. Der Reflexionswinkel des Reflektors wurde relativ zur Horizontalebene gedreht. Der Reflektor besteht aus einem mit einer Aluminiumschicht überzogenen (Freichel, Kaufbeuren, Deutschland) runden Deckglas (Dicke 0,19 – 0,22 mm, Durchmesser 11,8 mm). Durch diesen technischen Aufbau, die sogenannte *reflected light*

oblique transillumination-Mikroskopie (RLOT) können verschiedenste Strukturen im Gewebe (z. B. Leukozyten) in hoher Bildqualität und ohne den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen visualisiert werden [155]. Unter Anwendung von Wasserimmersionslinsen (Olympus Mikroskopie, 20x/Numerische 28 Apertur (NA) 0.5 und 40x/NA 0.8), einer analogen schwarz/weiss Videokamera (Cohu 4920, Cohu, San Diego, CA, USA) und einem analogen Videorekorder (AG-7350-E, Panasonic, Tokyo, Japan) wurden die intravitalmikroskopischen Aufnahmen generiert.

2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden ebenfalls an dem Olympus BX 50 Aufrecht-Mikroskop (Olympus Mikroskopie, Hamburg, Deutschland) angefertigt. Mittels eines mit dichroitischen Filtern sowie Emissionsfiltern (DCLP 500, LP515, Olympus Mikroskopie) ausgestatteten Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Filterblocks wurde annäherungsweise monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm erzeugt und auf das Präparat geleitet. Damit konnten Fluoreszenzfarbstoffe wie beispielsweise FITC, Calcein AM oder Fluoreszein angeregt werden. Entsprechend der RLOT-Mikroskopie wurden die intravitalmikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen unter Anwendung von Wasserimmersions-linsen (Olympus Mikroskopie, 20x/Numerische 28 Apertur (NA) 0.5 und 40x/NA 0.8), einer analogen schwarz/weiss Videokamera (Cohu 4920, Cohu, San Diego, CA, USA) und einem analogen Videorekorder (AG-7350-E, Panasonic, Tokyo, Japan) generiert.

2.5 Konfokalmikroskopie

Zur Bestimmung der Proteinexpression im Gewebe wurde der Kremastermuskel, wie bereits beschrieben, in 4 % Paraformaldehyd fixiert [117]. Das Gewebe wurde anschließend mit einer 10 % Ziegenserum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)/0,5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich)/PBS Lösung geblockt und permeabilisiert. Nach Inkubation des Kremastermuskels mit dem gegen die zu untersuchenden Proteine gerichteten primären Antikörpern bei 4° C für 12 h, wurde das Gewebe mit PBS gespült und anschließend mit entsprechenden sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpern (fluoreszenzmarkiert mit Alexa 488 oder Alexa 546) für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde der immungefärbte Kremastermuskel in PermaFluor (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) auf einem Objektträger mit einem Deckplättchen befestigt. Für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurde ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop (Leica SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) mit einer Öl-Immersion-Linse (Leica; 40x/NA 1.25–0.75) verwendet.

Zur Analyse der Expression von tPA wurden primäre Antikörper gegen tPA (Ziege anti-Maus; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Gr-1 (Ratte anti-Maus; eBioscience, San Diego, CA, USA) oder PECAM-1 (Ratte anti-Maus; Santa Cruz Biotechnology) verwendet. Die Expressionsanalyse von uPA wurde mit Hilfe eines primären, polyklonalen anti-uPA Antikörpers aus dem Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology) und eines anti-Maus anti-CD62E/E-Selektin Antikörpers aus der Ratte (Abcam, Cambridge, UK) durchgeführt.

2.6 Quantifizierung der Leukozytenkinetik und der mikrohämodynamischen Parameter

Zur Analyse der die Leukozytenextravasation beschreibenden Parameter wurde die Bildanalysesoftware „Cap-Image“ (Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Als rollende Leukozyten wurden diejenigen Leukozyten definiert, welche sich aufgrund von

Margination und Endothelzellkontakt im Vergleich zum Blutfluss langsamer bewegten. Dabei wurde die Anzahl der eine quer über das Gefäß gelegte Linie überquerenden, rollenden Leukozyten pro 30 Sekunden bestimmt. Als fest adhärent wurden Leukozyten definiert, welche im Blutstrom länger als 30 Sekunden fest an der Gefäßwand hafteten. Ausgewertet wurde die Anzahl der fest adhären Leukozyten im Bereich eines geraden und unverzweigten Gefäßsegments von 100 µm Länge und diese Anzahl relativ auf die luminale Gefäßoberfläche umgerechnet. Transmigrierte Zellen wurden in sogenannten „regions of interest“ (ROI) ausgezählt, welche paravaskulär auf beiden Seiten des Gefäßes lagen. Dabei wurde pro Gefäßseite eine Region als Rechteck definiert, deren Längsseite auf einer Strecke von 100 µm entlang der Gefäßwand gewählt wurde und im rechten Winkel dazu 75 µm in das Gewebe hineinreichte. Schließlich wurde die Anzahl transmigrierter Leukozyten pro Gefäßseite miteinander addiert und pro $10^4 \mu\text{m}^2$ Fläche angegeben.

Durch die Berechnung der Distanz, welche von im Blutfluss mitschwimmenden, grün fluoreszierenden Mikrosphären (0,96 µm Durchmesser; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) innerhalb einer Sekunde zurückgelegt wurde, wurde die zentrale Blutfließgeschwindigkeit bestimmt. Die Mikrosphären wurden über den Katheter in der *A. femoralis* injiziert und die frei in der Mittellinie des Gefäßes schwimmenden Mikrosphären zur Berechnung herangezogen. Aus den gemessenen Gefäßdurchmessern und der zentralen Blutfließgeschwindigkeit wurde anschließend die Wandscherrate unter der Annahme einer parabolischen Flussgeschwindigkeitskurve über den Gefäßquerschnitt berechnet.

2.7 Systemische Leukozytenzahl

Zur Quantifizierung der im Blutkreislauf zirkulierenden Leukozyten wurde nach Abschluss des Versuchs aus der *V. cava* Vollblut entnommen und daraus mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Coulter® AC-T-Serie; Coulter Corporation) die systemische Leukozytenzahl [$n \times 10^3$ pro µl] bestimmt.

2.8 Analyse der Leukozyten-Transmigrationswege

Zur Analyse der Leukozyten-Transmigrationswege wurde das der murine Kremastermuskel präpariert und die *A. femoralis* katheterisiert (vgl. Kapitel III/2.3). Durch die intraarterielle Injektion eines nicht-blockierenden, monoklonalen Alexa Fluor 488-konjugierten anti-CD31/PECAM-1 Antikörpers (eBioscience, San Diego, CA, USA) ließen sich die Endothelzell-Kontakte in postkapillären Venolen darstellen. Direkt im Anschluss wurden Leukozyten mittels RLOT-Mikroskopie visualisiert (vgl. Kapitel III/2.6.1). Zur Analyse der Leukozyten-Transmigrationswege wurden schließlich RLOT- (vgl. Kapitel III/2.6.1) und *In-vivo*-Fluoreszenzmikroskopie (vgl. Kapitel III/2.6.2) mittels eines Axio-Tech-Vario 100 Mikroskops (Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland), welches zur Fluoreszenz-Epiillumination mit einer multiplen LED Quelle ausgerüstet ist (Zeiss Colibri), kombiniert.

2.9 Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität *in vivo*

Als Maß für die mikrovaskuläre Permeabilität wurde die Extravasation des Makromoleküls FITC-Dextran (5 mg in 0,1 ml Kochsalzlösung/333 mM, relative Molekülmasse 150.000 Da, Sigma-Aldrich) aus Gefäßen der Mikrozirkulation des *M. cremaster* quantifiziert. Nach Präparation des Kremastermuskels (vgl. III/2.3) wurden fünf postkapilläre Venolen mit einem Innendurchmesser von 20 bis 30 µm aufgesucht und die mittlere Blutflussgeschwindigkeit bestimmt. Anschließend wurde FITC-Dextran über den Katheter in der *A. femoralis* appliziert. 30 Minuten nach Injektion wurden die fünf Gefäße einschließlich des umliegenden perivaskulären Gewebes mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt und die Emission > 515 nm anhand einer CCD Kamera (Sensicam, PCO, Kelheim, Deutschland) und einem passenden Emissionsfilter (LP 515) aufgenommen. Für die Analyse der Extravasation von FITC-Dextran wurden die mittleren Grauwerte der Fluoreszenzintensität mit Hilfe einer Bildanalysesoftware (TILLvision 4.0, TILL Photonics) in sechs zufällig gewählten 50x50 µm großen Bereichen gemessen, die in 50 µm Abstand zur zu beobachtenden postkapillären

Venole lagen. Abschließend wurde der Mittelwert der Grauwerte als Maß für die Extravasation von FITC-Dextran und damit der mikrovaskulären Permeabilität berechnet.

2.10 Bestimmung der Permeabilität von Endothelzellschichten

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (CDC/EU.HMEC-1) wurden auf Kollagen G-beschichteten Transwell® Zellkulturplatteneinsätzen (Polyester Membran, Porengröße 0,4 µm; Corning, Amsterdam, Niederlande) ausgesät und in Endothelzell-Wachstumsmedium (Promocell, Heidelberg, Deutschland) mit 10 % FCS (Promocell) bis zur Konfluenz der Zellen kultiviert. Die Zellen wurden entweder nicht (Kontrolle) oder mit unterschiedlichen Konzentrationen an humanem tPA behandelt. In zusätzlichen Experimenten wurden Zellen 15 Minuten mit *receptor-associated protein* (RAP; 100 µg/ml) vorbehandelt, bevor tPA (100ng/ml) hinzugegeben wurde. Darüber hinaus wurden Zellen in Experimenten mit einer Kombination aus tPA und PAI-1 (jeweils 100 ng/ml) behandelt. Dafür wurde die Kombination angemischt und vor Zugabe zu den Zellen für 5 Minuten in einem separaten Röhrchen bei Raumtemperatur inkubiert.

Für das Experiment wurde FITC-Dextran (40 kDa, 1 mg/ml; Sigma-Aldrich) in das obere Kompartiment hinzugegeben. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 5, 10, 15, 30$ und 60 Minuten wurden Proben aus dem unteren Kompartiment für Fluoreszenzmessungen entnommen (Exzitationswellenlänge: 485 nm; Emissionswellenlänge: 535 nm), welche mit Hilfe eines Fluoreszenz-Plattenlesegerät (SpectraFluor Plus, Tecan) analysiert wurden. Die Daten des Zeitpunktes $t = 30$ Minuten wurden zur statistischen Auswertung verwendet.

Diese Experimente wurden von unserem Kooperationspartner Professor Stefan Zahler (Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München, München/Deutschland) durchgeführt.

2.11 Mastzellfärbung

Um die Anzahl und Lokalisation von Mastzellen relativ zu den Gefäßen der Mikrozirkulation des Kremastermuskels zu bestimmen, wurde eine Ruthenium-Rot-Färbung angewandt. Dafür wurde der Kremastermuskel für 30 Minuten mit einer 0,001 % Ruthenium- Rot-Lösung (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) superfundiert und anschließend in PermaFluor (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) auf einem Objektträger mit Deckplättchen befestigt. Die quantitative Auswertung der Anzahl der Ruthenium-Rot positiven Zellen erfolgte anhand so genannter „regions of interest“ (ROI) an einem Durchlichtmikroskop (Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland).

2.12 mRNA Expressionsanalyse (qRT-PCR)

Die Messung der mRNA-Expression von 5-Lipoxygenase (5-LO) und Lyso-PAF-Azetyltransferase (LPCAT) erfolgte wie folgend beschrieben: Der gesamte RNA-Inhalt des zu untersuchenden Kremastermuskels wurde mittels des „*RNeasy Mini Kits*“ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) entsprechend der Bedienungsanleitung des Herstellers extrahiert. Die reverse Transkription wurde mit Hilfe des „*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*“ (Applied Biosystems, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Für die quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurde das „*TaqMan® Universal Master Mix Kit*“ zusammen mit einem „*7300 Real-Time PCR System*“ (allApplied Biosystems, Hamburg, Deutschland) angewandt. Primer und Sonden wurden aus dem „*TaqMan Gene Expression Assay*“ Katalog von ABI (Foster City, California, USA) (5-LO: Mm01182750_m1; LPCAT:Mm00557141_m1) sowie von Biomers (Ulm, Deutschland) (GAPDH forward: 5'-tgc agt ggc aaa gtg gag at-3'; GAPDH reverse: 5'-tgc cgt gag tgg agt cat act-3'; bp 1-1254; *gene bank accession number* NM_008084; GAPDH TaqMan Sonde: 5'-FAM-cca tca acg acc cct tca ttg acc tc- BHQ-3') bezogen. GAPDH wurde als internes „Housekeeping-Gen“ verwendet.

Die Menge der mRNA wurde anhand eines von Pfaffl und Kollegen entwickelten mathematischen Modells berechnet [156].

Diese Experimente wurden von unserem Kooperationspartner Professor Stefan Zahler (Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München, München/Deutschland) durchgeführt.

2.13 Durchflusszytometrie

Zur quantitativen Analyse der Expression von Oberflächenproteinen auf murinen Leukozyten aus Blut oder Knochenmark sowie pulmonalen Endothelzellen wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die Zellen wurden aus männlichen Wildtypmäusen isoliert. Zur Endothelzellgewinnung wurden die Lungenflügel von Versuchstieren nach Tötung entnommen, zerkleinert und anschließend enzymatisch verdaut. Die entstandene Einzelzellsuspension wurde mit einer Immunfärbung gegen VE-Cadherin (BD Pharmingen, San Diego, CA) als Endothelmarker und dem Antikörper des gesuchten Oberflächenmarkers (anti-uPA AK oder anti-tPA AK; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) gefärbt. VE-Cadherin positive Zellen wurden ausgewählt und die Fluoreszenzintensität im Kanal des zu bestimmenden Fluoreszenzantikörpers gemessen. Leukozyten wurden entweder aus heparinisiertem Vollblut oder aus einer Knochenmarksspülung gewonnen (Vgl. Kap. III/2.10). Um einer Kontamination mit Erythrozyten vorzubeugen, wurden diese mit einer hypotonen Lösung lysiert. Nachfolgend wurde eine Immunfärbung für Ly-6G, CD11b und dem gesuchten Oberflächenmarker (uPA oder tPA; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durchgeführt. Nach Zentrifugieren und zweimaligem Waschen wurden die Zellen mittels einer 4 % gepufferten Paraformaldehydlösung fixiert. Neutrophile Granulozyten wurden über Ly-6G, CD11b und die Granularität (*side catter*) bestimmt. In weiteren Experimenten wurden Knochenmarkszellen wie oben beschrieben (Vgl. Kap. III/2.3.5) entnommen und mit PBS oder aufsteigenden Konzentrationen von Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP;

1-100 ng/ml) inkubiert. Die Expression von CD62L und CD11b auf neutrophilen Granulozyten wurde mittels Durchflusszytometrie (Gallios, Beckman Coulter) analysiert. Neutrophile Granulozyten wurden durch die hohe Expression von CD45, CD11b und GR-1 sowie die niedrige Expression von CD115 identifiziert

Diese Experimente wurden teilweise von unserem Kooperationspartner Professor Stefan Zahler (Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Deutschland) durchgeführt.

2.14 Immunhistochemie

Um die in das Gewebe transmigrierten Leukozyten zu phänotypisieren und zu quantifizieren, wurde eine immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten des Kremastermuskels und der Leber durchgeführt. Die Gewebeproben wurden in 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) fixiert und in Paraffin eingebettet. Unter Verwendung eines Mikrotoms wurden die eingebetteten Gewebeproben geschnitten (Schnittdicke ~ 6 µm). Die erzeugten Gewebeschnitte wurden mit primären anti-Maus anti-Ly-6G, anti-CD45 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) oder anti-F4/80 (Serotec, Oxford, UK) IgG Antikörpern aus der Ratte inkubiert. Anschließend wurden die Paraffinschnitte mit einem kommerziell erhältlichen Immunhistochemie Kit gefärbt (*Super Sensitive Link-Label ICH detection system*, BioGenex, San Ramon, CA, USA). Als Ergebnis erhielt man eine gut sichtbare rötliche Färbung. Am Schluss wurden die Schnitte mit Mayer's Hämalaunlösung gegengefärbt. Die Anzahl der extravaskulär lokalisierten Ly-6G-, CD45- oder F4/80-positiven Zellen wurde mittels Lichtmikroskopie (400x Vergrößerung) in sechs Abschnitten (10 Gesichtsfelder pro Abschnitt) von sechs unterschiedlichen Versuchstieren pro Versuchsgruppe verblindet ausgezählt. Die Anzahl der transmigrierten Ly-6G-positiven Zellen (neutrophile Granulozyten) und F4/80-positiven Zellen (Monozyten/Makrophagen) wurde als Anteil aller CD-45-positiven Leukozyten dargestellt.

2.15 Zymographie

Es wurden folgende Plasmaproben gesammelt: Blutplasma von scheinoperierten WT Kontrolltieren, sowie von WT Tieren, die entweder i) mit Heparin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland; 4 mg/kg i.a.; entspricht 300 USP U/kg) oder dem entsprechenden iii) Vehikel behandelt wurden und danach Ischämie und Reperfusion des rechten Kremastermuskels (30 Minuten/120 Minuten) unterzogen wurden. Die Zymographie basiert auf einer Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) und wurde so durchgeführt, wie sie bereits beschrieben wurde [157]. Die durch das Gel wandernden Proteine werden zuerst mit negativ geladenem Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) beladen und danach nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Zymographie-Gel enthält zusätzlich Casein, das enzymatisch abgebaut werden kann und helle Banden erzeugt, welche auf die enzymatische Aktivität hinweisen. Für die Versuche wurde zwei Mikroliter Plasma mit SDS Probenpuffer gemischt und auf eine 10 % SDS-PAGE geladen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel – zum Entfernen des SDS – intensiv mit PBS, das Triton X-100 (2,5 % W/V) enthielt, gewaschen. Das Gel wurde auf eine Auflage aus Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (0,8 % W/V) aufgelegt, das Casein (2 % W/V) und Plasminogen (40 µg/ml) enthielt und für 48 Stunden bei 37° C koinkubiert. Anschließend wurden Aufnahmen erstellt.

Diese Experimente wurden von unserem Kooperationspartner Professor Sandip Kanse (Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, Deutschland) durchgeführt.

3. Versuchsprotokolle

3.1 Analyse der Leukozytenrekrutierung im Kremastermuskel der Maus

3.1.1 nach I/R

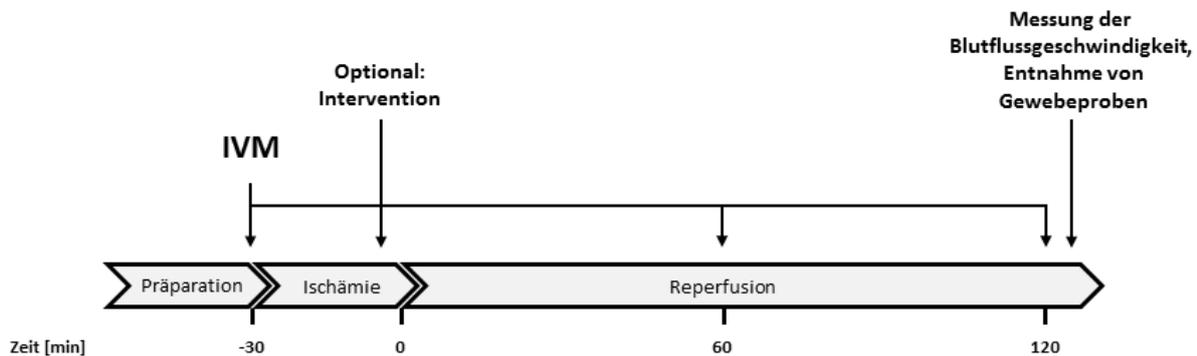


Abb. III/1: Experimentelles Protokoll zur Untersuchung des leukozytären Rekrutierungsprozess nach Ischämie und Reperfusion.

Zur Untersuchung des Effektes von Ischämie und Reperfusion auf die Leukozytenrekrutierung (Rollen, feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten) im Kremastermuskel der Maus, wurde folgendes Protokoll erstellt: Nach Einleitung einer Narkose (Vgl. Kap. III/2.2) wurde der Kremastermuskel der Maus präpariert (Vgl. Kap. III/2.3.1). Anschließend wurde der Kremastermuskel mit einer Gefäßklemme für 30 Minuten abgeklemmt und somit eine globale Ischämie des Muskels induziert (Vgl. Kap. III/2.3.3). Die Reperusionsphase wurde durch Entfernung der Gefäßklemme eingeleitet. Entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll wurden optional Interventionen oder entsprechende Kontrollen vor Einleitung der Reperusionsphase durchgeführt. Zur Untersuchung der einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung wurden intravitalmikroskopische Aufnahmen von drei zufällig ausgewählten und voneinander unabhängigen postkapillären Venolen des Kremastermuskels sowohl vor Induktion der Ischämie (Baseline) sowie nach 60 Minuten und

120 Minuten Reperfusion durchgeführt (Vgl. Kap III/2.4.1). Anschließend wurden die Blutfließgeschwindigkeit sowie die systemische Leukozytenzahl im Blut bestimmt und Gewebeproben entnommen.

3.1.2 nach intraskrotaler Stimulation

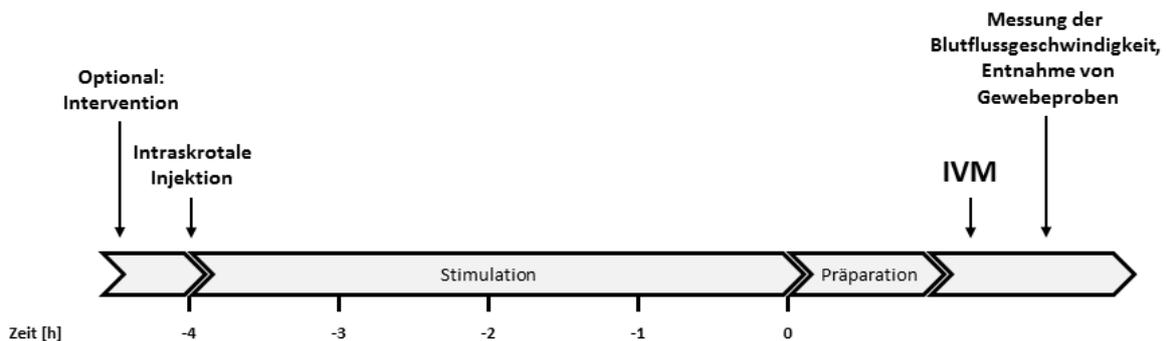


Abb. III/2: Experimentelles Protokoll zur Untersuchung des leukozytären Rekrutierungsprozess nach intraskrotaler Stimulation.

Zur Untersuchung des Effektes von intraskrotal applizierten Substanzen auf die Leukozytenrekrutierung (Rollen, feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten) im Kremastermuskel der Maus, wurde folgendes Protokoll erstellt: Während einer Kurznarkose (Vgl. Kap. III/2.2) wurde der zu untersuchende Stimulus intraskrotal injiziert (Vgl. Kap. III/2.3.2). Entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll wurden optional Interventionen oder entsprechende Kontrollen vor der Injektion des Stimulus durchgeführt. Nach einer Stimulationsphase von vier Stunden wurde nach Induktion einer Narkose (Vgl. Kap. III/2.2) der Kremastermuskel der Maus präpariert (Vgl. Kap. III/2.3.1). Anschließend wurden intravitalmikroskopische Aufnahmen von fünf zufällig ausgewählten und voneinander unabhängigen postkapillären Venolen des Kremastermuskels zur Analyse der Leukozytenrekrutierung erstellt (Vgl. Kap III/2.4.1). Danach wurden die Blutfließgeschwindigkeit sowie die systemische Leukozytenzahl im Blut bestimmt und Gewebeproben entnommen.

3.2 Analyse der mikrovaskulären Permeabilität im Kremastermuskel der Maus

3.2.1 nach I/R

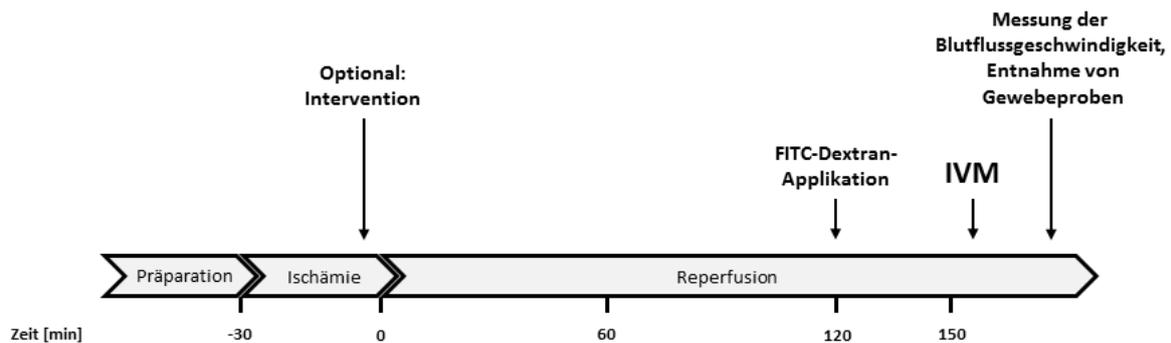


Abb. III/3: Experimentelles Protokoll zur Untersuchung der mikrovaskulären Permeabilität nach Ischämie und Reperfusion.

Zur Untersuchung des Effektes von Ischämie und Reperfusion auf die mikrovaskuläre Permeabilität wurde folgendes Protokoll erstellt. Nach Einleitung einer Narkose (Vgl. Kap. III/2.2) wurde der Kremastermuskel der Maus präpariert (Vgl. Kap. III/2.3.1). Anschließend wurde der Kremastermuskel mit einer Gefäßklemme für 30 Minuten abgeklemmt und somit eine globale Ischämie induziert (Vgl. Kap. III/2.3.3). Die Reperusionsphase wurde durch Entfernung der Gefäßklemme eingeleitet. Entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll wurden optional Interventionen oder entsprechende Kontrollen vor Einleitung der Reperusionsphase durchgeführt. Nach 30 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion wurde FITC-Dextran intraarteriell appliziert. Intravitalmikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von fünf zufällig ausgewählten und voneinander unabhängigen postkapillären Venolen des Kremastermuskels wurden zur Analyse der mikrovaskulären Permeabilität 30 Minuten nach FITC-Dextraninjektion erstellt (Vgl. Kap III/2.7). Anschließend wurden die Blutflussgeschwindigkeit sowie die systemische Leukozytenzahl im Blut bestimmt und Gewebeproben zur weiteren Analyse entnommen.

3.2.2 nach intraskrotaler Stimulation

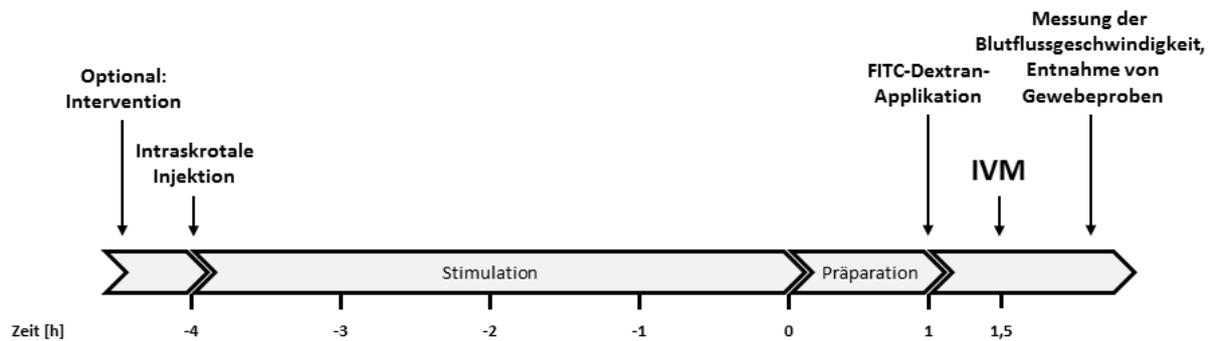


Abb. III/2.4: Experimentelles Protokoll zur Untersuchung der mikrovaskulären Permeabilität nach intraskrotaler Stimulation.

Zur Untersuchung des Effektes von intraskrotal applizierten Substanzen auf die mikrovaskuläre Permeabilität wurde folgendes Protokoll erstellt: Während einer Kurznaarkose (Vgl. Kap. III/2.2) wurde der zu untersuchende Stimulus intraskrotal injiziert (Vgl. Kap. III/2.3.2). Entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll wurden optional Interventionen oder entsprechende Kontrollen vor der Injektion des Stimulus durchgeführt. Nach einer Stimulationsphase von vier Stunden wurde nach Induktion einer Narkose (Vgl. Kap. III/2.2) der Kremastermuskel der Maus präpariert (Vgl. Kap. III/2.3.1) und intraarteriell FITC-Dextran appliziert. Intravitalmikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von fünf zufällig ausgewählten und voneinander unabhängigen postkapillären Venolen des Kremastermuskels wurden zur Analyse der mikrovaskulären Permeabilität 30 Minuten nach FITC-Dextraninjektion durchgeführt (Vgl. Kap. III/2.7). Danach wurden die Blutflussgeschwindigkeit sowie die systemische Leukozytenzahl im Blut bestimmt und Gewebeproben zur weiteren Analyse entnommen.

3.3 Analyse der Rekrutierung fluoreszenzmarkierter transfundierter Leukozyten im Kremastermuskel der Maus

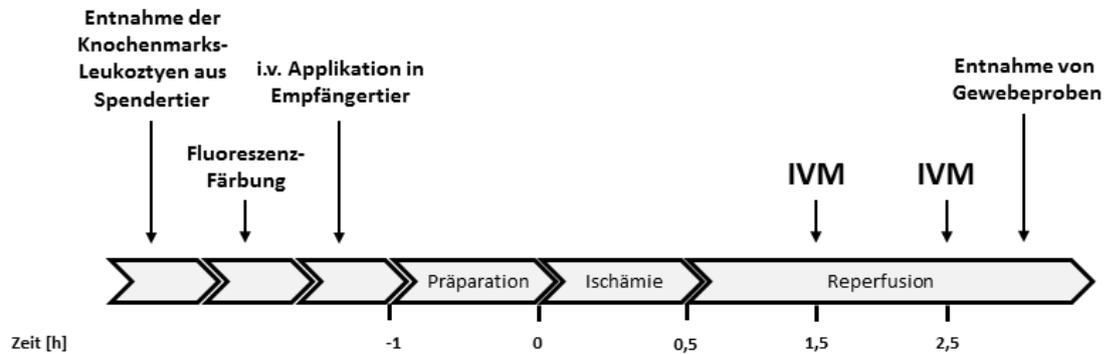


Abb. III/2.4: Experimentelles Protokoll zur Untersuchung der Rekrutierung fluoreszenzmarkierter transfundierter Leukozyten nach Ischämie und Reperfusion

Um den Einfluss der leukozytären Expression von tPA bzw. uPA von dem der nicht-leukozytären Expression von tPA bzw. uPA auf die Leukozytenrekrutierung zu differenzieren, wurde eine Zelltransfertechnik angewandt. Dafür wurde folgendes Protokoll erstellt: In einem ersten Schritt wurden Knochenmarksleukozyten einer Spendermaus entnommen und aufgereinigt. Anschließend wurden diese mit Calcein AM gefärbt und der Empfängermaus während einer Kurznarkose (Vgl. Kap. III/2.2) mittels Schwanzvenenkatheter transfundiert. Nach einer zweistündigen Zirkulationszeit wurde eine Narkose induziert (Vgl. Kap. III/2.2) und der Kremastermuskel der Maus präpariert (Vgl. Kap. III/2.3.1). Anschließend wurde der Kremastermuskel mit einer Gefäßklemme für 30 Minuten abgeklemmt und somit eine globale Ischämie des Muskels induziert (Vgl. Kap. III/2.3.3). Die Reperfusionphase wurde durch Entfernung der Gefäßklemme eingeleitet. Intravitalmikroskopische Aufnahmen des gesamten Kremastermuskels wurden nach 60 Minuten und 120 Minuten Reperfusion zur Analyse der Rekrutierung der gefärbten transfundierten Leukozyten durchgeführt (Vgl. Kap III/2.4.2). Anschließend wurden die systemische Leukozytenzahl im Blut bestimmt sowie Gewebeprobe zur weiteren Analyse entnommen.

3.4 Analyse des Gewebeschadens und der Leukozytenrekrutierung in der Leber der Maus nach Ischämie und Reperfusion

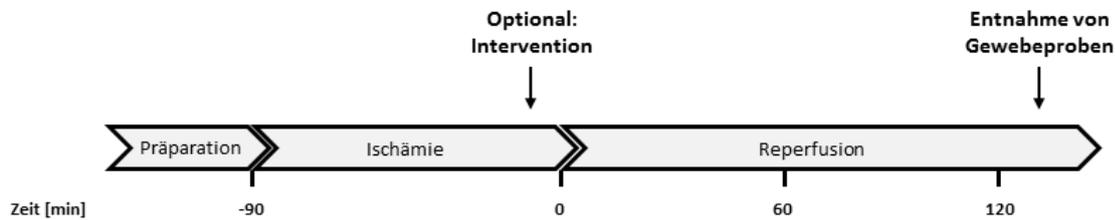


Abb. III/2.1: Experimentelles Protokoll zur Untersuchung des leukozytären Rekrutierungsprozess und der Organschädigung in der Leber nach Ischämie und Reperfusion

Zur Untersuchung des Effektes von Ischämie und Reperfusion auf die Leukozytenrekrutierung und den Gewebeschaden der Leber, wurde folgendes Protokoll erstellt: Nach Einleitung einer Narkose (Vgl. Kap. III/2.2) wurde die Leber der Maus präpariert. Anschließend wurde die Leber mit einer Gefäßklemme für 90 Minuten abgeklemmt und somit eine partielle Ischämie der Leber induziert (Vgl. Kap. III/2.3.4). Die Reperusionsphase wurde durch die Entfernung der Gefäßklemme eingeleitet. Entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll wurden optional Interventionen oder entsprechende Kontrollen vor Einleitung der Reperusionsphase durchgeführt. Nach einer 120 Minuten dauernden Reperusionsphase wurden die systemische Leukozytenzahl im Blut bestimmt sowie Gewebeprobe zur weiteren Analyse entnommen.

4. Statistik

Sämtliche Versuchsergebnisse wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Analyse wurde unter Anwendung der Software „Sigma Stat TM“ (Jandel Corporation, St. Rafael, CA, USA) durchgeführt. Zur Testung auf statistisch signifikante Unterschiede wurden der Rank-Sum-Test (bei 2 Versuchsgruppen) bzw. der ANOVA-on-Ranks-Test gefolgt von dem Student-Newman-Keuls-Test (Anzahl der Versuchsgruppen > 2) angewandt. Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

IV. Ergebnisse

1. Ergebnisse uPA

1.1 Die Bedeutung von uPA und uPAR für die Leukozyten-rekrutierung nach Ischämie-Reperfusion

In ersten Experimenten wurden das intravaskuläre Rollen und die feste Adhärenz sowie die (nachfolgende) Transmigration von Leukozyten in postkapillären Venolen des Kremastermuskels von WT bzw. uPA- oder uPAR-defizienten Mäusen mit Hilfe der *In-vivo*-Transilluminationsmikroskopie analysiert (Vgl. Abb. IV/1.1).



Abb. IV/1.1: Repräsentative *In-vivo*-Transilluminationsmikroskopie-Aufnahmen von postkapillären Venolen des Kremastermuskels von WT (Maßstabsbalken: 20 μ m), uPA-defizienten und uPAR-defizienten Versuchstieren nach 30 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion.

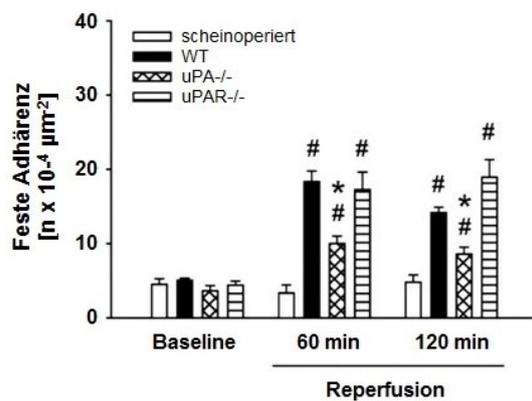
Die chirurgische Präparation des *M. cremaster* induzierte eine Aktivierung von Endothelzellen und in der Folge Rollen von Leukozyten in postkapillären Venolen. Bezogen auf die Anzahl rollender Leukozyten wurden weder zu Baseline-Bedingungen vor Einleitung der Ischämie, noch 60 Minuten oder 120 Minuten nach Beginn der Reperfusion signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Vor Induktion der Ischämie des Kremastermuskels war die Anzahl fest adhärenter Leukozyten in den postkapillären Venolen relativ niedrig und unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Jedoch zeigte sich nach 30 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion ein signifikanter Anstieg der fest adhärenter Leukozyten im Vergleich

zu scheinoperierten Tieren. Dieser Anstieg war interessanterweise in uPA-defizienten, nicht aber in uPAR-defizienten Versuchstieren, signifikant vermindert (Vgl. Abb. IV/1.2/A).

Zu Baseline-Bedingungen fanden sich nur wenige transmigrierte Leukozyten im perivaskulären Gewebe. Analog zum Anstieg der festen Adhärenz fand sich auch für die Transmigration eine deutliche, signifikante Zunahme nach 30 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion im Vergleich zu scheinoperierten Versuchstieren. Diese Steigerung war ebenfalls in uPA-defizienten Versuchstieren, nicht aber in uPAR-defizienten Tieren, signifikant verringert (Vgl. Abb. IV/1.2/B). Ähnliche Ergebnisse für Rollen, feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten waren bereits nach 30 Minuten Ischämie und 60 Minuten Reperfusion zu beobachten (Vgl. Abb. IV/1.2/A und Abb. IV/1.2/B).

A



B

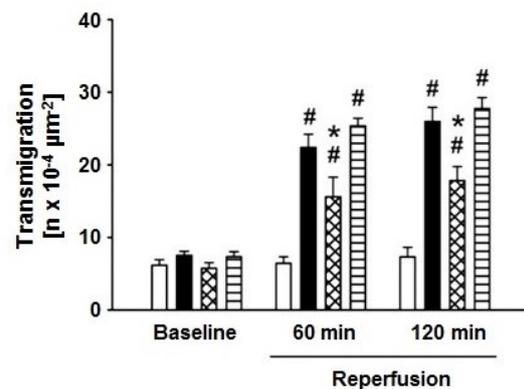
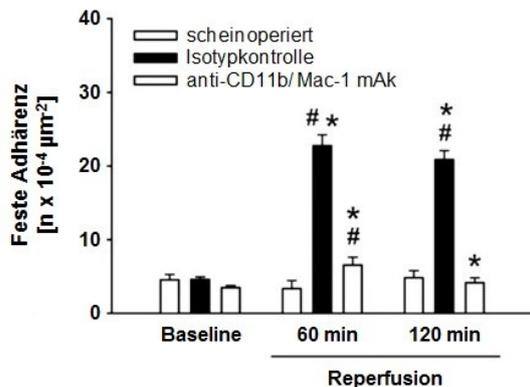


Abb. IV/1.2: Anzahl fest adhärenter (A) und transmigrierter (B) Leukozyten in postkapillären Venolen des *M. cremaster* zu Baseline-Bedingungen sowie nach 30 Minuten Ischämie und 60 bzw. 120 Minuten Reperfusion in WT bzw. uPA- oder uPAR-defizienten Tieren (MW ± SEM bei n = 7 pro Gruppe, # < 0,05 vs. scheinoperiert, * p < 0,05 vs. WT).

1.2 Die Bedeutung von Mac-1 für die Leukozytenrekrutierung nach Ischämie-Reperfusion

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss des Integrins Mac-1 für die Leukozytenrekrutierung nach I/R untersucht. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Mac-1 neben seiner Funktion als Adhäsionsmolekül und Komplementrezeptor auch als Rezeptor für uPA fungiert. Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Anzahl rollender Leukozyten zwischen allen Versuchsgruppen zu allen Untersuchungszeitpunkten (Daten nicht gezeigt). Vor Ischämie und Reperfusion fanden sich nur wenige adhärenente und transmigrierte Leukozyten im perivaskulären Gewebe. Weiterhin bestanden zwischen den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Nach 30 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion kam es zu einer signifikanten Erhöhung sowohl der Anzahl fest adhärenente Leukozyten als auch transmigrierter Leukozyten im Vergleich zu scheinoperierten Versuchstieren. Dieser Anstieg war in Versuchstieren, die mit einem Mac-1 blockierenden Antikörper behandelt wurden, fast vollständig aufgehoben (Vgl. Abb. IV/1.3/A und Abb. IV/1.3/B).

A



B

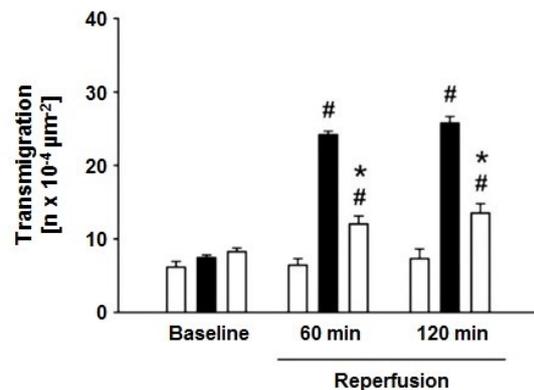


Abb. IV/1.3: Anzahl fest adhärenente (A) und transmigrierter (B) Leukozyten in postkapillären Venolen des *M. cremaster* zu Baseline-Bedingungen sowie nach 30 Minuten Ischämie und 60 beziehungsweise 120 Minuten Reperfusion in WT Tieren, welche mit einem blockierenden anti-Mac-1 Antikörper oder Kontrollantikörper behandelt wurden (MW \pm SEM bei $n = 7$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. scheinoperiert, * $p < 0,05$ vs. Isotyp-Kontrolle).

Des Weiteren wurde die funktionelle Relevanz der Interaktion des uPA-Rezeptors mit Mac-1 für die I/R-induzierte Leukozytenrekrutierung im Kremastermuskel untersucht. Es zeigte sich, dass die systemische Applikation des Peptids M25, welches die Interaktion von Mac-1 mit dem uPA Rezeptor hemmt, die postischämische Leukozytenantwort nicht signifikant beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

1.3 Der Einfluss von uPA auf Rollen, feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten

Um den direkten Einfluss von uPA auf intravaskuläres Rollen und feste Adhärenz sowie Transmigration von Leukozyten zu untersuchen, wurde Versuchstieren rekombinantes murines uPA in unterschiedlicher Dosierung (0,02, 0,2 oder 2,0 µg) mittels intraskrotaler Injektion appliziert. Im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren, bewirkte uPA in keiner der angegebenen Dosierungen einen Anstieg der Anzahl rollender Leukozyten (Vgl. Abb. IV/1.4/A). In Kontrolltieren, denen PBS intraskrotal verabreicht wurde, fanden sich sehr wenige fest adhärenz und transmigrierte Leukozyten. Nach intraskrotaler Injektion von uPA wurde ein dosisabhängiger Anstieg der Anzahl fest adhärenz und transmigrierter Leukozyten beobachtet (Vgl. Abb. IV/1.4/B und Abb. IV/1.4/C). Da die höchste verabreichte Dosierung (2,0 µg) eine signifikante Erhöhung der festen Adhärenz und Transmigration verursachte, wurde diese Dosis in den weiteren Experimenten verwendet.

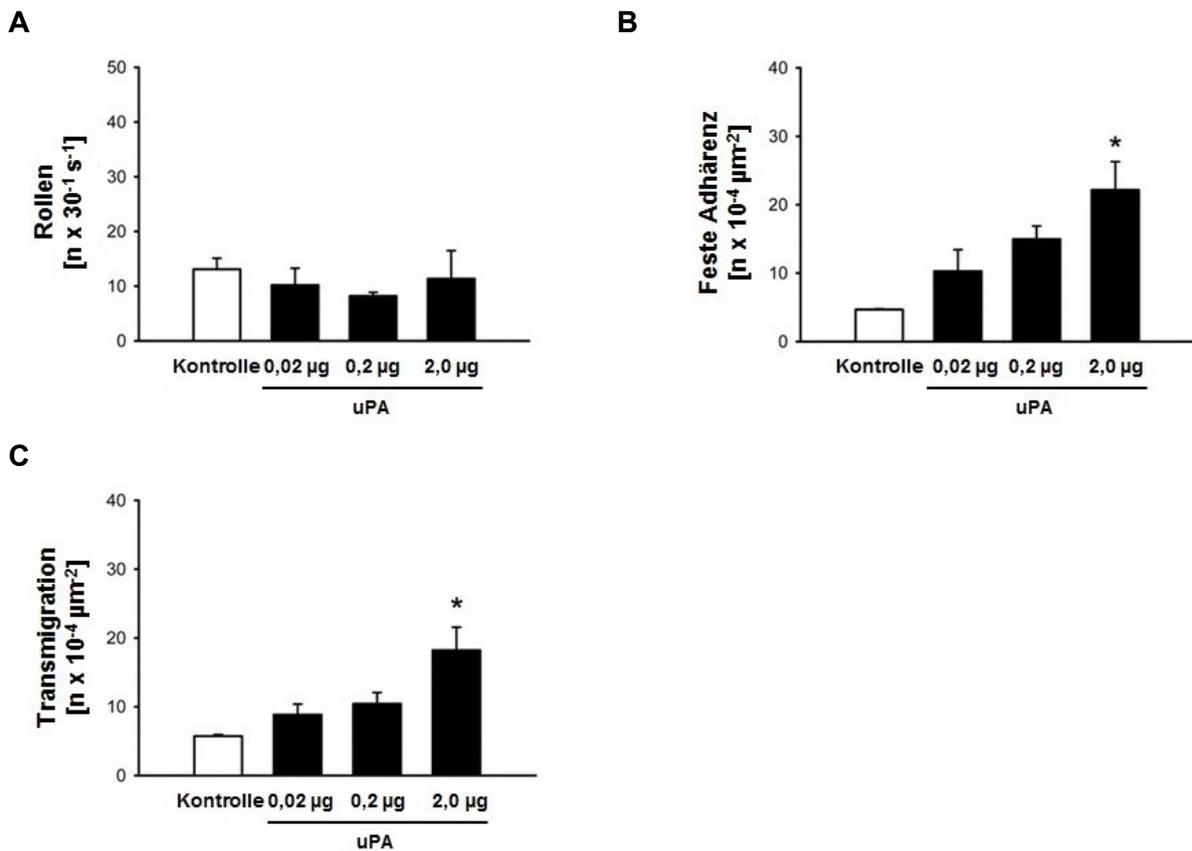


Abb. IV/1.4: Effekte aufsteigender Dosen von rekombinantem, murinen uPA auf intravaskuläres Rollen, feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten in postkapillären Venolen des *M. cremaster* der Maus (MW \pm SEM bei $n = 3$ pro Gruppe, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

In weiteren Experimenten wurde die Rolle von Mac-1 für die uPA-vermittelte Leukozytenrekrutierung analysiert. Durch die Inhibition von Mac-1 wurde das leukozytäre Rollen nicht signifikant verändert, demgegenüber war die feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten nahezu aufgehoben (Vgl. Abb. IV/1.5/A, Abb. IV/1.5/B und Abb. IV/1.5/C).

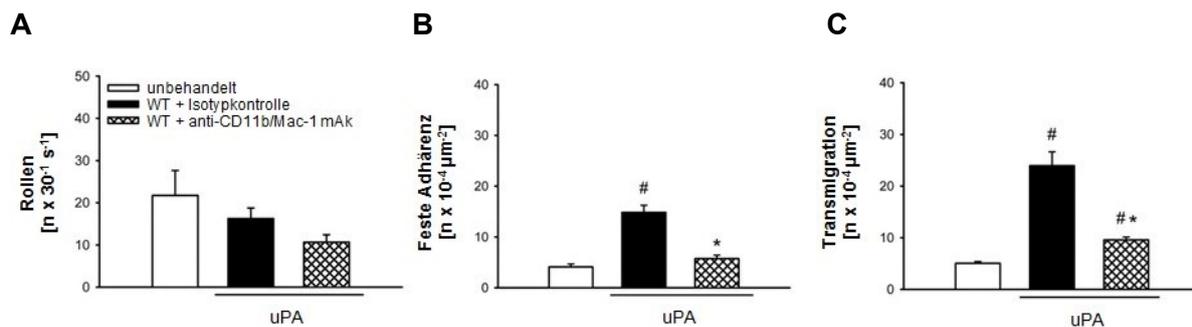


Abb. IV/1.5: Auswirkungen einer Blockade von Mac-1 auf durch intraskrotale Injektion von rekombinatem, murinen uPA ausgelöstes intravaskuläres Rollen, feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten (MW \pm SEM bei $n = 6$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. unbehandelt, * $p < 0,05$ vs. WT + Isotypkontrolle).

Die intraskrotale Stimulation mit uPA, dessen proteolytische Aktivität entweder durch die Behandlung mit Diisopropylfluorophosphat (DFP) oder die Komplexbildung mit PAI-1 inhibiert wurde, aber auch die Stimulation mit humanem uPA, das nicht an den murinen uPAR bindet, verstärkten signifikant die feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten im Vergleich zu Kontrollen (Vgl. Abb. IV/1.6/B und Abb. IV/1.6/C). Bezogen auf das Rollen von Leukozyten gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Vgl. Abb. IV/1.6/A). Während die durch DFP-uPA vermittelte Leukozytenrekrutierung in Tieren, welche mit einem blockierenden Mac-1 Antikörper behandelt wurden, beinahe aufgehoben war, reduzierte die Blockade von Mac-1 die von uPA-PAI-1 und humanem uPA ausgelöste Leukozytenrekrutierung nur teilweise (Vgl. Abb. IV/1.6/A, Abb. IV/1.6/B und Abb. IV/1.6/C).

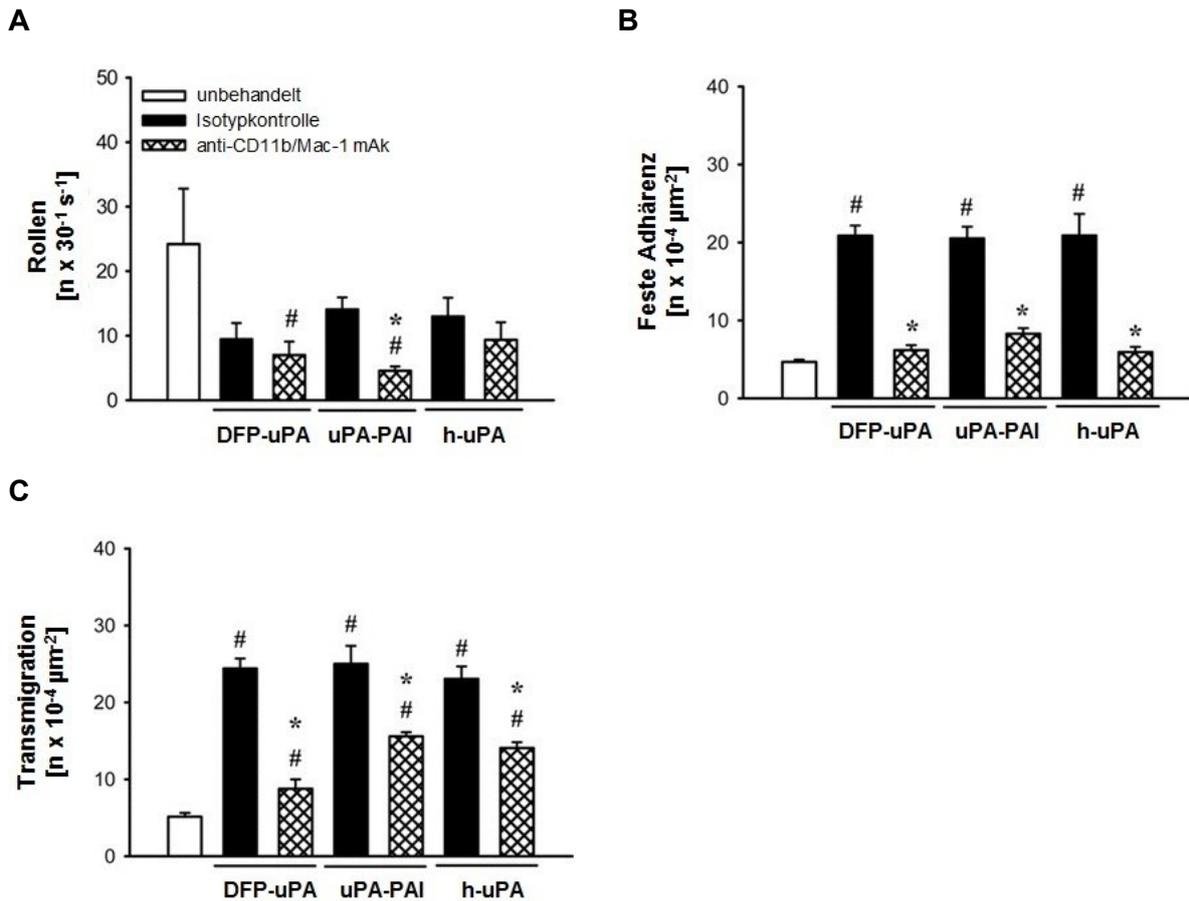


Abb. IV/1.6: Auswirkungen der Blockade von Mac-1 auf durch intraskrotale Injektion von verschiedenen uPA-Komplexen sowie humanem uPA ausgelöstes intravaskuläres Rollen, feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten (MW \pm SEM bei $n = 6$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. unbehandelt, * $p < 0,05$ vs. Isotypkontrolle).

In weiteren Experimenten wurde belegt, dass die uPA-medierte feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten durch die Inhibition der potentiellen Mac-1 Bindungspartner CD54/ICAM-1 oder CD102/ICAM-2 signifikant reduziert wurde. Das Rollen blieb unbeeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren fanden wir heraus, dass die Blockade des Protease-aktivierten Rezeptors 1 durch die Behandlung mit dem Inhibitor SCH 79797 die durch uPA induzierte Leukozytenrekrutierung nicht änderte (Daten nicht gezeigt).

1.4 Die Bedeutung von leukozytärem versus nicht-leukozytärem uPA für die postischämische Leukozytenantwort

Anhand immunhistochemischer Färbungen und Konfokalmikroskopie wurde die Expression von uPA im postischämischen Kremastermuskel analysiert. Eine starke Expression fand sich insbesondere auf Mikrogefäßen (Kokalisation mit E-selectin; Vgl. Abb. IV/1.7) und transmigrierten Leukozyten (Kokalisation mit GR-1; Bilder nicht gezeigt). Die Expression von uPA wurde mittels Durchflusszytometrie auf isolierten neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen bestätigt (Abb. IV/1.8).

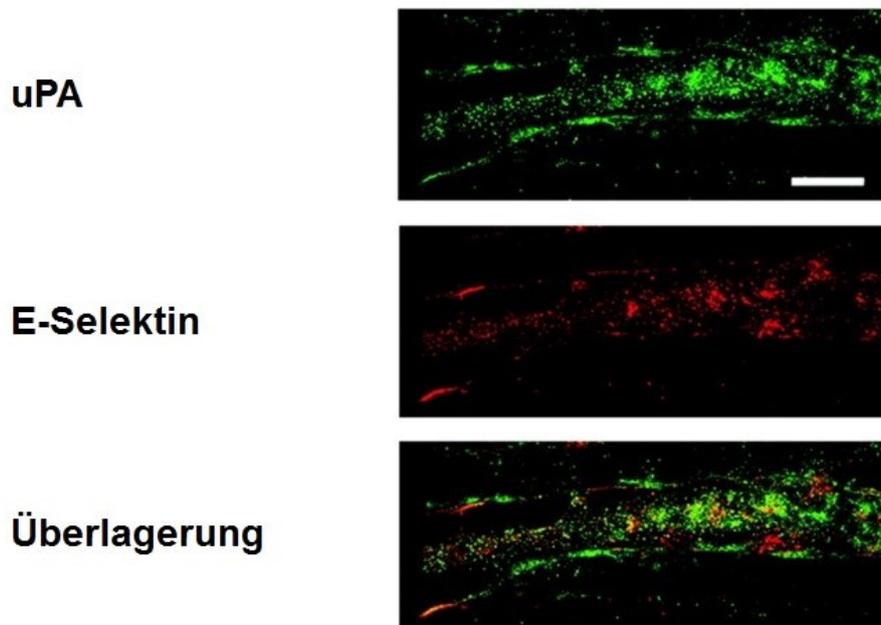


Abb. IV/1.7: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der Expression von uPA (grün) in einer postkapillären Venole (E-Selektin; rot) des murinen Kremastermuskels (Maßstabsbalken: 25 μm).

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von uPA auf isolierten murinen neutrophilen Granulozyten und mikrovaskulären Endothelzellen untersucht und damit die konfokalmikroskopischen Befunde bestätigt (Vgl. Abb. IV/1.8).

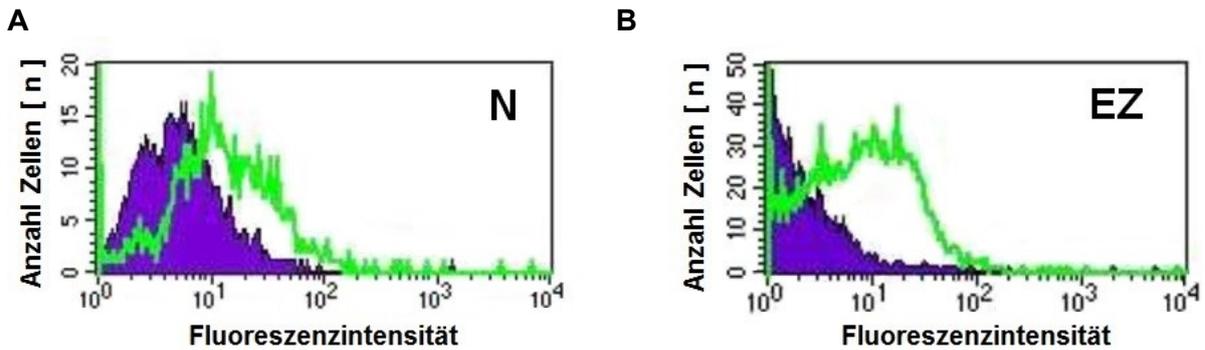


Abb. IV/1.8: Repräsentative Durchflusszytometrie-Plots für die Expression von uPA auf isolierten murinen neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen (A; N) und (B; EZ).

Um den Einfluss von leukozytärem und nicht-leukozytärem uPA auf die postischämische Leukozytenrekrutierung zu untersuchen, wurde eine Zelltransfertechnik angewandt. Dabei wurden Knochenmarksleukozyten aus Spendertieren entnommen, mit Calcein-AM angefärbt, intravenös in ein Empfängertier appliziert und abschließend im *M. Cremaster* mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. Die Anzahl der Calcein-positiven, fest adhärenenten wie auch transmigrierten Spenderzellen aus WT Tieren in postkapillären Venolen des *M. cremaster* war in uPA-defizienten Empfängertieren, verglichen mit WT-Empfängertieren, signifikant vermindert. Im Gegensatz dazu war nach Transfusion von uPA-defizienten Spenderzellen in WT-Empfängertieren nur die postischämische Transmigration Calcein-positiver Leukozyten signifikant verringert, während keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Adhärenz zu beobachten waren. (Vgl. Abb. IV/1.9/A und Abb. IV/1.9/B).

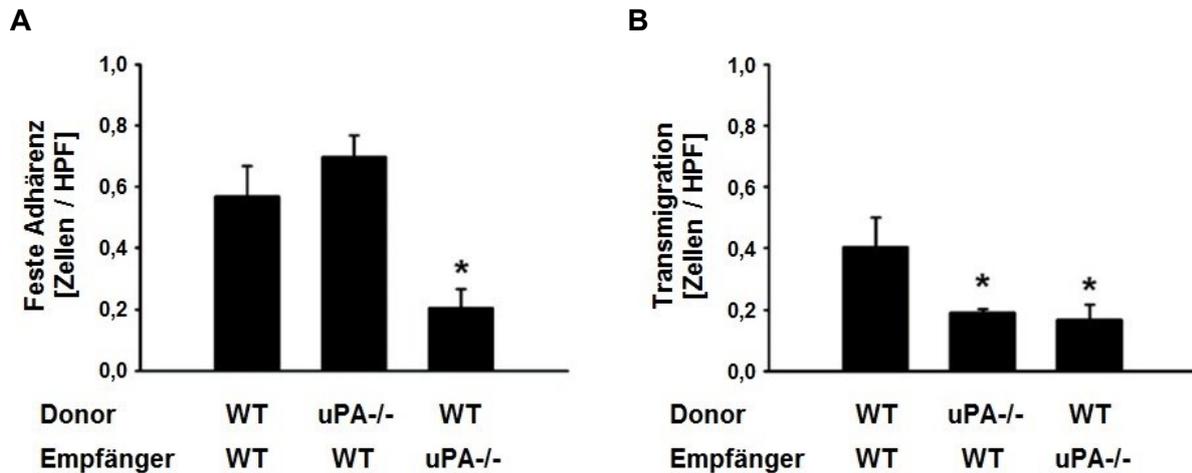


Abb. IV/1.9: Quantifizierung intravasal adhärenter (A) und transmigrierter (B) Calcein-AM-gefärbter Knochenmarksleukozyten im postischämischen Kremastermuskel mittels In-vivo-Fluoreszenzmikroskopie (HPF ist die Abkürzung für High-Power Field). Die Ergebnisse für WT Mäuse, welchen Knochenmarksleukozyten aus WT oder uPA-defizienten Spendertieren verabreicht wurden, sowie für uPA-defiziente Mäuse, welchen Knochenmarksleukozyten aus WT-Spendertieren erhielten, sind gezeigt (MW \pm SEM bei $n = 4 - 6$ pro Gruppe, * $p < 0,05$ vs. WT \rightarrow WT-Gruppe).

1.5 Postischämische leukozytäre Transmigrationswege

Durch eine *In-vivo*-Immunfärbung mit einem gegen PECAM-1 gerichteten und mit Alexa Fluor 488 gekoppelten Antikörper wurden die Endothelzellkontakte mittels Intravitalmikroskopie dargestellt. Es zeigte sich ein diamantförmiges Profil der Endothelzellkontakte in Arteriolen, während sich das Profil in postkapillären Venolen pflastersteinartig darstellte (Vgl. Abb. IV/1.10/A).

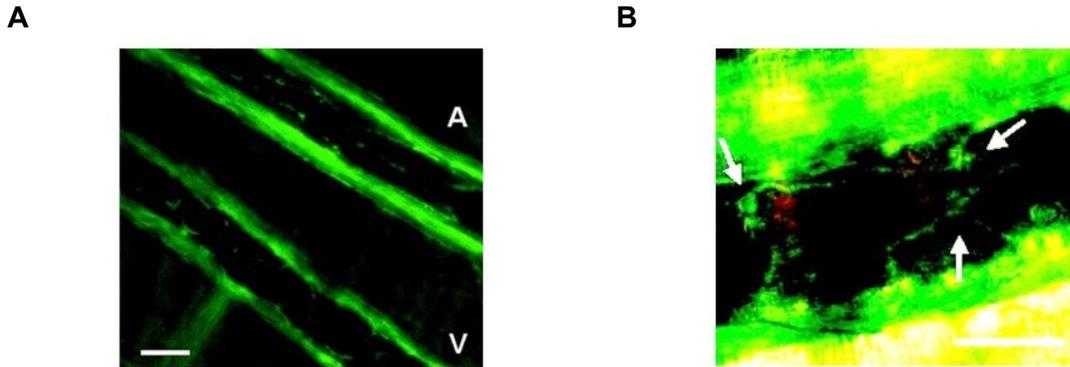


Abb. IV/1.10: Repräsentative In-vivo-Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen einer Arteriole (A; A) und einer Venole (A; V) im postischämischen Kremastermuskel nach Immunfärbung der Endothelzellkontakte (PECAM-1; grün; Maßstabsbalken: 25 μ m). Vergrößerung einer so dargestellten Venole: Die Pfeile zeigen auf fest adhärenente Leukozyten, welche mit Endothelzellkontakten kolokalisieren (B; Maßstabsbalken: 25 μ m).

Leukozyten können für ihre transendotheliale Migration aus postkapillären Venolen prinzipiell zwei Wege nutzen. Einerseits können sie zwischen den Endothelzellen hindurch wandern (parazellulärer Transmigrationsweg), andererseits die Endothelzellen direkt durchdringen (transzellulärer Transmigrationsweg). Um zu untersuchen, welchen Transmigrationsweg Leukozyten für die transendotheliale Migration während I/R wählen, wurde die Lokalisation fest adhärenenter Leukozyten im Vergleich zu Endothelzellkontakten ausgewertet (Vgl. Abb. IV/1.10/B). Nach I/R sowie nach intraskrotaler Stimulation mit uPA fanden sich > 90 % aller fest adhärenenter Leukozyten in postkapillären Venolen kolokalisiert mit Endothelzellkontakten (Vgl. Abb. IV/1.11).

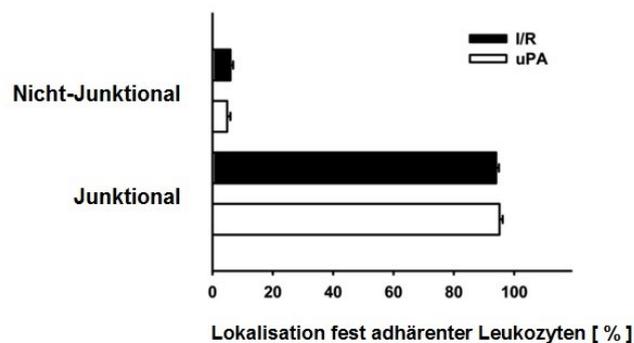


Abb. IV/1.11: Lokalisation intravaskulär adhärenenter Leukozyten nach I/R oder nach intraskrotaler Stimulation mit uPA (MW \pm SEM bei n = 3 pro Gruppe, # p < 0,05 vs. I/R-Gruppe).

1.6 Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten

Um den Phänotyp transmigrierter Leukozyten zu identifizieren, wurden immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten des Kremastermuskels gegen CD45 (Panleukozytenmarker), Ly-6G (neutrophile Granulozyten) und F4/80 (Monozyten/Makrophagen) angefertigt. Nach I/R oder nach Stimulation mit uPA, waren mehr als 80 % der transmigrierten CD45-positiven Zellen positiv für Ly-6G, während sich 10 – 20 % der Leukozyten als F4/80-positiv darstellten (Daten nicht gezeigt).

1.7 Die Bedeutung von uPA und des uPA Rezeptors für die Regulation der postischämischen mikrovaskulären Permeabilität

Als Maß für die mikrovaskuläre Permeabilität wurde mittels *In-vivo*-Fluoreszenzmikroskopie die Extravasation des Makromoleküls FITC-Dextran (150.000 Da) in das perivaskuläre Gewebe am postischämischen Kremastermuskel analysiert (Vgl. Abb. IV/1.12).

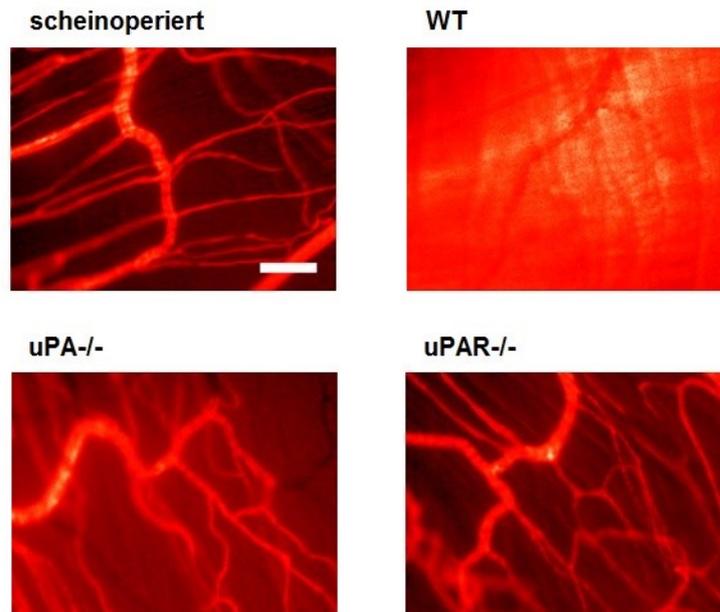


Abb. IV/1.12: Repräsentative In-vivo-Fluoreszenzmikroskopiebilder des Kremastermuskels von WT, uPA-defizienten und uPAR-defizienten Mäusen nach intravenöser Applikation von FITC-Dextran sowie 30 min Ischämie und 150 min Reperfusion im Vergleich zu WT-Tieren nach Scheinoperation (Maßstabsbalken: 50 μ m).

Nach Ischämie (30 Minuten) und Reperfusion (150 Minuten) kam es im Vergleich zu scheinoperierten Tieren zu einem signifikanten Anstieg der Extravasation von FITC-Dextran in das perivaskuläre Gewebe. Interessanterweise war dieser Anstieg in uPA-defizienten wie auch in uPAR-defizienten Tieren nahezu aufgehoben (Vgl. Abb. IV/1.13).

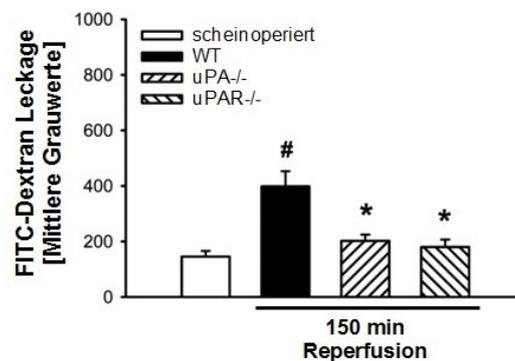


Abb. IV/1.13: Extravasation von FITC-Dextran aus postkapillären Venolen des Kremastermuskels von WT, uPA-defizienten und uPAR-defizienten Mäusen nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zu WT Tieren nach Scheinoperation sind gezeigt (MW \pm SEM bei n = 6 pro Gruppe, # p < 0,05 vs. scheinoperiert * p < 0,05 vs. WT).

1.8 Einfluss von WX-340 auf die postischämische

Leukozytenrekrutierung und mikrovaskuläre Permeabilität

Zur Analyse des Einflusses eines spezifischen uPA-Inhibitors (WX-340) auf die postischämische Leukozytenrekrutierung und die mikrovaskuläre Permeabilität wurde eine weitere Reihe von Experimenten durchgeführt. Als Reaktion auf I/R (30 Minuten/120 Minuten) kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl fest adhärenter und transmigrierter Leukozyten in postkapillären Venolen des Kremastermuskels im Vergleich zu scheinoperierten Tieren. Dieser Anstieg war in Tieren, welche mit dem uPA-Inhibitor WX-340 behandelt wurden, signifikant vermindert (Vgl. Abb. IV/1.14/A und Abb. IV/1.14/B).

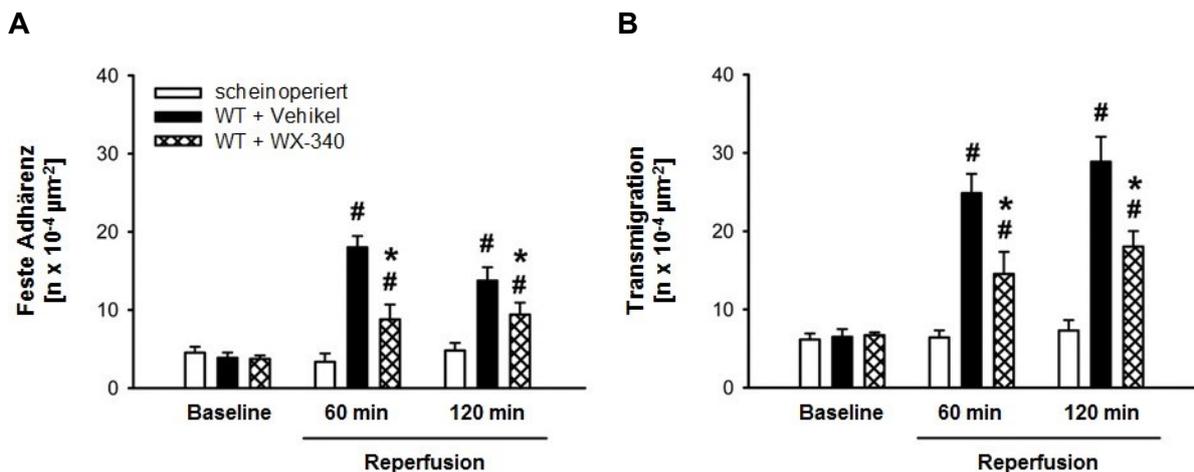


Abb. IV/1.14: Anzahl fest adhärenter (A) und transmigrierter (B) Leukozyten in postkapillären Venolen des *M. cremaster* von WT-Tieren, welche mit WX-340 oder Vehikel behandelt wurden, zu Baseline-Bedingungen sowie nach 30 min Ischämie und 60 bzw. 120 Minuten Reperfusion (MW \pm SEM bei $n=6$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. scheinoperiert, * $p < 0,05$ vs. WT + Vehikel).

Des Weiteren wurde durch Ischämie und Reperfusion, im Vergleich zu scheinoperierten Tieren, eine signifikante Erhöhung der Extravasation von FITC-Dextran in das perivaskuläre Kremastergewebe ausgelöst. Die Erhöhung dieses Parameters war in mit WX-340 behandelten Tieren wiederum signifikant reduziert (Vgl. Abb. IV/1.15).

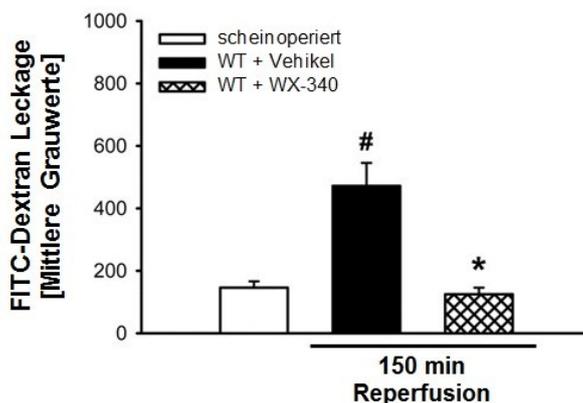


Abb. IV/1.15: Extravasation von FITC-Dextran aus postkapillären Venolen des *M. cremaster* von WT-Tieren, welche mit WX-340 oder Vehikel behandelt wurden, nach 30 Minuten Ischämie und 150 Minuten Reperfusion (MW \pm SEM bei $n=6$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. scheinoperiert, * $p < 0,05$ vs. WT + Vehikel).

1.9 Einfluss von WX-340 auf die Leukozyteninfiltration und den Gewebeschaden der Leber nach Ischämie-Reperfusion

In einem Ischämie-Reperusionsmodell der Leber wurde der Einfluss des uPA-Inhibitors WX-340 auf die Leukozytenrekrutierung und den Gewebeschaden der Leber nach I/R untersucht.

Die Induktion von I/R der Leber führte gegenüber scheinoperierten Versuchstieren zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl der in das postischämische Lebergewebe eingewanderten Leukozyten (davon $\sim 70\%$ Ly-6G⁺ neutrophile Granulozyten; Daten nicht gezeigt). Dieser Anstieg zeigte sich in Tieren, welche mit WX-340 behandelt wurden, signifikant vermindert (Vgl. IV/1.16/A).

Zur Bestimmung des hepatozellulären Schadens wurden die Serumspiegel von Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT) und Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT) der Versuchstiere gemessen. I/R induzierte eine signifikante Zunahme der Serumspiegel von AST und ALT im Vergleich zu scheinoperierten Versuchstieren. Diese Zunahme war in mit WX-340 behandelten Tieren signifikant reduziert. Es sei darauf hingewiesen, dass die Behandlung mit WX-340 weder zu einer Leukozyteninfiltration der Leber noch zu einer Erhöhung der Serumtransaminasen in scheinoperierten Tieren geführt hat (Vgl. IV/1.16/A und IV/1.16/B).

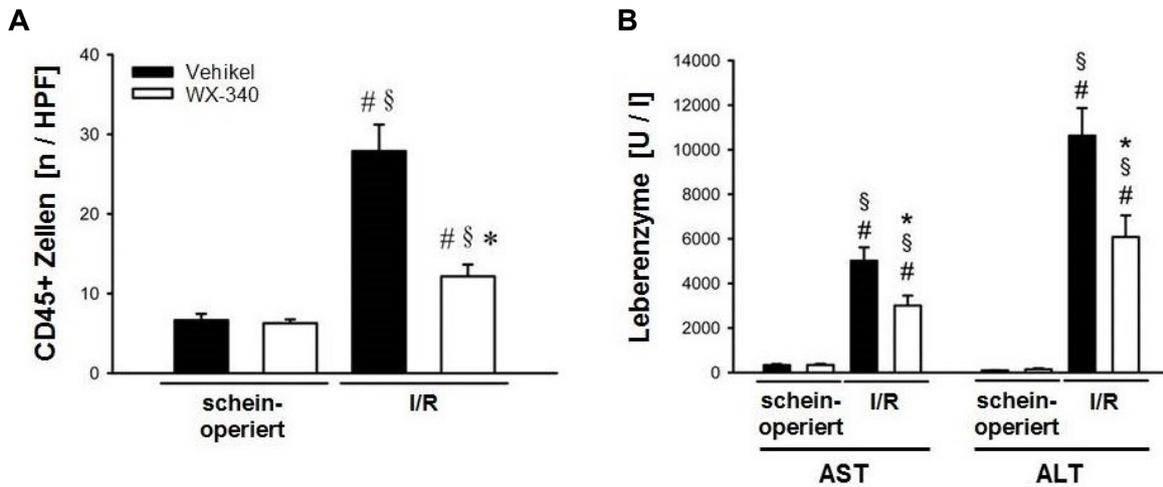


Abb. IV/1.16: Infiltration des postischämischen Lebergewebes durch CD45-positive Zellen (Leukozyten; A). Messung der Serumspiegel von AST und ALT nach Ischämie und Reperfusion (B; MW \pm SEM bei n = 6 pro Gruppe, # p < 0,05 vs. scheinoperiert/Vehikel, * p < 0,05 vs. I/R/WX-340, \$ < 0,05 vs. scheinoperiert/WX-340).

1.10 Plasmaaktivität von uPA

In weiteren Experimenten wurde die Aktivität von uPA in Plasmaproben mittels Zymographie bestimmt. Nach I/R des rechten Kremastermuskels war die uPA-Aktivität im Blut im Vergleich zu scheinoperierten Tieren nicht signifikant verändert (Daten nicht gezeigt).

Für Heparin wird neben den bekannten antikoagulatorischen Eigenschaften und einem inhibitorischen Effekt auf die Bindung von Proteinen an Endothelzellen ein breites Spektrum an weiteren Funktionen diskutiert. Dazu zählen die Inhibition der Proteaseaktivität und der Ligandenbindung an Adhäsionsmoleküle wie Mac-1 und Selektine. Die Behandlung von Versuchstieren mit Heparin führte dabei nicht zu einer signifikant veränderten uPA-Aktivität nach I/R (Daten nicht gezeigt).

1.11 Systemische Leukozytenzahlen und mikrohämodynamische Parameter

Um die Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsgruppen sicherzustellen, wurden der Gefäßinnendurchmesser, die Blutfließgeschwindigkeit und die Wandscherrate der untersuchten Gefäße bestimmt. Darüber hinaus wurde die systemische Leukozytenzahl im peripheren Blut der Versuchstiere gemessen. In Versuchstieren, welche mittels intraskrotaler Injektion von uPA, DFP-uPA oder dem uPA-PAI-1 Komplex stimuliert wurden, fanden sich eine signifikant veränderte Wandscherrate und Leukozytenzahl im Vergleich zu PBS-behandelten Versuchstieren. Zwischen den übrigen Versuchsgruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Vgl. Tab. IV/1.1).

Tab. IV/1.1: Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen. Die systemischen Leukozytenzahlen sowie die mikrohämodynamischen Parameter Gefäßinnendurchmesser, Blutfließgeschwindigkeit und Wandscherrate der untersuchten Gefäße sind gezeigt (Vgl. III/2.6 und III/2.7; MW \pm SEM bei n=3 - 7 pro Gruppe).

Stimulus	Tier/ Behandlung	Gefäßinnen- durchmesser [μm]	Blutfließ- geschwindig- keit [mm s^{-1}]	Wandscherrate [s^{-1}]	Systemische Leukozyten- zahl [$\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$]
Scheinoperiert	WT	26,3 \pm 1,2	1,4 \pm 0,1	2136,2 \pm 148,8	3,7 \pm 0,5
I/R	WT	26,0 \pm 0,7	1,4 \pm 0,1	2028,3 \pm 139,8	3,6 \pm 0,8
I/R	uPA-/-	25,7 \pm 1,4	1,3 \pm 0,1	2061,2 \pm 102,7	4,1 \pm 0,5
I/R	uPAR-/-	25,2 \pm 1,1	1,4 \pm 0,1	2179,8 \pm 119,3	4,0 \pm 0,8
I/R	WT/ Isotyp AK	25,1 \pm 0,6	1,4 \pm 0,1	2207,5 \pm 54,2	4,8 \pm 0,5

Stimulus	Tier/ Behandlung	Gefäßinnen- durchmesser [μm]	Blutfließ- geschwindig- keit [mm s^{-1}]	Wandscherrate [s^{-1}]	Systemische Leukozyten- zahl [$\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$]
I/R	WT/ Anti- CD11b mAb	26,2 \pm 1,7	1,2 \pm 0,1	1804,4 \pm 149,7	4,0 \pm 0,7
I/R	WT/ Vehicle	25,8 \pm 0,3	1,3 \pm 0,1	1948,5 \pm 31,9	4,7 \pm 0,7
I/R	WT/ WX-340	26,2 \pm 0,7	1,3 \pm 0,1	1897,7 \pm 83,8	3,6 \pm 1,1
Kontrolle (PBS)	WT	24,7 \pm 1,0	1,6 \pm 0,1	2522,8 \pm 142,2	6,3 \pm 1,2
uPA (0,02 μg)	WT	25,4 \pm 1,0	1,6 \pm 0,1	2533,4 \pm 101,9	4,4 \pm 1,3
uPA (0,2 μg)	WT	24,0 \pm 1,5	1,7 \pm 0,1	2755,5 \pm 33,4	7,2 \pm 0,6
uPA (2,0 μg)	WT	24,5 \pm 0,9	1,5 \pm 0,1	2373,9 \pm 256,1	4,9 \pm 1,3
Kontrolle (PBS)	WT	24,2 \pm 0,5	1,5 \pm 0,1	2427,5 \pm 133,4	6,2 \pm 0,7
uPA (2,0 μg)	WT/ Isotyp AK	26,4 \pm 0,6	1,3 \pm 0,1	1903,8 \pm 99,1*	5,6 \pm 1,0
uPA (2,0 μg)	WT/ Anti- CD11b mAK	26,0 \pm 1,1	1,4 \pm 0,1	2057,2 \pm 44,6*	5,5 \pm 0,4
Kontrolle (PBS)	WT	23,9 \pm 0,8	1,4 \pm 0,1	2302,8 \pm 156,9	6,4 \pm 0,9
DFP-uPA (2,0 μg)	WT/ Isotyp AK	25,2 \pm 0,6	1,2 \pm 0,1	1828,2 \pm 26,1*	3,3 \pm 0,3*
DFP-uPA (2,0 μg)	WT/ Anti- CD11b mAK	21,9 \pm 1,6	1,2 \pm 0,1	2231,8 \pm 199,3	3,8 \pm 0,5*

Stimulus	Tier/ Behandlung	Gefäßinnen- durchmesser [μm]	Blutfließ- geschwindig- keit [mm s^{-1}]	Wandscherrate [s^{-1}]	Systemische Leukozyten- zahl [$\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$]
uPA-PAI-1 (4,0 μg)	WT/ Isotyp AK	24,2 \pm 0,8	1,2 \pm 0,1	1901,1 \pm 68,7*	3,8 \pm 0,2*
UPA-PAI-1 (4,0 μg)	WT/ Anti- CD11b mAK	25,2 \pm 0,4	1,1 \pm 0,1	1780,7 \pm 80,2*	3,1 \pm 0,8*
h-uPA (2,0 μg)	WT/ Isotyp AK	25,4 \pm 0,8	1,1 \pm 0,1	1743,2 \pm 104,6	4,5 \pm 0,8*
h-uPA (2,0 μg)	WT/ Anti- CD11b mAK	25,1 \pm 0,7	1,1 \pm 0,1	1776,5 \pm 52,4	4,3 \pm 0,4

2. Ergebnisse tPA

2.1 Die Bedeutung von tPA für die Leukozytenrekrutierung nach Ischämie-Reperfusion

In einer ersten Reihe von Experimenten wurde mittels *In-vivo*-Transilluminationsmikroskopie die Bedeutung von *tissue-type plasminogen activator* (tPA) für die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung im postischämischen Kremastermuskel der Maus charakterisiert (Vgl. Abb. IV/2.1). Durch die chirurgische Präparation des Kremastermuskels wurde ein leichtes Leukozytenrollen in postkapillären Venolen induziert. Zu Ausgangsbedingungen, vor Induktion der Ischämie, sowie nach einer Reperusionsphase von 60 oder 120 Minuten, wurden, bezogen auf die Anzahl rollender Leukozyten, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gefunden (Daten nicht gezeigt).

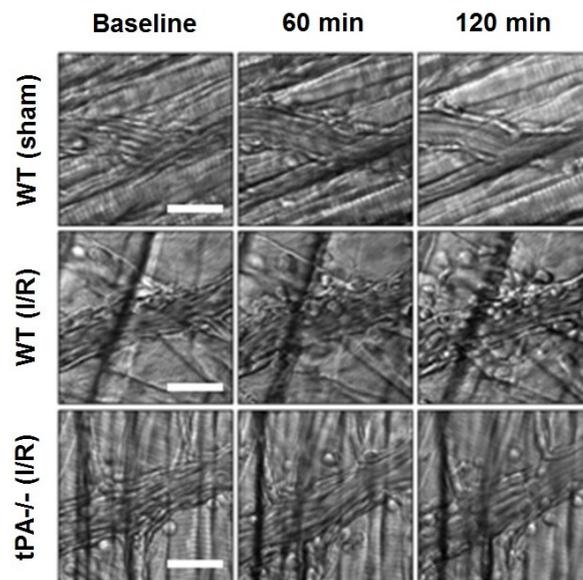


Abb. IV/2.1: Repräsentative *In-vivo*-Transilluminationsmikroskopie-Aufnahmen von postkapillären Venolen im Kremastermuskel von scheinoperierten WT- Mäusen sowie von WT und tPA-defizienten Mäusen nach unterschiedlichen Reperusionszeitpunkten (Maßstabsbalken: 25 µm).

Zu Baseline-Bedingungen vor Ischämie war die Anzahl der an der inneren Gefäßwand von postkapillären Venolen fest adhärenter Leukozyten niedrig und unterschied sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Demgegenüber kam es durch die Induktion von Ischämie und nachfolgender Reperfusion im Vergleich zu scheinoperierten Tieren zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl fest adhärenter Leukozyten. Diese Zunahme war in tPA-defizienten Tieren nach 120 Minuten Reperfusion, jedoch nicht nach 60 Minuten Reperfusion, signifikant verringert (Vgl. Abb. IV/2.2/A).

Vor Induktion der Ischämie fanden sich im perivaskulären Gewebe von postkapillären Venolen des Kremastermuskels nur einige wenige Leukozyten. Die Anzahl der transmigrierten Leukozyten im perivaskulären Gewebe vervielfachte sich jedoch durch Ischämie und Reperfusion. Interessanterweise die Anzahl transmigrierter Leukozyten war in tPA-defizienten Versuchstieren nach 60 Minuten und 120 Minuten Reperfusion signifikant verringert (Vgl. Abb. IV/2.2/B).

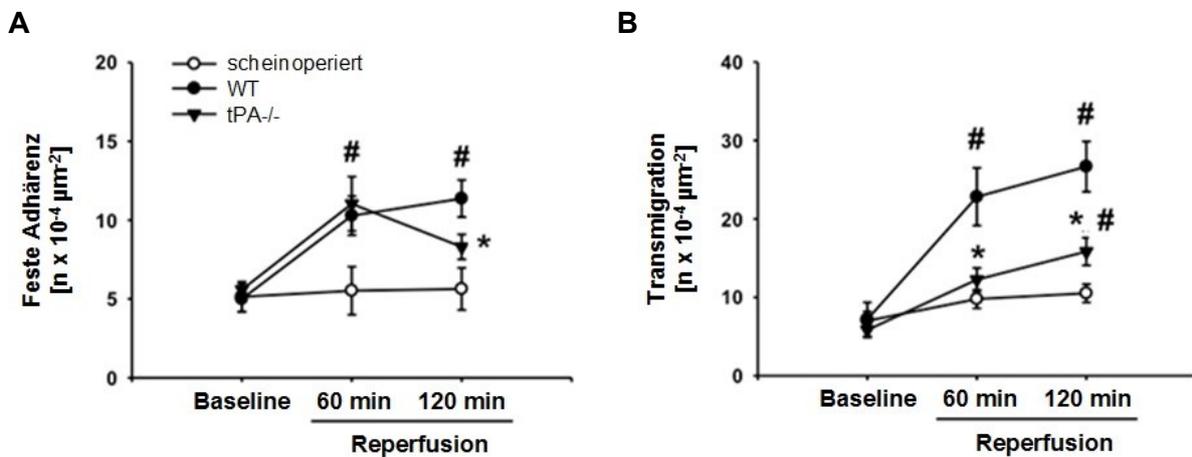


Abb. IV/2.2: Anzahl fest adhärenter (A) und transmigrierter (B) Leukozyten in postkapillären Venolen des *M. cremaster* von WT- und tPA-defizienten Mäusen zu Baseline-Bedingungen sowie nach 30 Minuten Ischämie und 60 bzw. 120 Minuten Reperfusion (MW \pm SEM bei $n = 7$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. scheinoperiert, * $p < 0,05$ vs. WT).

In weiteren Experimenten wurde die Expression von tPA im postischämischen Gewebe analysiert. In konfokalmikroskopischen Aufnahmen von immunhistochemischen Färbungen zeigte sich die Lokalisation von tPA vorwiegend auf PECAM-1-positiven und Gr-1-negativen Endothelzellen im postischämischen Kremastermuskel von Wildtyp-Mäusen. Zusätzlich wurde eine starke tPA-Expression auf der Oberfläche von Gr-1-positiven neutrophilen Granulozyten/Monozyten gefunden (Vgl. Abb. IV/2.3). Als Kontrolle wurden immunhistochemische Färbungen von Kremastermuskeln tPA-defizienter Tiere durchgeführt, in denen keine Expression von tPA erkennbar war (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls nahezu kein Signal zeigte sich in Färbungen, bei welchen statt des anti-tPA Antikörpers ein entsprechender Kontrollantikörper verwendet wurde (Daten nicht gezeigt).

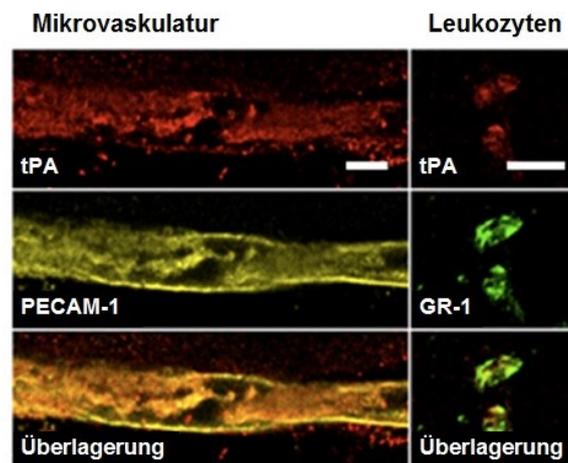
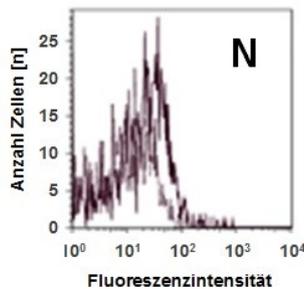


Abb. IV/2.3: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der tPA-Expression (rot) auf neutrophilen Granulozyten/Monozyten (Gr-1; grün; Maßstabsbalken: 10 μm) und auf Endothelzellen einer postkapillären Venole (platelet endothelial cell adhesion molecule 1 [PECAM-1]; gelb) im postischämischen Kremastermuskel (Maßstabsbalken: 10 μm).

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von tPA auf isolierten murinen Neutrophilen und Endothelzellen untersucht und damit die konfokalmikroskopischen Befunde bestätigt (Vgl. Abb. IV/2.4).

A



B

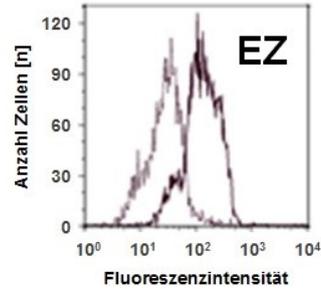


Abb. IV/2.4: *Repräsentative Durchflusszytometrie-Plots für die Expression von tPA auf isolierten murinen neutrophilen Granulozyten (A; N) und Endothelzellen (B; EZ).*

Um den Beitrag von leukozytärem und nicht-leukozytärem tPA für die postischämische Leukozytenrekrutierung zu evaluieren, wurde eine Zelltransfermethode angewandt. In postkapillären Venolen des Kremastermuskels war in tPA-defizienten Empfängertieren im Vergleich zu Wildtyp-Empfängertieren, welche jeweils Leukozyten von Wildtyp-Spendermäusen erhielten, die Anzahl der Calcein-positiven, fest adhären und transmigrierten Leukozyten nach 60 sowie 120 Minuten Reperfusion signifikant reduziert. Die feste Adhärenz Calcein-positiver Leukozyten war in Wildtyp-Empfängertieren, welche Leukozyten von tPA-defizienten Tieren erhielten, nach 60 und 120 Minuten signifikant vermindert. Demgegenüber war die Transmigration von Calcein-positiven Leukozyten aus tPA-defizienten Spendertieren in Wildtyp-Empfängertieren erst nach 120 Minuten Reperfusion signifikant vermindert (Vgl. Abb. IV/2.5/A und Abb. IV/2.5/B).

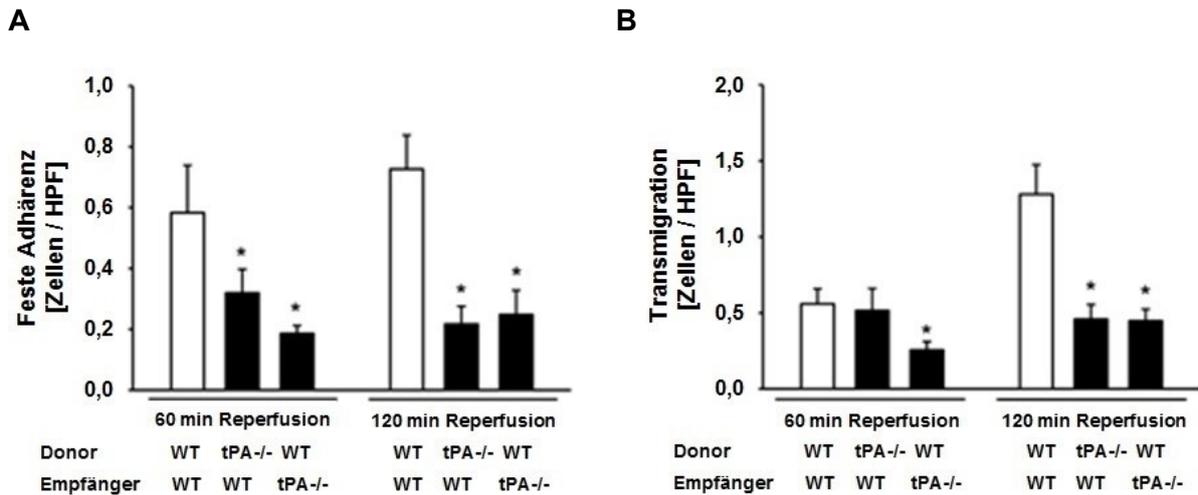


Abb. IV/2.5: Die Anzahl intravasal fest adhärenter (A) und transmigrierter (B) Calcein-AM-gefärbter Knochenmarksleukozyten im postischämischen Kremastermuskel wurde mittels In-vivo-Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert (HPF ist die Abkürzung für High-Power Field). Ergebnisse für WT Mäuse, welchen Knochenmarksleukozyten aus WT oder tPA-defizienten Spendertieren verabreicht wurden, sowie für tPA-defiziente Mäuse, welche Knochenmarksleukozyten aus WT-Spendertieren erhielten, sind gezeigt (MW \pm SEM bei $n = 4 - 6$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Scheinoperation, * $p < 0,05$ vs. WT->WT-Gruppe).

Um den Aktivierungsgrad neutrophiler Granulozyten zu bestimmen, wurde die Expression der Oberflächenmarker L-Selektin und des Integrins Mac-1 mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf aus dem Knochenmark isolierten neutrophilen Granulozyten gemessen, bevor sie transfundiert wurden. Wie erwartet, war die Expression des Selektins CD62L auf unstimulierten neutrophilen Granulozyten hoch und die des Integrins Mac-1 niedrig. Nach Stimulation mit dem potenten Stimulans N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP, 1, 10 oder 100 ng) kam es zu einer signifikanten und dosisabhängigen Steigerung der Expression des Oberflächenmarkers Mac-1 sowie zu einem Verlust der Oberflächenexpression des Oberflächenmarkers L-Selektin (Vgl. Abb. IV/2.6). Diese Daten deuten darauf hin, dass die aus dem Knochenmark isolierten neutrophilen Granulozyten vor der Transfusion in einem Status niedrigerer Aktivierung verbleiben.

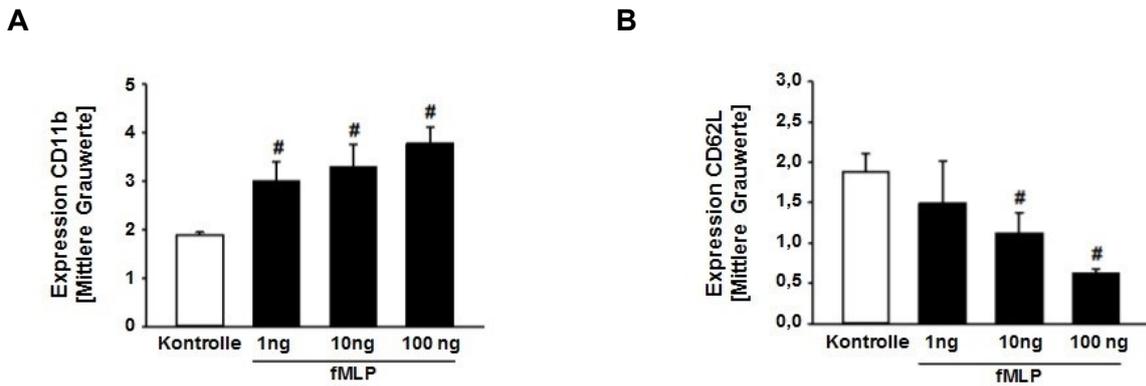


Abb. IV/2.6: Als Maß der Zellaktivierung wurde die Oberflächenexpression von Mac-1 (A) und CD62L (B) auf aus dem Knochenmark von WT-Mäusen isolierten neutrophilen Granulozyten bestimmt. Die Graphen zeigen die Ergebnisse für PBS-behandelte neutrophile Granulozyten sowie für neutrophile Granulozyten, welche mit fMLP (1, 10 oder 100 ng/ml) stimuliert wurden (MW \pm SEM bei $n = 4$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

2.2 Der Einfluss von murinem rekombinanten tPA sowie von tPA-Mutanten auf die Leukozytenrekrutierung

Um den direkten Einfluss von tPA auf die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung beurteilen zu können, wurde rekombinantes murines tPA entweder über intraskrotale Injektion paravaskulär oder über intraarterielle Applikation intravaskulär und damit systemisch verabreicht.

Dabei führten sowohl die intravaskuläre wie auch die intraskrotale Applikation von tPA im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren zu keinen signifikanten Veränderungen in Bezug auf das Rollen von Leukozyten am mikrovaskulären Gefäßendothel (Vgl. Abb. IV/2.7/A). Im Gegensatz dazu induzierte die intraskrotale Stimulation von tPA im Vergleich zur intraarteriellen Applikation einen gegenüber der Kontrollgruppe signifikanten und dosisabhängigen Anstieg in der Anzahl fest adhärenter Leukozyten (Vgl. Abb. IV/2.7/B). Entsprechend den Ergebnissen zur festen Adhärenz, führte ausschließlich die intraskrotale Injektion von tPA zu einer gegenüber der Kontrollgruppe signifikanten und dosisabhängigen Erhöhung der Anzahl in das Gewebe transmigrierter Leukozyten (Vgl. Abb. IV/2.7/C).

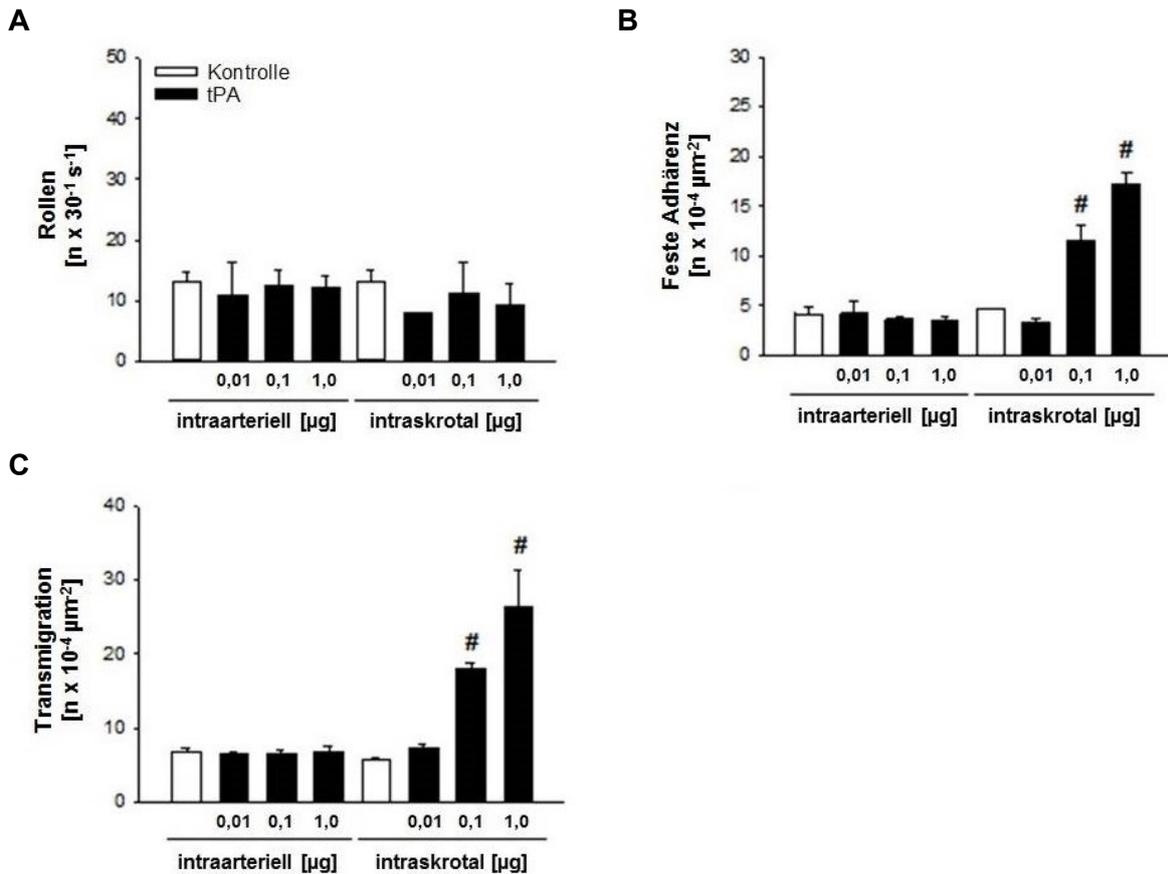


Abb. IV/2.7: Auswirkungen der intraarteriellen bzw. intraskrotalen Applikation aufsteigender Dosen von rekombinantem murinen tPA auf intravaskuläres Rollen, feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten (MW ± SEM bei n=3 pro Gruppe, # p < 0,05 vs. Kontrolle).

Zum genaueren Verständnis der Mechanismen der tPA-vermittelten Leukozytenrekrutierung wurden die Effekte von verschiedenen veränderten tPA-Proteinen auf die Rekrutierung von Leukozyten untersucht. Aufgrund des starken Effektes von nativem tPA in der Dosis 1 µg auf feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten in perivaskuläres Gewebe wurde diese Dosierung auch für die Experimente mit den unterschiedlichen tPA-Mutanten gewählt (Vgl. Abb. IV/2.7/B und Abb. IV/2.7/C).

Wie bereits gezeigt (Vgl. Abb. IV/2.7/A), veränderte die intraskrotale Applikation von nativem rekombinanten murinen tPA im Vergleich zur Behandlung mit PBS das Rollen von Leukozyten in postkapillären Venolen des Kremastermuskels nicht. Darüber hinaus verursachte die intraskrotale Stimulation mit unterschiedlichen tPA-Mutanten – MTPA-S481A (nicht-enzymatisches murines tPA), MTPA-NC (nicht-spaltbares murines tPA), MTPA-ALANC (nicht-enzymatisches und nicht-spaltbares murines tPA) – ebenfalls keine signifikante Änderung des leukozytären Rollens (Vgl. Abb. IV/2.8/A).

Im Gegensatz dazu führte die intraskrotale Applikation von nativem tPA verglichen mit der Behandlung mit PBS zu einer signifikanten Steigerung der festen Adhärenz von Leukozyten in postkapillären Venolen. Diese Steigerung war in Versuchstieren, welche mit MTPA-S481A (nicht enzymatisches-murines tPA) oder MTPA-ALANC (nicht-enzymatisches und nicht-spaltbares murines tPA) signifikant reduziert. Ähnlich stark gesteigert wie nach Stimulation mit nativem tPA war die feste Adhärenz von Leukozyten nach Stimulation mit MTPA-NC (nicht-spaltbares murines tPA) (Vgl. Abb. IV/2.8/B). Übereinstimmend mit den Daten zur festen Adhärenz hatte die intraskrotale Injektion von nativem tPA im Vergleich zu der Injektion von PBS eine signifikante Erhöhung der leukozytären Transmigration von Leukozyten in perivaskuläres Gewebe zur Folge. Auch bei diesem Parameter war die Erhöhung in Versuchstieren, deren Kremastermuskeln mit MTPA-S481A (nicht-enzymatisches murines tPA) oder MTPA-ALANC (nicht-enzymatisches und nicht-spaltbares murines tPA) stimuliert wurden, signifikant reduziert. Darüber hinaus war die Transmigration von Leukozyten nach Stimulation mit MTPA-NC (nicht-spaltbares murines tPA) vergleichbar angestiegen wie nach Stimulation mit nativem tPA (Vgl. Abb. IV/2.8/C).

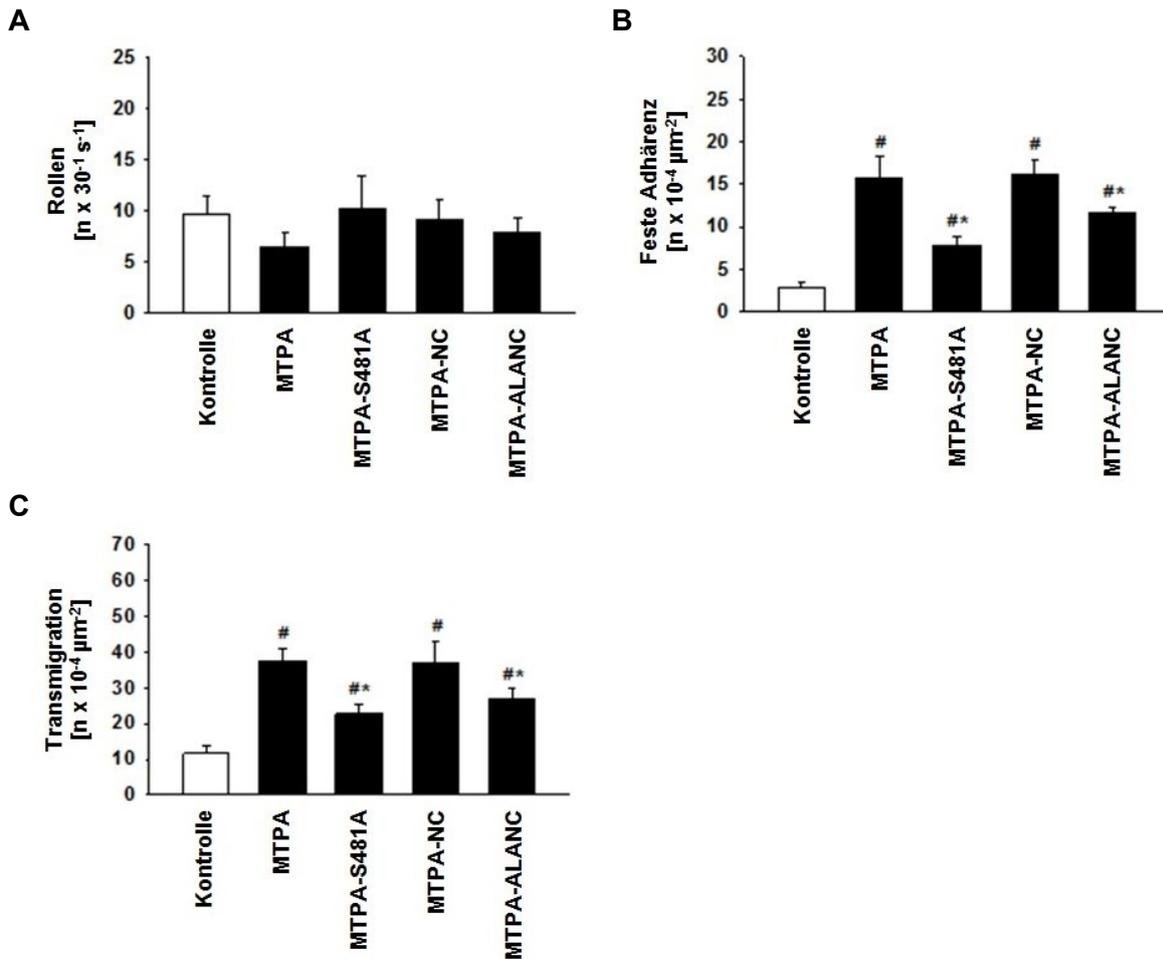


Abb. IV/2.8: Der Einfluss von verschiedenen rekombinanten murinen tPA-Mutanten auf intravaskuläres Rollen, feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten wurde mit Hilfe der In-vivo-Transilluminationsmikroskopie untersucht (MW \pm SEM bei $n = 6$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. MTPA nativ).

2.3 Die Bedeutung von Plasmin und Gelatinasen für die tPA-induzierte Leukozytenrekrutierung

In zusätzlichen Experimenten wurden die der tPA-abhängigen Leukozytenrekrutierung zugrunde liegenden Mechanismen genauer untersucht. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass tPA die Protease Plasmin(ogen) proteolytisch aktiviert, welche in der Folge Gelatinasen (Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2), MMP-9) proteolytisch aktivieren kann. Die Behandlung von Tieren mit Epsilon-Aminokapronsäure (EACA), Tranexamsäure (TXA; jeweils Lysin-Analoga, welche die Plasminaktivität inhibieren) oder mit einem MMP-2/-9-Inhibitor verminderte selektiv die tPA-induzierte Transmigration von Leukozyten, zeigte jedoch keinen Effekt auf das intravaskuläre Rollen oder die feste Adhärenz von Leukozyten (Vgl. Abb. IV/2.9/A, Abb. IV/2.9/B und Abb. IV/2.9/C).

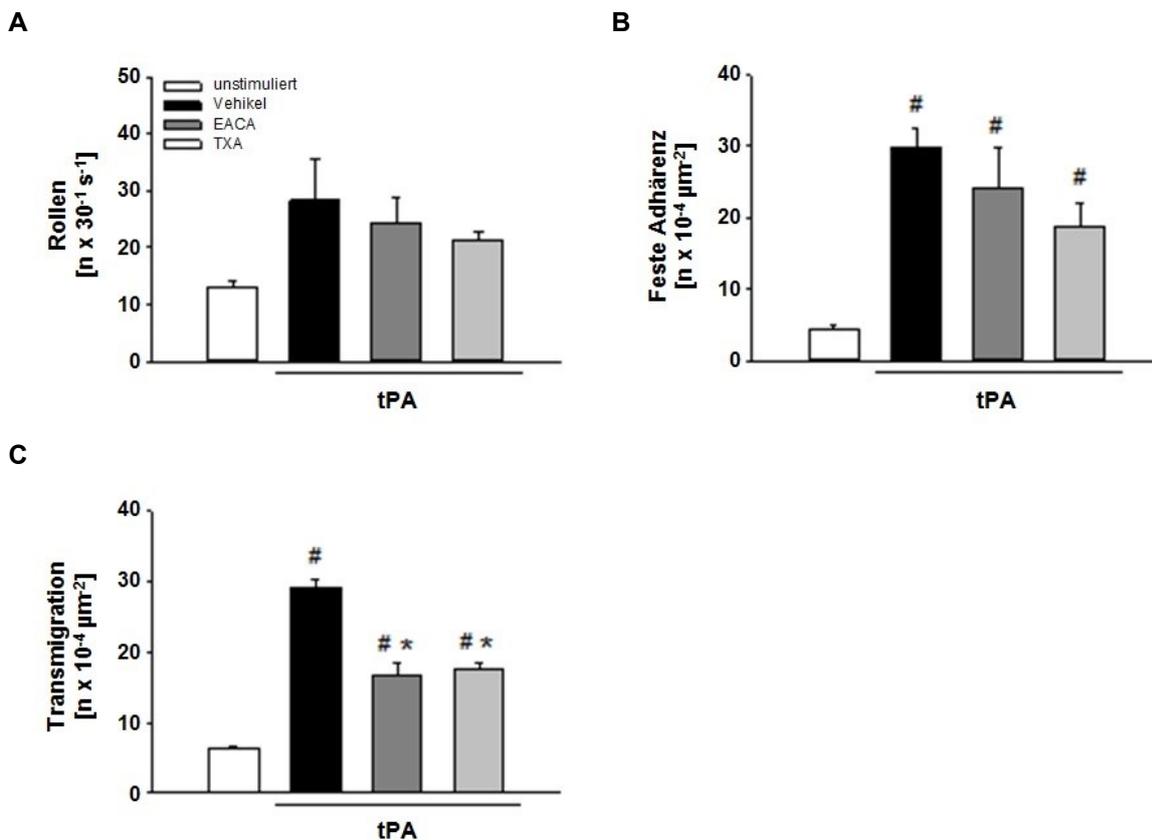


Abb. IV/2.9: Der Einfluss von EACA oder TXA auf leukozytäres Rollen, feste Adhärenz und Transmigration in postkapillären Venolen des *M. cremaster* wurde mit Hilfe der In-vivo-Transilluminationsmikroskopie nach intraskrotaler Stimulation mit tPA untersucht (MW \pm SEM bei $n=4$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. Vehikel).

Die Daten zeigen, wie bereits in vorhergehenden Studien belegt, dass durch die intraskrotale Instillation von Plasmin eine signifikante Steigerung der fest adhären und transmigrierten Leukozyten in postkapillären Venolen des Kremastermuskels induziert wurde (Vgl. Abb. IV/2.10/B und Abb. IV/2.10/C). Das leukozytäre, intravaskuläre Rollen war nicht signifikant verändert (Vgl. Abb. IV/2.10/A). Die Transmigration von Leukozyten war in mit Plasmin intraskrotal stimulierten Tieren durch die Behandlung mit einem Gelatinaseinhibitor (MMP-2/-9 Inhibitor) selektiv und signifikant verringert (Vgl. Abb. IV/2.10/C).

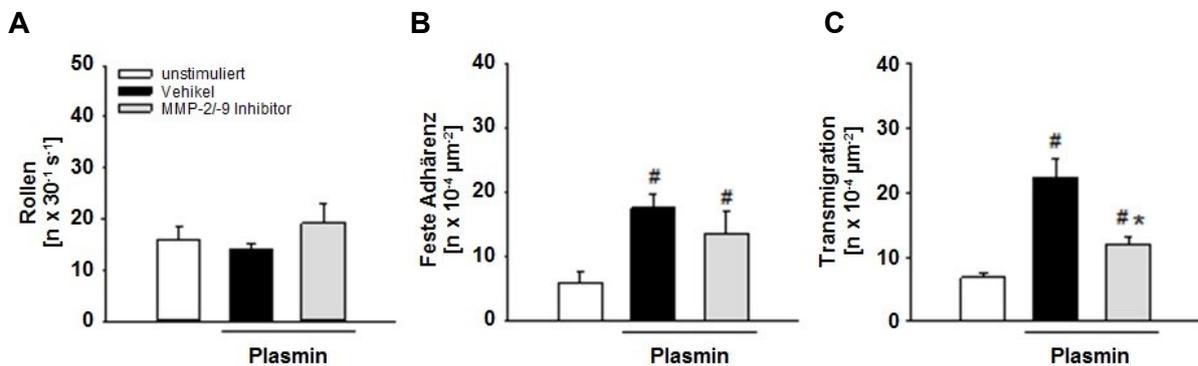


Abb. IV/2.10: Der Einfluss eines MMP-2/-9-Inhibitors auf das leukozytäre Rollen, die feste Adhärenz und die Transmigration wurde in postkapillären Venolen des *M. cremaster* mit Hilfe der In-vivo-Transilluminationsmikroskopie untersucht (MW \pm SEM bei $n=4$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. Vehikel).

In darauffolgenden Experimenten untersuchten wir den Effekt von EACA und TXA auf die durch MTPA-S481A (nicht-enzymatisches, murines tPA)-induzierte Leukozytenrekretion. Die durch MTPA-S481A induzierte intravaskuläre feste Adhärenz, jedoch nicht das Rollen oder die Transmigration von Leukozyten wurden durch die Applikation von TXA oder EACA signifikant vermindert (Vgl. Abb. IV/2.11/A, Abb. IV/2.11/B und Abb. IV/2.11/C).

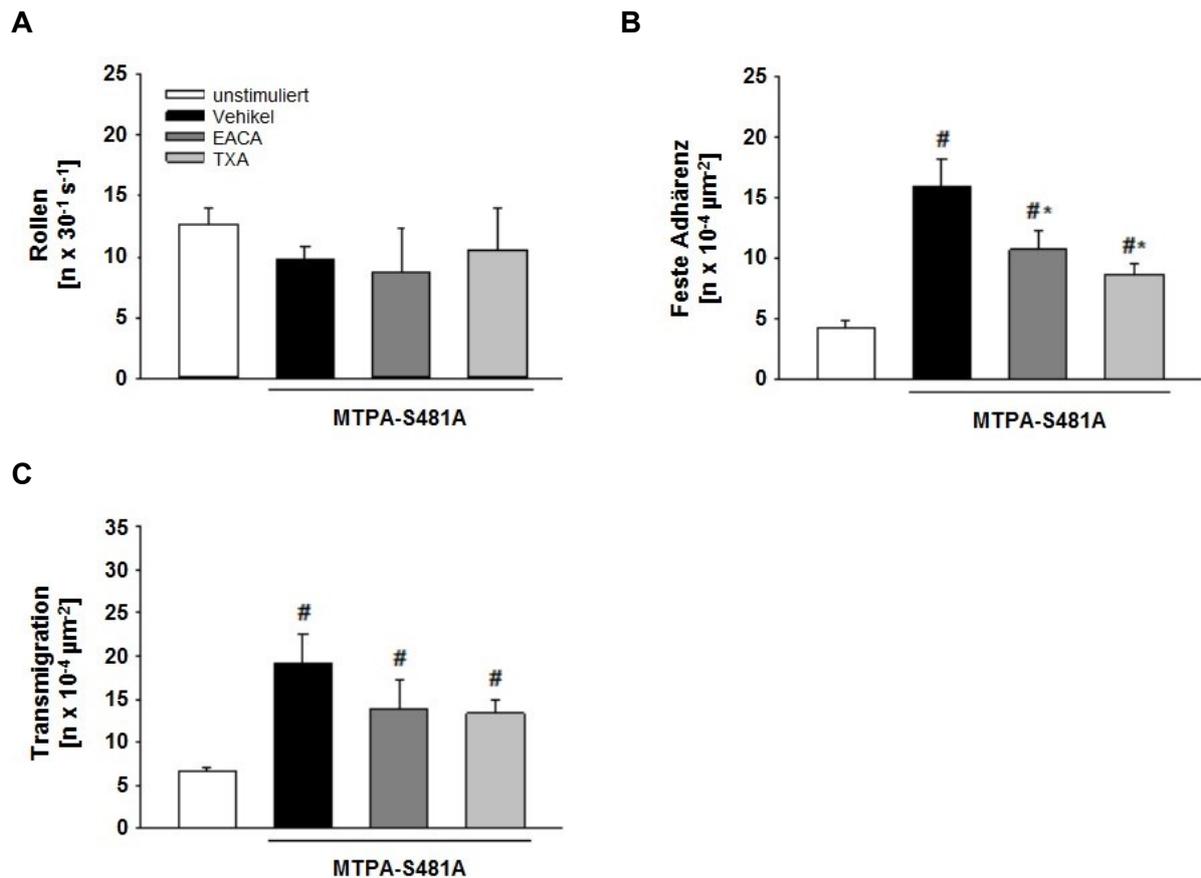


Abb. IV/2.11: Der Einfluss von EACA oder TXA auf leukozytäres Rollen, feste Adhärenz und Transmigration wurde in postkapillären Venolen des *M. cremaster* nach intraskrotaler Stimulation mit MTPA-S481A untersucht (MW ± SEM bei n=4 pro Versuchsgruppe, # p < 0,05 vs. unstimuliert, * p < 0,05 vs. Vehikel).

2.4 Die Rolle von Mastzellen, der Proteinsynthese sowie Lipidmediatoren für die tPA-abhängige Leukozytenrekrutierung

In vorhergegangenen *In-vitro*-Studien wurden Mastzellen als Zielzellen von tPA beschrieben [158]. Zur Bestimmung der Mastzellaktivität wurde im Kremastermuskel die Anzahl Ruthenium-Rot-positiver Zellen bestimmt (Vgl. Abb. IV/2.12).

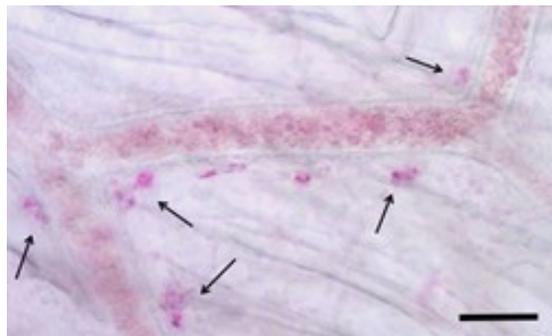


Abb. IV/2.12: Repräsentatives Lichtmikroskopiebild eines mit Ruthenium-Rot gefärbten Kremastermuskels der Maus nach tPA-Stimulation zur Detektion aktivierter Mastzellen (Pfeile; Maßstabsbalken, 50 µm).

Nach Induktion von I/R kam es im Vergleich zu scheinoperierten Tieren zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl Ruthenium-Rot-positiver Zellen im Kremastermuskel der Versuchstiere. In tPA-defizienten Versuchstieren war diese Steigerung wiederum signifikant verringert (Vgl. Abb. IV/2.13).

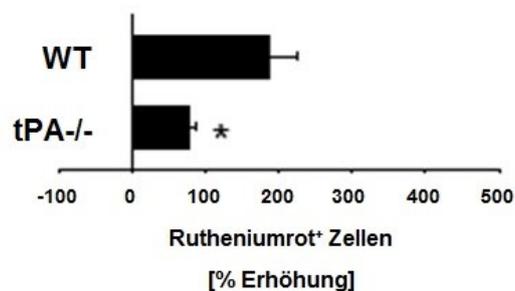


Abb. IV/2.13: Bestimmung der Anzahl Ruthenium-Rot-positiver Mastzellen im gesamten Kremastermuskel. Ergebnisse für WT und tPA-defiziente Mäuse nach I/R des Kremastermuskels im Verhältnis zu scheinoperierten WT-Tieren. MW ± SEM bei n=6 pro Gruppe, * $p < 0,05$ vs. WT (I/R).

Darüber hinaus verursachte die intraskrotale Stimulation mit nativem tPA oder tPA-Mutanten, deren katalytische Domänen inaktiv sind oder die nicht von Plasmin gespalten werden können (Vgl. Beschreibung Abb. IV/2.8), einen vergleichbaren Anstieg Ruthenium-Rot-positiver Zellen (Vgl. Abb. IV/2.14).

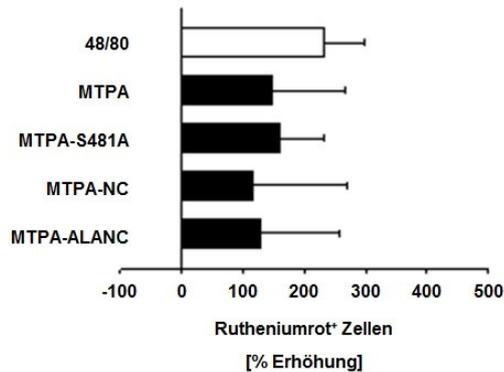


Abb. IV/2.14: Bestimmung der Anzahl Ruthenium-Rot-positiver Mastzellen im gesamten Kremastermuskel. Vergleich des Effektes der intraskrotalen Injektion von verschiedenen rekombinanten, murinen tPA-Mutanten zu nativem rekombinanten murinen tPA bezüglich der Aktivierung von Mastzellen. MW \pm SEM bei n=6 pro Gruppe, * p < 0,05 vs. Gruppe nach MTPA nativ.

Die Behandlung mit dem Mastzellstabilisator Cromoglycinsäure hob die tPA-induzierte Zunahme der Anzahl Ruthenium-Rot-positiver Zellen vollkommen auf. Damit einhergehend senkte es die durch tPA-induzierte Zunahme der festen Adhärenz und Transmigration von Leukozyten auf Kontrollniveau, ohne das intravaskuläre Rollen von Leukozyten signifikant zu beeinflussen (Vgl. Abb. IV/2.15; Daten zur Leukozytenrekrutierung nicht gezeigt).

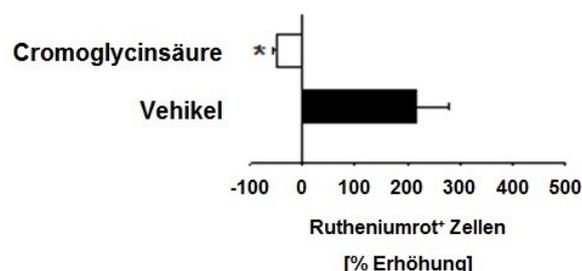


Abb. IV/2.15: Bestimmung der Anzahl Ruthenium-Rot-positiver Mastzellen im gesamten Kremastermuskel. Ergebnisse für die intraskrotale Stimulation mit tPA bei Behandlung mit Cromoglycinsäure oder Vehikel. MW \pm SEM bei n=6 pro Gruppe, * p < 0,05 vs. Vehikel.

Mittels RT-PCR konnten wir zeigen, dass sich durch Ischämie und Reperfusion im Vergleich zu einer Scheinoperation die RNA-Expression der lyso-PAF Acetyltransferase (lyso-PAF-AT) im Kremastergewebe signifikant erhöhte, während sich die RNA-Expression von Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LO) verminderte. Diese Enzyme sind in der Synthese von Leukotrienen und PAF involviert. In tPA-defizienten Tieren war die Erhöhung der (lyso-PAF-AT)-Expression nach I/R leicht, jedoch nicht signifikant, vermindert. Weiterhin war die durch I/R induzierte Absenkung der RNA-Expression von 5-LO in tPA-defizienten gegenüber den WT Tieren signifikant auf ein den scheinoperierten Tieren entsprechendes Niveau, erhöht (Vgl. Abb. IV/2.16).

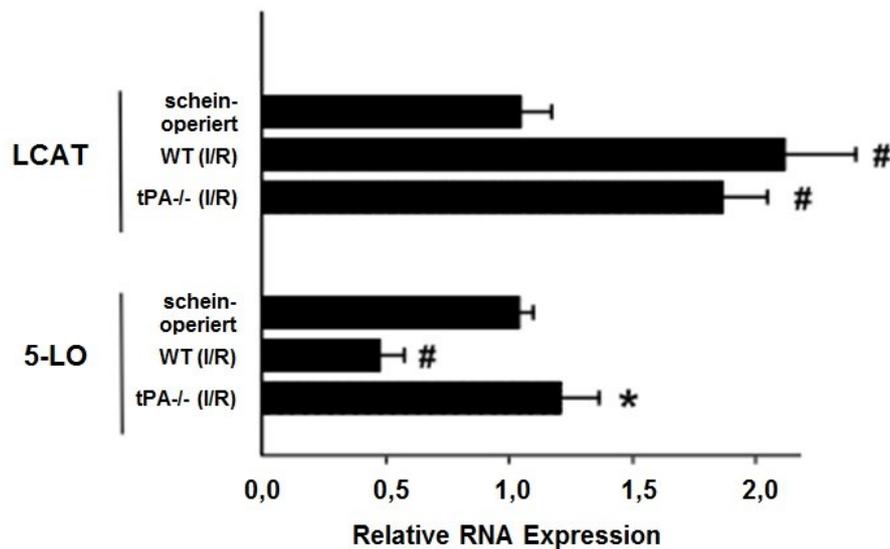


Abb. IV/2.16: Quantifizierung der RNA Expression von lyso-PAF Acetyltransferase (lyso-PAF-AT) und Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LO) im murinen Kremastermuskel. Daten für scheinoperierte WT Tiere sowie WT und tPA-defiziente Tiere nach I/R. MW \pm SEM bei n=6 pro Gruppe # $p < 0,05$ vs. scheinoperiert, * $p < 0,05$ vs. WT (I/R).

In weiteren Experimenten wurde der Effekt der direkten intraskrotalen Stimulation mit tPA untersucht. Es wurde eine Erhöhung der Gewebe-RNA-Expression von lyso-PAF Acetyltransferase (lyso-PAF-AT) induziert, während sich die RNA-Expression von Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LO), vergleichbar zur Stimulation durch I/R, verminderte (Vgl. Abb. IV/2.17).

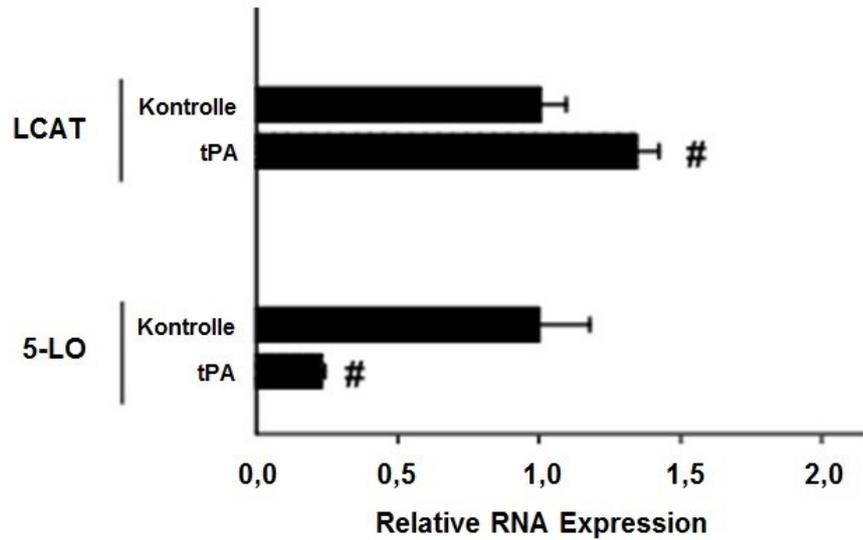


Abb. IV/2.17: Quantifizierung der RNA Expression von lyso-PAF Acetyltransferase (lyso-PAF-AT) und Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LO) im murinen Kremastermuskel. Daten für scheinoperierte WT Tiere sowie WT und tPA-defiziente Tiere nach I/R. MW \pm SEM bei n=6 pro Gruppe, # p < 0,05 vs. Kontrolle.

Die intraskrotale Stimulation mit tPA führte zu einer signifikanten Zunahme der fest adhären und transmigrierten Leukozyten in postkapillären Venolen des Kremastermuskels im Vergleich zu PBS-Kontrolltieren. Durch die Applikation von Actinomycin D (Proteinsyntheseinhibitor) wurde die tPA-induzierte feste Adhärenz und Transmigration vollständig aufgehoben (Vgl. Abb. IV/2.18/A, Abb. IV/2.18/B und Abb. IV/2.18/C).

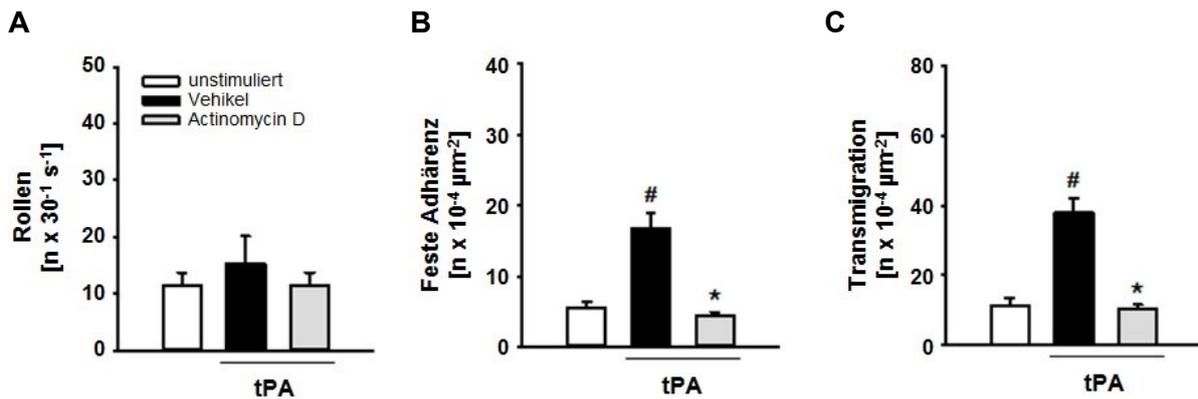


Abb. IV/2.18: Anzahl der rollenden (A), fest adhären (B) und transmigrierten (C) Leukozyten in postkapillären Venolen des Kremastermuskels nach tPA-Stimulation. Vergleich der Behandlung mit Actinomycin D. MW \pm SEM bei $n=6$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. unstimuliert, * $p < 0,05$ vs. Vehikel.

Eine Behandlung mit Cromoglycinsäure (Mastzellstabilisation), BN52001 (Blockade des PAF-Rezeptors), MK886 (Antagonist der Leukotriensäuresynthese), nicht aber mit Indomethacin (Inhibition der Prostaglandinsynthese über die Inhibition der Cyclooxygenasen) hatte eine signifikante Reduktion der tPA-vermittelten festen Adhärenz und Transmigration von Leukozyten in postkapillären Venolen des Kremastermuskels zur Folge. Das intravaskuläre Rollen war zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nicht signifikant verändert (Vgl. Abb. IV/2.19/A, Abb. IV/2.19/B und Abb. IV/2.19/C).

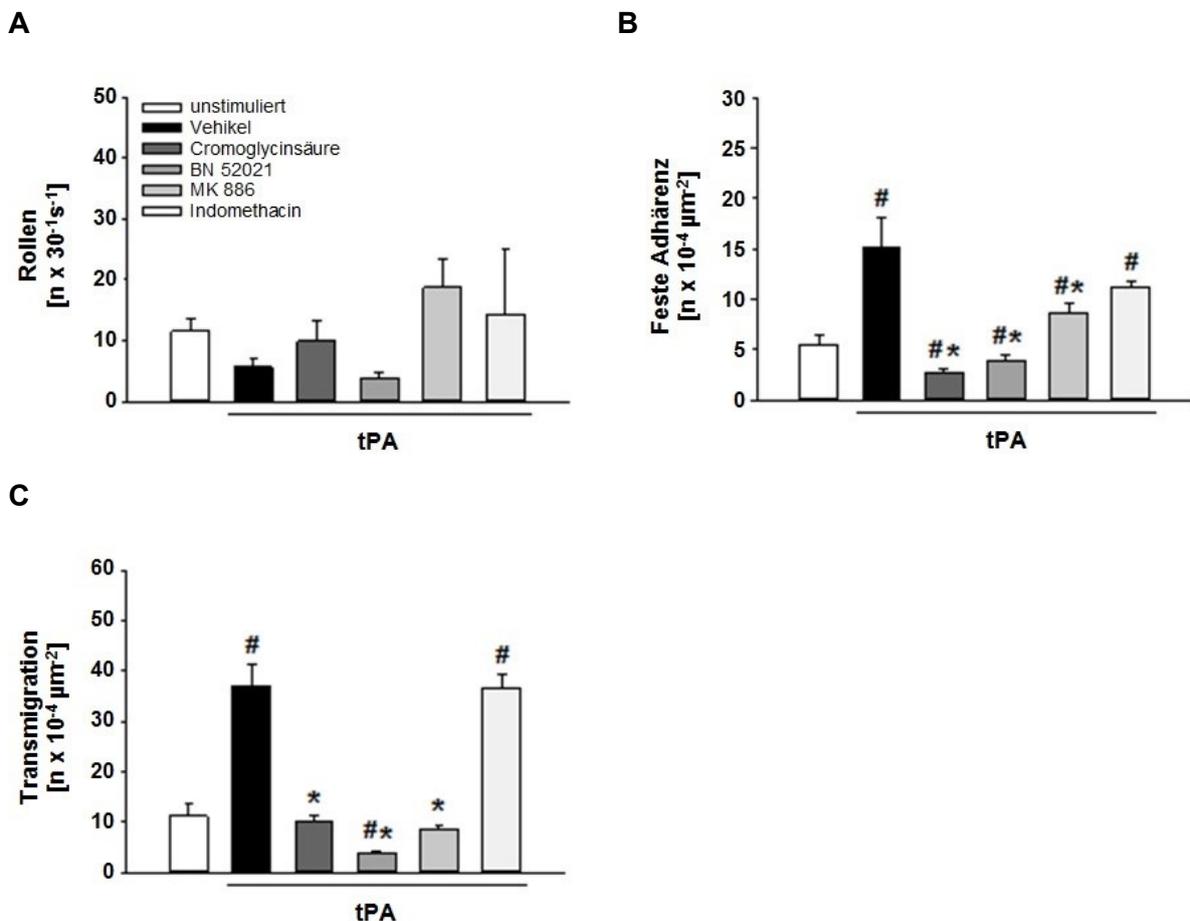


Abb. IV/2.19: Anzahl der intravaskulär rollenden, fest adhärenen und transmigrierten Leukozyten in postkapillären Venolen nach tPA-Stimulation. Vergleich der Behandlung mit Cromoglycinsäure, BN 52021, MK 886 und Indomethacin. MW ± SEM bei n=6 pro Gruppe, # p < 0,05 vs. unstimuliert, * p < 0,05 vs. Vehikel.

2.5 Die Bedeutung von tPA für die mikrovaskuläre Permeabilität

Der Zusammenbruch der mikrovaskulären Barrierefunktion ist ein weiteres entscheidendes Merkmal des IRS. Als Methode zur Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität wurde die Extravasation des intravenös applizierten Makromoleküls FITC-Dextran aus den Gefäßen in das perivaskuläre Gewebe im postischämischen Kremastermuskel analysiert. Hierzu wurde die Fluoreszenzintensität mittels *In-vivo*-Fluoreszenzmikroskopie bestimmt (Vgl. Abb. IV/2.20).

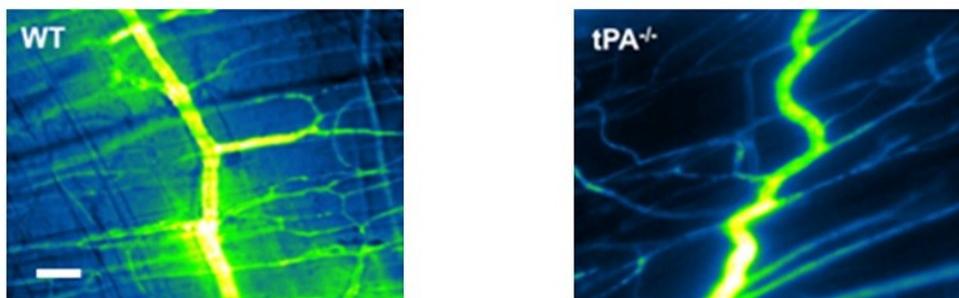


Abb. IV/2.20: Repräsentative *In-vivo*-Fluoreszenzmikroskopiebilder des Kremastermuskels von WT beziehungsweise tPA-defizienten Mäusen nach intravenöser Applikation von FITC-Dextran sowie Ischämie und Reperfusion (Maßstabsbalken: 50 μ m).

Nach Ischämie (30 Minuten) und Reperfusion (150 Minuten) kam es zu einem signifikant erhöhten Austritt von FITC-Dextran aus postkapillären Venolen im Kremastermuskel im Vergleich zu scheinoperierten Tieren. Demgegenüber war diese Erhöhung in tPA-defizienten Tieren signifikant reduziert (Vgl. Abb. IV/2.21).

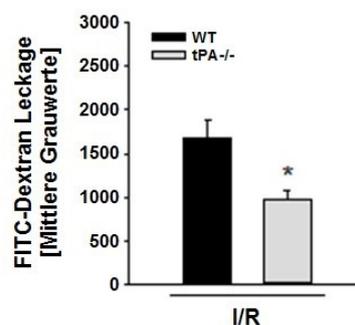


Abb. IV/2.21: Quantifizierung des extravasierten FITC-Dextrans aus postkapillären Venolen des Kremastermuskels von WT oder tPA-defizienten Mäusen. MW \pm SEM bei n=6 pro Gruppe, * $p < 0,05$ vs. WT.

Des Weiteren führte auch die direkte intraskrotale Stimulation mit nativem tPA und tPA-Mutanten (MTPA-S481A (nicht enzymatisches, murines tPA), MTPA-ALANC (nicht enzymatisches und nicht spaltbares, murines tPA und MTPA-NC (nicht spaltbares, murines tPA)) zu einem vergleichbaren, signifikanten Anstieg der FITC-Dextran-Extravasation. (Vgl. Abb. IV/2.22).

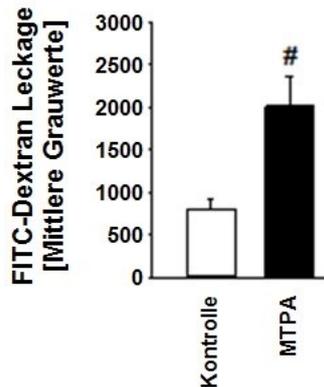


Abb. IV/2.22: Quantifizierung des extravasierten FITC-Dextrans aus postkapillären Venolen des Kremastermuskels mittels In-vivo-Fluoreszenzmikroskopie. Effekt der intraskrotalen Injektion von nativem rekombinanten murinen tPA. MW \pm SEM bei $m=6$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle

In Tieren, welche vor der intraskrotalen Stimulation mit einem die neutrophilen Granulozyten-depletierenden anti-Ly-6G Antikörper behandelt wurden, war der Austritt von FITC-Dextran stark herabgesetzt (Vgl. Abb. IV/2.23).

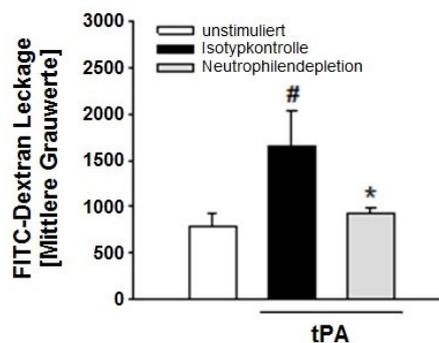


Abb. IV/2.23: Quantifizierung des extravasierten FITC-Dextrans aus postkapillären Venolen des Kremastermuskels mittels In-vivo-Fluoreszenzmikroskopie. Ergebnisse für Tiere nach Neutrophilendepletion oder nach Gabe eines Kontrollantikörpers bei tPA-Stimulation und Vergleich gegen PBS-stimulierte Tiere ohne Antikörperapplikation. MW \pm SEM bei $n=6$ pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. unstimuliert, * $p < 0,05$ vs. Isotypkontrolle.

Um die potentiellen direkten Effekte von tPA auf die mikrovaskuläre Barrierefunktion genauer zu verstehen, wurde die Permeabilität von mikrovaskulären Endothelzellschichten für Makromoleküle *in vitro* untersucht. Durch die Exposition mit tPA erhöhte sich die Permeabilität der mikrovaskulären Endothelzellschichten für Makromoleküle dosisabhängig (Vgl. Abb. IV/2.24).

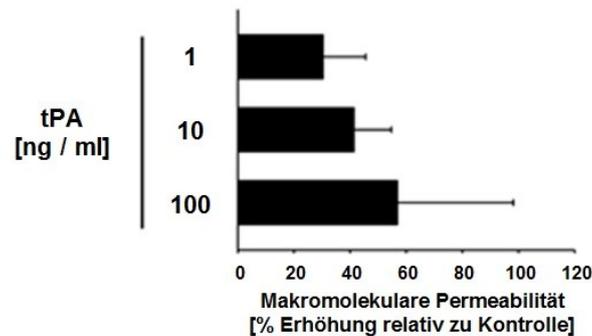


Abb. IV/2.24: Quantifizierung der makromolekularen Permeabilität bei unterschiedlichen tPA-Dosierungen im Verhältnis zur Kontrollgruppe. MW \pm SEM bei n=6 pro Gruppe.

Dieser Effekt wurde durch die Zugabe eines Inhibitors, der die enzymatische Funktion von tPA hemmt (PAI-1), vollständig aufgehoben. Die Blockade des tPA-Rezeptors *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP) durch die Zugabe von RAP (Rezeptor-assoziiertes Protein) zeigte keinen signifikanten Effekt auf die tPA-induzierte Permeabilität der Endothelzellschicht (Vgl. Abb. IV/2.25).

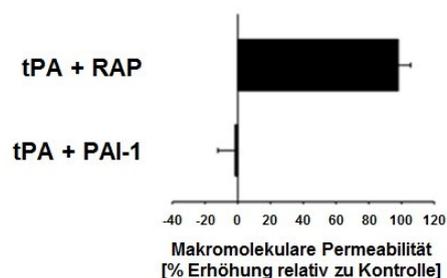


Abb. IV/2.25: Quantifizierung der makromolekularen Permeabilität von Endothelzellschichten bei Stimulation mit tPA und Behandlung mit RAP oder PAI-1 im Verhältnis zur Kontrollgruppe. MW \pm SEM bei n=6 pro Gruppe.

2.6 Systemische Leukozytenzahlen und mikrohämodynamische Parameter

Es wurden der Gefäßinnendurchmesser, die Blutfließgeschwindigkeit und die Wandscherrate der untersuchten postkapillären Venolen bestimmt. Zusätzlich wurden die systemischen Leukozytenzahlen der Versuchstiere im Vollblut gemessen um die Kompatibilität zwischen den Gruppen zu überprüfen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (Vgl. Tab. IV/2.1).

Tab. IV/2.1: Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen. Die systemischen Leukozytenzahlen sowie die mikrohämodynamischen Parameter einschließlich des Gefäßinnendurchmessers, der Blutfließgeschwindigkeit und der Wandscherrate wurden, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, erhoben (Vgl. III/2.6 und III/2.7; MW \pm SEM bei n=3-6 pro Gruppe).

Stimulus	Tier/ Behandlung	Gefäßinnen- durchmesser [μm]	Blutfließ- geschwindig- keit [mm s^{-1}]	Wandscherrate [s^{-1}]	Systemische Leukozyten- zahl [$\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$]
schein- operiert	WT	$24,6 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,2$	$2013,3 \pm 341,3$	$3,4 \pm 0,9$
I/R	WT	$25,6 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,1$	$1666,5 \pm 85,9$	$4,0 \pm 0,4$
I/R	tPA-/-	$24,6 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,2$	$1870,8 \pm 400,9$	$3,3 \pm 0,6$
PBS (i.a.)	WT	$22,8 \pm 2,0$	$1,1 \pm 0,2$	$1998,6 \pm 459,3$	$4,2 \pm 1,0$
MTPA (0.01 μg , i.a.)	WT	$25,7 \pm 2,4$	$1,2 \pm 0,1$	$2000,9 \pm 368,0$	$4,1 \pm 0,3$
MTPA (0.1 μg , i.a.)	WT	$24,3 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	$1989,8 \pm 296,2$	$3,4 \pm 0,4$
MTPA (1.0 μg , i.a.)	WT	$23,1 \pm 2,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1990,3 \pm 175,5$	$3,0 \pm 1,0$
PBS (i.s.)	WT	$24,8 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,1$	$1649,7 \pm 214,2$	$5,0 \pm 0,6$

Stimulus	Tier/ Behandlung	Gefäßinnen- durchmesser [μm]	Blutfließ- geschwindig- keit [mm s^{-1}]	Wandscherrate [s^{-1}]	Systemische Leukozyten- zahl [$\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$]
MTPA (0.01 μg , i.s.)	WT	$27,7 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,1$	$1619,6 \pm 218,7$	$3,4 \pm 0,4$
MTPA (0.1 μg , i.s.)	WT	$27,3 \pm 1,0$	$1,2 \pm 0,1$	$1816,2 \pm 61,5$	$3,9 \pm 0,8$
MTPA (1.0 μg , i.s.)	WT	$26,9 \pm 1,8$	$1,2 \pm 0,1$	$1794,9 \pm 109,6$	$3,8 \pm 1,3$
PBS	WT	$25,0 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,1$	$1827,0 \pm 170,4$	$4,8 \pm 0,4$
MTPA	WT	$26,3 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,5$	$1715,5 \pm 803,4$	$3,9 \pm 0,9$
MTPA- S481A	WT	$25,5 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,4$	$1926,7 \pm 582,3$	$5,8 \pm 1,5$
MTPA-NC	WT	$25,7 \pm 1,7$	$1,2 \pm 0,3$	$1763,1 \pm 378,2$	$4,3 \pm 1,7$
MTPA- ALANC	WT	$26,2 \pm 1,9$	$1,0 \pm 0,2$	$1382,0 \pm 400,4$	$4,7 \pm 2,5$
schein- operiert	WT	$25,5 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,1$	$1829,4 \pm 51,4$	$2,2 \pm 0,9$
I/R	WT/ Isotyp AK	$24,7 \pm 1,8$	$1,1 \pm 0,1$	$1760,5 \pm 161,2$	$4,1 \pm 1,7$
I/R	WT/ Anti- fibrinogen AK	$23,3 \pm 2,2$	$1,4 \pm 0,2$	$2320,1 \pm 221,1$	$3,8 \pm 1,2$
PBS	WT	$24,6 \pm 1,3$	$1,2 \pm 0,1$	$1912,2 \pm 302,8$	$2,2 \pm 0,9$
MTPA	WT/ Vehikel	$24,6 \pm 1,3$	$1,3 \pm 0,2$	$2041,2 \pm 388,2$	$2,5 \pm 1,6$
MTPA	WT/ EACA	$24,7 \pm 0,7$	$1,0 \pm 0,2$	$1536,6 \pm 201,8$	$5,2 \pm 3,9$

Stimulus	Tier/ Behandlung	Gefäßinnen- durchmesser [μm]	Blutfließ- geschwindig- keit [mm s^{-1}]	Wandscherrate [s^{-1}]	Systemische Leukozyten- zahl [$\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$]
MTPA	WT/ TXA	$23,8 \pm 0,9$	$1,0 \pm 0,3$	$1663,3 \pm 555,6$	$2,2 \pm 0,9$
plasmin	WT/ Vehikel	$25,5 \pm 1,2$	$1,2 \pm 0,4$	$1949,7 \pm 509,0$	$2,4 \pm 0,3$
plasmin	WT/ MMP-2/- 9 inhibitor III	$25,5 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,2$	$2108,3 \pm 317,4$	$3,2 \pm 1,1$
MTPA	WT/ Vehikel	$25,9 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,1$	$1704,5 \pm 151,0$	$3,3 \pm 0,7$
PBS	WT	$24,7 \pm 0,8$	$1,1 \pm 0,3$	$1836,6 \pm 481,2$	$5,0 \pm 0,8$
MTPA	WT/ Vehikel	$26,4 \pm 0,8$	$1,2 \pm 0,4$	$1829,0 \pm 417,3$	$3,6 \pm 0,9$
MTPA	WT/ Actino- mycin D	$24,7 \pm 1,3$	$1,1 \pm 0,2$	$1665,6 \pm 331,7$	$3,3 \pm 0,5$
MTPA	WT/ Vehikel	$23,9 \pm 1,0$	$1,4 \pm 0,1$	$2260,5 \pm 160,4$	$4,5 \pm 2,1$
MTPA	WT/ Cromoglicin- säure	$24,6 \pm 1,2$	$1,3 \pm 0,2$	$2160,3 \pm 259,5$	$5,3 \pm 2,8$
MTPA	WT/ BN 52021	$24,1 \pm 1,2$	$1,2 \pm 0,1$	$1997,7 \pm 173,4$	$4,3 \pm 2,6$
MTPA	WT/ MK-886	$24,5 \pm 0,9$	$1,4 \pm 0,2$	$2186,9 \pm 346,6$	$4,6 \pm 1,6$
MTPA	WT/ Indo- methacin	$24,7 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,2$	$1665,6 \pm 331,7$	$4,2 \pm 2,8$
MTPA- S481A	WT/ Vehikel	$24,7 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,1$	$1253,9 \pm 94,2$	$2,6 \pm 0,4$

Stimulus	Tier/ Behandlung	Gefäßinnen- durchmesser [μm]	Blutfließ- geschwindig- keit [mm s^{-1}]	Wandscherrate [s^{-1}]	Systemische Leukozyten- zahl [$\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$]
MTPA- S481A	WT/ TXA	$25,1 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,1$	$1270,1 \pm 145,1$	$3,0 \pm 0,2$
MTPA- S481A	WT/ EACA	$25,3 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,1$	$1280,5, X \pm 76,8$	$2,2 \pm 0,3$

2.7 Phänotypisierung der transmigrierten Leukozyten

Die Phänotypisierung der transmigrierten Leukozyten wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen von in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten des Kremastermuskels durchgeführt. Über 80 % der, als Reaktion auf Ischämie und Reperfusion oder intraskrotaler Stimulation mit tPA ausgewanderten CD45-positiven Leukozyten, waren Ly-6G-positive neutrophile Granulozyten. Die verbleibenden 10 – 20 % CD45-positiven Leukozyten stellten sich als F4/80-positive Monozyten/Makrophagen dar (Daten nicht gezeigt).

V. Diskussion

1. Ischämie-Reperfusion

Der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) stellt noch immer die häufigste Ursache für Organdysfunktion und -versagen nach Myokardinfarkt, hämorrhagischem Schock und Schlaganfall dar [2]. Bei der Behandlung dieser Krankheitsbilder ist die schnellstmögliche Wiederherstellung der Organperfusion das primäre Ziel [12]. Im klinischen Alltag werden bei thromboembolischen Ereignissen rekombinante Plasminogenaktivatoren wie etwa *tissue-type plasminogen activator* (tPA) oder *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) eingesetzt [12]. Diese Enzyme fördern über die Aktivierung von Plasminogen, welches als Schlüsselenzym der Fibrinolyse fungiert, die proteolytische Auflösung von Fibringerinnseln und können so die Reperfusion eines ischämischen Gewebes einleiten [12]. Die fibrinolytische Komponente der Funktion der Plasminogenaktivatoren wurde in der Vergangenheit gründlich untersucht [119, 135]. Darüber hinaus finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass tPA und uPA zusätzlich wichtige biologische Funktionen über nicht-fibrinolytische Eigenschaften vermitteln. In diesem Zusammenhang scheinen sie unter anderem wesentlich an der Ausbildung des IRS beteiligt zu sein [148, 149, 159-161]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch bislang unzureichend verstanden.

2. Bedeutung von uPA und tPA für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in postischämisches Gewebe

Die Rekrutierung von Leukozyten aus Gefäßen der Mikrozirkulation zum Ort einer Gewebeschädigung stellt ein entscheidendes Ereignis der sterilen Entzündungsreaktion nach Ischämie und Reperfusion dar. Aus diesem Grund untersuchten wir zu Beginn unserer Experimente den Einfluss der Plasminogenaktivatoren uPA und tPA auf diesen Prozess. Hierfür setzten wir *In-vivo*-Transilluminationsmikroskopie am präparierten Kremastermuskel der Maus ein. Dieser Ansatz ermöglichte es uns, intravaskuläres Rollen und feste Adhärenz von Leukozyten am Gefäßendothel postkapillärer Venolen sowie die nachfolgende Transmigration dieser Immunzellen in das perivaskuläre Gewebe quantitativ zu analysieren. Die Tiere wurden für die gesamte Versuchsdauer anästhesiert. Nach Induktion einer 30 minütigen Ischämie und einer anschließenden Reperusionsphase von 120 Minuten waren die feste intravaskuläre Adhärenz und die Transmigration von Leukozyten in uPA- als auch in tPA-defizienten Tieren im Vergleich zu WT-Tieren signifikant vermindert. Demgegenüber zeigte sich die feste intravaskuläre Adhärenz von Leukozyten nach 60 Minuten Reperfusion nur in uPA-defizienten, nicht aber in tPA-defizienten Tieren, signifikant verringert. Das intravaskuläre Rollen von Leukozyten war zu keinem der Beobachtungszeitpunkte signifikant verändert. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Plasminogenaktivatoren uPA und tPA entscheidend an der Regulation des leukozytären Rekrutierungsprozesses nach Ischämie und Reperfusion beteiligt sind. Gleichzeitig zeigen unsere Daten, dass uPA und tPA innerhalb des Rekrutierungsprozesses zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich involviert sind. Diese Ergebnisse erweitern Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, welche den Einfluss der Plasminogenaktivatoren in unterschiedlichen Entzündungsmodellen untersuchten. In diesem Zusammenhang wurde uPA bereits in früheren Publikationen als regulierendes Element der Leukozytenextravasation unter verschiedenen inflammatorischen Bedingungen beschrieben. Beispielsweise wurden in einem Modell der *Cryptococcus neoformans*-induzierten Pneumonie uPA-defiziente Mäuse mit WT-Mäusen verglichen. Die

Rekrutierung myeloider Leukozyten stellte sich in der Gruppe der uPA-defizienten Mäuse als vermindert dar. Diese reduzierte Leukozytenrekrutierung ging mit einer unkontrollierten Infektion und einer deutlich erhöhten Mortalität einher [162]. In einer weiteren Studie wurde der Einfluss von uPA in einem Modell der LPS-induzierten Pneumonie untersucht. Die Autoren dieser Studie beschrieben, dass in uPA-defizienten Mäusen weniger neutrophile Granulozyten in das entzündete Lungengewebe rekrutiert wurden. Interessanterweise führte die reduzierte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in diesem Fall jedoch zu einem reduzierten Gewebeschaden [163]. Der wichtigste und am besten untersuchte Rezeptor von uPA ist der uPA-Rezeptor (uPAR) [107, 164]. In *In-vitro*-Experimenten wurde bewiesen, dass uPA über die Interaktion mit dem uPA-Rezeptor Leukozyten aktivieren kann [107]. Allerdings fand sich in verschiedenen *In-vivo*-Studien eine vom jeweils untersuchten Modell abhängige, unterschiedliche funktionelle Relevanz des uPA-Rezeptors für die uPA-regulierte Leukozytenrekrutierung. In einem Peritonitis- sowie in einem Pneumoniemodell spielte die Interaktion von uPA mit dem uPAR eine entscheidende Rolle für die Rekrutierung von Leukozyten [165, 166]. Im Gegensatz dazu war diese Interaktion in einem Arteriogenesemodell für die Rekrutierung von Leukozyten nicht erforderlich [167].

Neben uPA wurde in weiteren Studien auch der Einfluss von tPA auf Entzündungsprozesse untersucht. In einem Ischämie-Reperusionsmodell der Niere wurden in tPA-defizienten Tieren weniger neutrophile Granulozyten in das postischämische Organ rekrutiert. Zusätzlich verbesserte sich die Nierenfunktion nach Ischämie und Reperfusion in tPA-defizienten Tieren erheblich schneller als in den WT-Tieren [149]. In einem Ischämie-Reperusionsmodell der Lunge hatte die tPA-Defizienz ebenfalls einen protektiven Effekt auf die Organfunktion. In diesem Zusammenhang war der positive Effekt auf die Organfunktion weiterhin ebenso mit einer verminderten Invasion von neutrophilen Granulozyten und einer verringerten mikrovaskulären Permeabilität assoziiert [148]. Darüber hinaus zeigten tPA-defiziente Mäuse in einem Schlaganfallmodell signifikant verringerte Infarktareale nach Ligatur der *A. cerebri media* [160].

Insgesamt scheinen uPA und tPA somit einen starken Einfluss auf die Rekrutierung von Leukozyten während Ischämie und nachfolgender Reperfusion auszuüben. Die zugrunde liegenden Mechanismen sowie der Einfluss auf einen entzündungsbedingten Gewebeschaden scheinen jedoch, insbesondere in Bezug auf uPA, vom jeweiligen Stimulus und dem untersuchten Gewebetyp abzuhängen.

Unsere Ergebnisse ermöglichen in diesem Zusammenhang einen genaueren Einblick in den zeitlichen Verlauf und in die Mechanismen der uPA- und tPA-abhängigen Leukozytenrekrutierung während Ischämie und Reperfusion. uPA ist sowohl während der initialen Reperfusionsphase als auch zu späteren Zeitpunkten an der Regulation der festen Adhärenz und Transmigration von Leukozyten beteiligt. Demgegenüber vermittelt tPA in der initialen Phase selektiv die leukozytäre Transmigration, während es zu späteren Zeitpunkten auch an der Regulation der festen Adhärenz von Leukozyten am Gefäßendothel involviert ist. Lange Zeit wurde angenommen, dass Proteasen, darunter uPA und tPA, spezifisch die Transmigration von Leukozyten fördern, indem sie Verbindungen zwischen Endothelzellen spalten und proteolytisch die perivenuläre Basalmembran degradieren. Dem widersprechen unsere Beobachtungen, die deutlich zeigen, dass die postischämische Neutrophilenextravasation in tPA- und uPA-defizienten Tieren bereits auf der Ebene der intravaskulären Adhärenz beeinträchtigt ist. Diese Befunde könnten sich dadurch erklären lassen, dass uPA und tPA neben ihrer klassischen Rolle als Proteasen auch nicht-proteolytische Eigenschaften besitzen und als Entzündungsmediatoren agieren. So wurde gezeigt, dass uPA als chemotaktischer Lockstoff für neutrophile Granulozyten fungiert und diese Immunzellen direkt aktivieren kann [114]. Des Weiteren könnten tPA und uPA die Leukozytenrekrutierung auch indirekt verstärken. In *In-vitro*-Experimenten wurde gezeigt, dass tPA die Degranulation von Mastzellen induzieren kann. Dabei setzen Mastzellen unter anderem Histamin sowie unterschiedlichste Zytokine und Lipidmediatoren frei [158]. Im Gewebe könnte dieser Prozess über eine gesteigerte Endothelzellaktivierung und die Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität die intravaskuläre Adhäsion und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das perivaskuläre Gewebe verstärken. Darüber hinaus können

tPA und uPA über die Aktivierung von Plasminogen verschiedene Matrix-Metalloproteinasen aktivieren [119]. Diese Enzyme können Zytokine und auch Chemokine spalten und dadurch den Entzündungsprozess beeinflussen. Beispielsweise führt die enzymatische Prozessierung von LIX (LPS induziertes CXC Chemokin) oder CXCL8 zu einer Steigerung des chemotaktischen Potenzials dieser Moleküle [168]. Über die Aktivierung von MMPs könnten uPA und tPA infolgedessen zusätzlich die Leukozytenrekretierung verstärken.

3. Einfluss des leukozytären sowie nicht-leukozytären uPA und tPA auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in postischämisches Gewebe

Unter physiologischen Bedingungen sind beide Plasminogenaktivatoren im Blutplasma nachweisbar. Sowohl im Menschen als auch in der Maus finden sich deutlich höhere Plasmaspiegel von tPA als von uPA [169, 170]. tPA wird hauptsächlich von mikrovaskulären Endothelzellen sezerniert und dient in erster Linie der Auflösung von Fibringerinnseln [171]. Die Protease uPA wurde in humanem Urin, kultivierten Nierenzellen, humanem Plasma und verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen [172-175]. Es wird jedoch immer noch kontrovers diskutiert, ob und in welchem Ausmaß uPA von Endothelzellen produziert wird. Einerseits konnte uPA in diversen Studien in Kulturen von humanen und bovinen Endothelzellen nachgewiesen werden [176, 177]. Andererseits widersprechen Ergebnisse anderer Publikationen diesen Beobachtungen, da deren Autoren uPA in Endothelzellkulturen nicht nachweisen konnten [178, 179]. In einem Schlaganfallmodell wurde im perivaskulären Gewebe der betroffenen Hirnareale eine verstärkte Aktivität der Proteasen uPA und tPA nach Ischämie und Reperfusion nachgewiesen. Von welchen Zellen die Plasminogenaktivatoren in diesem Zusammenhang produziert werden, wurde jedoch nicht genauer untersucht [180-182]. Um die kontrovers diskutierte Frage zu klären, ob, und falls ja, von welchen Zellen uPA und tPA nach Ischämie und Reperfusion exprimiert werden, fertigten wir

konfokalmikroskopische Aufnahmen von immungefärbten Gewebeproben des Kremastermuskels an. Wir konnten eine hohe Expression von tPA und uPA auf mikrovaskulären Endothelzellen sowie auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten nachweisen. In weiteren Experimenten bestätigten wir diese konfokalmikroskopischen Befunde mittels Durchflusszytometrie auf Einzelzellebene. Wie bereits vor Jahrzehnten beschrieben, liegt der Expression von tPA auf mikrovaskulären Endothelzellen eine konstante Bildung und Sekretion zugrunde [183]. Es ist zudem bekannt, dass tPA auf der Zelloberfläche und in Granula von neutrophilen Granulozyten zu finden ist. Werden diese Immunzellen durch inflammatorische Stimuli aktiviert, wird tPA exozytotisch freigesetzt und gleichzeitig aktiv neu synthetisiert [184]. Wie bereits beschrieben, wird die Synthese von uPA auf Endothelzellen in der Literatur kontrovers diskutiert [185]. In einer *In-vitro*-Studie, in welcher eine Expression von uPA auf kultivierten Endothelzellen nachgewiesen wurde, fand sich zusätzlich eine erhöhte Expression von uPA nach inflammatorischer Stimulation [186]. Demzufolge könnte die von uns im postischämischen Kremastermuskel nachgewiesene Kolokalisation von uPA mit Endothelzellen durch die Produktion dieser Protease in Endothelzellen erklärt werden. Da kürzlich gezeigt wurde, dass Glykosaminoglykane als Bindungspartner von uPA fungieren, könnte die Kolokalisation aber auch darauf zurückgeführt werden, dass uPA – ähnlich wie Chemokine – von Glykosaminoglykanen auf der luminalen Oberfläche von Endothelzellen gebunden und präsentiert wird [187]. Der Nachweis von uPA auf neutrophilen Granulozyten respektive in deren Granula wurde dagegen bereits erbracht [188]. Das Protein ist in primären Granula der neutrophilen Granulozyten zu finden und wird nach Stimulation dieser Immunzellen – vergleichbar mit tPA – sezerniert und aktiv synthetisiert [188].

Da wir nachweisen konnten, dass beide Plasminogenaktivatoren auf Endothelzellen und auf neutrophilen Granulozyten vorhanden sind, untersuchten wir in weiteren Experimenten den Beitrag von leukozytärem uPA im Vergleich zu nicht-leukozytärem uPA für die Rekrutierung von Leukozyten. Mit Hilfe einer Zelltransfertechnik konnten wir zeigen, dass sowohl das leukozytäre als auch das nicht-leukozytäre uPA die postischämische Extravasation von Leukozyten beeinflussen. Der gleiche Versuchsansatz wurde gewählt, um den Einfluss von

leukozytärem tPA im Vergleich zu nicht-leukozytärem tPA auf die Rekrutierung von Leukozyten zu analysieren. Unsere Daten weisen nach, dass auch das leukozytäre und das nicht-leukozytäre tPA entscheidend zur Rekrutierung von Leukozyten beitragen. Für einen funktionierenden Rekrutierungsprozess werden demnach sowohl leukozytäres tPA und uPA als auch nicht-leukozytäres tPA und uPA benötigt. Bei einer genaueren Analyse des Leukozytenrekrutierungsprozesses finden sich jedoch Unterschiede zwischen den beiden Plasminogenaktivatoren. Während in unseren Experimenten nicht-leukozytäres uPA die intravaskuläre, feste Adhärenz von Leukozyten vermittelte, mediierte leukozytäres uPA die transendotheliale Migration dieser Entzündungszellen in das postischämische Gewebe. Diese Beobachtungen führen uns zu folgender Schlussfolgerung: uPA kann von Endothelzellen auf der luminalen Seite präsentiert werden und interagiert dort mit den entsprechenden Rezeptoren auf rollenden Leukozyten. Luminal präsentiertes uPA verstärkt durch diese Interaktionen den Aktivierungsstatus rollender Leukozyten und vermittelt dabei deren feste Adhärenz am Endothel. Für den nächsten Schritt, die Transmigration von Leukozyten in das postischämische Gewebe, wird jedoch das leukozytäre uPA benötigt. Weiterhin schlussfolgern wir, dass sowohl leukozytäres als auch nicht-leukozytäres tPA die Rekrutierung von Leukozyten beeinflussen. Dabei beeinflussen leukozytäres und nicht-leukozytäres tPA die Rekrutierung von Leukozyten in postischämisches Gewebe bereits auf der Ebene der Adhärenz.

4. Transmigrationswege von neutrophilen Granulozyten im postischämischen Gewebe

Während des transendothelialen Migrationsprozesses müssen Leukozyten konsekutiv drei strukturelle Barrieren überwinden: An erster Stelle steht die Endothelzellschicht, gefolgt von der Basalmembran der Endothelzellen und einer Perizyten-schicht. Bei der transendothelialen Migration können Leukozyten grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Migrationswegen

wählen. Entweder wandern sie durch den Raum zwischen nebeneinanderliegenden Endothelzellen hindurch (parazellulärer Transmigrationsweg) oder sie durchdringen die Endothelzellen direkt (transzellulärer Transmigrationsweg). Unter den meisten inflammatorischen Bedingungen scheint die Mehrzahl der Leukozyten den parazellulären Transmigrationsweg zu nutzen [189]. In unserem Modell konnten wir zeigen, dass sich in der frühen Reperfusionphase über 90 % aller fest adhärenen Leukozyten in postkapillären Venolen in Kolokalisation zu Endothelzell-Endothelzellkontakten befinden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neutrophile Granulozyten in erster Linie ebenfalls den parazellulären Transmigrationsweg benutzen, um in das postischämische Gewebe auszuwandern. Insgesamt bestätigen wir damit aktuelle Ergebnisse anderer Untersuchungen [189].

5. Auswirkungen von uPA und tPA auf die Extravasation von neutrophilen Granulozyten

Um die zugrunde liegenden Mechanismen der durch uPA und tPA vermittelten Extravasation von neutrophilen Granulozyten in postischämisches Gewebe genauer zu verstehen, untersuchten wir den direkten Effekt der Plasminogenaktivatoren auf die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses.

Die intravasale Applikation von rekombinantem, murinem tPA hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Rekrutierung von Leukozyten aus postkapillären Venolen in das perivaskuläre Gewebe. Im fibrinolytischen System verhindern physiologische tPA-Inhibitoren, deren wichtigster Vertreter *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) darstellt, eine übermäßige Plasminaktivierung durch tPA [135]. Dieser Mechanismus könnte auch für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten relevant sein [170]. Im Gegensatz dazu kommt es während Ischämie und Reperfusion jedoch zu einer mikrovaskulären Permeabilitäts-erhöhung [190]. Zirkulierendes, endogenes tPA kann dadurch in das perivaskuläre Gewebe austreten. Eine Leukozytenrekrutierung, welche von extravasiertem tPA während einer

mikrovaskulären Aktivierung ausgelöst beziehungsweise verstärkt wird, erscheint damit physiologisch sinnvoll. Es könnte als „Indikator“ einer lokalen Entzündungsreaktion fungieren und Leukozyten zum Ort eines Gewebeschadens leiten. Aus diesem Grund untersuchten wir die Wirkung von intraskrotal und damit extravaskulär appliziertem tPA auf die verschiedenen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses. Unsere Daten zeigen, dass die extravaskuläre Applikation von tPA, im Gegensatz zur intravaskulären Applikation, eine signifikante und dosisabhängige Leukozytenextravasation induziert. Darüber hinaus verursachte auch die extravaskuläre Applikation von uPA eine signifikante und dosisabhängige Leukozytenextravasation. Unsere Ergebnisse untermauern die Befunde einer anderen Arbeitsgruppe, welche beschrieb, dass die Injektion von uPA in das Kniegelenk gesunder Mäuse eine Leukozyteninfiltration des Synovialgewebes verursacht [191].

6. Charakterisierung der Mechanismen der durch uPA induzierten Extravasation von neutrophilen Granulozyten

Die Plasminogenaktivatoren tPA und uPA können über proteolytische sowie verschiedene nicht-proteolytische Eigenschaften mit anderen Proteinen interagieren. Bislang ist jedoch nicht geklärt, welche Bedeutung diese funktionellen Eigenschaften für die Extravasation von Leukozyten in postischämisches Gewebe spielen.

Murines uPA kann mit DFP oder PAI-1 interagieren und einen Komplex bilden. Durch diese Komplexbildung wird die proteolytische Aktivität von uPA inhibiert [192]. Die intraskrotale Injektion der proteolytisch inaktiven Komplexe verursachte jeweils eine gegenüber der Kontrolle signifikant gesteigerte Rekrutierung von Leukozyten. Das Maß der durch die Injektion der Komplexe ausgelösten Leukozytenrekrutierung ist dabei vergleichbar mit der von nativem, murinen uPA. Aus diesem Vergleich folgerten wir, dass uPA die

Leukozytenrekrutierung in das Gewebe nahezu ausschließlich über nicht-proteolytische Eigenschaften vermittelt.

In mehreren *In-vitro*-Untersuchungen wurde gezeigt, dass uPA durch die Interaktion mit dem uPA-Rezeptor intrazelluläre Signalkaskaden initiiert und dadurch Leukozyten-Endothelzellinteraktionen beeinflusst [107]. In unseren Experimenten war die postischämische Transmigration von neutrophilen Granulozyten in uPAR-defizienten Mäusen erstaunlicherweise jedoch nicht signifikant verändert. Damit zeigen wir, dass uPA die Infiltration des reperfundierten Gewebes mit neutrophilen Granulozyten unabhängig von diesem Rezeptor vermittelt. Der *in vitro* beobachtete Einfluss der Wechselwirkung von uPA mit dem uPA-Rezeptor auf Leukozyten-Endothelzellinteraktionen scheint demnach *in vivo*, zumindest unter diesen inflammatorischen Bedingungen, keine Rolle zu spielen. In der Literatur wird die Relevanz des uPA-Rezeptors für die uPA-vermittelte Leukozytenrekrutierung unterschiedlich bewertet. Einerseits finden sich Publikationen, deren Schlussfolgerungen sich mit unseren Ergebnissen decken. So wurde gezeigt, dass der uPA-Rezeptor für die uPA-abhängige Monozytenrekrutierung in einem Arteriogenesemodell ebenfalls keine Rolle spielt [167]. In weiteren Publikationen wurde berichtet, dass Interaktionen von uPA mit dem uPA-Rezeptor zumindest für bestimmte Funktionen von uPA bedeutungslos sind. Entgegengesetzt dazu scheint der uPA-Rezeptor in Pneumonie- oder Peritonitismodellen entscheidend für die Migration von neutrophilen Granulozyten zu sein [165, 166]. Der uPA-Rezeptor könnte somit stimulus- und/oder gewebespezifisch unterschiedlich in die Leukozytenrekrutierung involviert zu sein.

Interessanterweise wurde kürzlich in einer *In-vitro*-Studie das β 2-Integrin Mac-1, welches auch als Komplementrezeptor und Adhäsionsmolekül fungiert, als weiterer Rezeptor von uPA beschrieben [193]. Wir zeigten in unseren Experimenten, dass die postischämische feste Adhärenz und (nachfolgende) Transmigration von neutrophilen Granulozyten durch die Blockade von Mac-1 signifikant reduziert wird. Darüber hinaus beobachteten wir, dass die

uPA-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gewebe fast vollständig von Mac-1 abhängt.

Folglich deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass uPA die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in reperfundiertes Gewebe über Mac-1 und unabhängig vom uPA-Rezeptor vermittelt. Diese Schlussfolgerung wird durch weitere Ergebnissen unterstützt. Die intraskrotale Injektion von humanem uPA, welches nicht mit dem murinen uPA-Rezeptor interagiert, führte zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, welche im Ausmaß mit der von murinem, nativen uPA vergleichbar ist. Weiterhin ist diese durch humanes uPA induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ebenfalls von Mac-1 abhängig. Das Integrin Mac-1 kann auf der Leukozytenoberfläche mit uPA-Rezeptor einen physikalischen Komplex bilden. Es wurde in *In-vitro*-Experimenten belegt, dass diese Interaktionen die Affinität von Leukozyten zum Beispiel für Fibrinogen erhöhen [193]. Die systemische Applikation des Peptids M25, welches diese Interaktion von Mac-1 mit dem uPA-Rezeptor hemmt, veränderte die postischämische Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten jedoch nicht signifikant [194, 195]. Diese Ergebnisse bestätigen damit die These, dass die uPA-vermittelte Adhäsion und Rekrutierung von Leukozyten in postischämisches Gewebe *in vivo* von Mac-1, aber nicht vom uPA-Rezeptor abhängt. Wir können in diesem Kontext jedoch nicht sicher beantworten, ob Mac-1 als Rezeptor für uPA fungiert oder ob dieses Integrin die uPA-vermittelte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten über andere Mechanismen induziert. Eine Interaktion zwischen Mac-1 und ICAM-1 oder PECAM-1 ist essentiell für die feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten in entzündetes Gewebe [21]. Granulozyten, die mit uPA stimuliert werden, weisen einen erhöhten Aktivierungsstatus und eine verstärkte Bindung an ICAM-1 und VCAM-1 auf. Eine Bindung von verschiedenen Liganden an Mac-1 aktiviert neutrophile Granulozyten über Outside-In-Signalwege und führt höchstwahrscheinlich zu einer Expressionserhöhung und/oder Konformationsänderung des Rezeptormoleküls, wodurch sich wiederum die Bindungsaffinität von Mac-1 für Liganden wie ICAM-1 oder PECAM-1 erhöht [196]. Somit könnte uPA über die Bindung an Mac-1 selbst oder über bisher unbekannte Signalwege die Mac-1-vermittelte Bindung von neutrophilen

Granulozyten an mikrovaskuläre Endothelzellen verstärken [163, 197]. Darüber hinaus lässt sich nicht genau bestimmen, in welchem Ausmaß uPA direkt oder indirekt die Migration von neutrophilen Granulozyten in das postischämische Gewebe herbeiführt. [191, 193]. In diesem Zusammenhang wurde, wie bereits diskutiert, einerseits belegt, dass uPA direkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt [114]. Darüber hinaus induziert uPA jedoch unter anderem in neutrophilen Granulozyten die Synthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF und MIP-2. Dadurch könnte eine Leukozytenrekrutierung indirekt über die sekundäre Aktivierung von Endothelzellen und Makrophagen verstärkt werden [163].

7. Charakterisierung der Mechanismen der durch tPA induzierten Extravasation von neutrophilen Granulozyten

Um zu prüfen, ob tPA über die enzymatische Aktivität den Rekrutierungsprozess von Leukozyten moduliert, testeten wir ein modifiziertes, murines tPA-Protein ohne proteolytische Aktivität. Der Verlust der proteolytischen Aktivität wird durch eine Mutation erreicht, welche zum Austausch der Aminosäure Serin (S481A) mit Alanin im aktiven Bindungszentrum der Protease führt [198]. Dabei behält das mutierte tPA-Protein die Fähigkeit zur Interaktion über Bindungsstellen, die in keinem Zusammenhang mit dem proteolytischen Zentrum der Protease stehen. Die dadurch vermittelten Funktionen beinhalten die Bindung an Fibrin, sind jedoch nicht darauf beschränkt [199]. Im Vergleich zu nativem tPA bewirkte die intraskrotale Injektion der nicht-enzymatischen Proteinvariante eine reduzierte Leukozytenrekrutierung in das perivaskuläre Gewebe. Das Ausmaß der Leukozytenrekrutierung war jedoch signifikant höher als in der Kontrolle und damit nicht vollkommen aufgehoben. Diese Daten legen die Schlussfolgerung nahe, dass tPA – im Gegensatz zu uPA – die Leukozytenrekrutierung durch proteolytische und nicht-proteolytische Funktionen vermittelt. Folglich weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass die Plasminogenaktivatoren tPA und uPA in die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung unterschiedlich involviert sind.

Die Einzelstrangform von tPA kann durch Plasmin oder Kallikrein in eine doppelsträngige Molekülform gespalten werden. Diese Prozessierung potenziert die enzymatische Aktivität von tPA-Molekülen in Abwesenheit von Fibrin um ungefähr eine Zehnerpotenz und ermöglicht damit eine effektivere Fibrinolyse [200]. Wir stellten deshalb die Hypothese auf, dass sich die tPA-Doppelstrangform auch bezüglich des Leukozytenrekrutierungspotentials *in vivo* von der Einzelstrangform unterscheidet. Um diese Hypothese zu überprüfen, verglichen wir murines, native tPA mit einer nicht spaltbaren tPA-Form in Bezug auf die Fähigkeit zur Rekrutierung von Leukozyten in perivaskuläres Gewebe. Das modifizierte tPA-Molekül ist durch eine Punktmutation (R279E) verändert und kann dadurch nicht mehr in eine Doppelstrangform gespalten werden [201, 202]. Die Anzahl der durch die intraskrotale Injektion rekrutierten Leukozyten war für beide Proteine vergleichbar. Darüber hinaus war das Ausmaß der durch eine nicht-enzymatische und nicht spaltbare tPA-Mutante ausgelöste Leukozytenrekrutierung vergleichbar zu dem Ausmaß der durch die nicht-enzymatische tPA-Mutante induzierten Leukozytenrekrutierung. Daraus schlussfolgern wir, dass die Prozessierung von tPA durch proteolytische Spaltung unerheblich für die tPA-abhängige Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ist.

Endothelzellen entwickeln in postischämischem Gewebe einen prokoagulatorischen Phänotyp. Dadurch kommt es zur Ablagerung von Fibrinogen auf dem mikrovaskulären Endothel [203, 204]. Übereinstimmend mit vorhergegangenen Beobachtungen zeigen wir, dass Fibrin(ogen) und/oder dessen Abbauprodukte an der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in postischämisches Gewebe beteiligt sind [205]. Da tPA der wichtigste Aktivator der Plasmin-abhängigen Fibrinolyse darstellt, untersuchten wir, ob tPA die postischämische Leukozytenantwort über Effekte auf die mikrovaskuläre Fibrinogen-deposition beeinflusst. Erstaunlicherweise war die postischämische Fibrinogenakkumulation in der Mikrozirkulation des Kremastermuskels von Wildtyptieren gegenüber tPA-defizienten Tieren jedoch nicht signifikant verändert. Dies deutet darauf hin, dass tPA die durch Ischämie und Reperfusion induzierte Extravasation von neutrophilen Granulozyten in das perivaskuläre Gewebe unabhängig von seinen fibrinolytischen Eigenschaften vermittelt.

In früheren Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass tPA selbst nicht chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt [148, 159]. Demzufolge muss tPA die Extravasation von neutrophilen Granulozyten über indirekte Effekte vermitteln. Wegen der räumlichen Nähe zu Mikrogefäßen und der Fähigkeit eine Vielzahl von Entzündungsfaktoren zu bilden (zum Beispiel Plättchen-aktivierender-Faktor (PAF), Leukotriene oder Prostaglandine), könnten perivaskuläre Mastzellen Zielzellen für extravasiertes tPA darstellen [206, 207]. Unsere Daten unterstützen diese Hypothese, da die postischämische Mastzellaktivierung in tPA-defizienten Versuchstieren signifikant reduziert war. Zusätzlich zeigen unsere Ergebnisse, dass extravaskulär verabreichtes tPA perivaskuläre Gewebemastzellen stark aktiviert. In diesem Zusammenhang konnten wir belegen, dass die proteolytischen Eigenschaften von tPA für die Aktivierung von Mastzellen *in vivo* nicht entscheidend sind. Diese Befunde bestätigen Ergebnisse aus *In-vitro*-Untersuchungen, welche darauf hindeuten, dass tPA kultivierte Mastzellen direkt aktivieren und somit deren Degranulation induzieren kann [158]. Untermauert werden diese Ergebnisse durch weitere Experimente, in denen wir zeigen konnten, dass die Inhibition der Mastzellaktivierung die tPA-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten nahezu vollständig aufhebt. Folglich scheint tPA indirekt über die Aktivierung von perivaskulären Gewebemastzellen zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten beizutragen.

Kürzlich wurde beschrieben und durch unsere Experimente bestätigt, dass tPA nicht nur über die proteolytischen Eigenschaften, sondern auch über nicht-proteolytische Eigenschaften verschiedene Effekte vermittelt. tPA ist eine Serinprotease, die neben der katalytischen Domäne aus vier weiteren Domänen besteht: eine „Finger“-Domäne, eine „epidermal growth factor (EGF)-ähnliche“ Domäne und zwei „Kringel“ Domänen. Über die spezifische Interaktion dieser Domänen mit anderen Molekülen (zum Beispiel *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP), Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, Fibrin, Plasminogen, PAI-1 oder Annexin II) werden diverse nicht-fibrinolytische Funktionen von tPA vermittelt [208]. In diesem Zusammenhang führt beispielsweise die Interaktion von tPA mit dem LRP über die proteolytischen Eigenschaften während einer zerebralen Ischämie zur

Modulierung der Proteinkinase-B-Aktivität in Astrozyten und Neuronen. Über diesen Mechanismus wird schließlich eine zerebrale Ödembildung induziert [209]. Wir konnten in unserem Modell ebenfalls zeigen, dass die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten teilweise über nicht-proteolytische Interaktionen von tPA erfolgt. In diesem Kontext beobachteten wir, dass die Interaktion der tPA Kringel-Domäne für diese Rekrutierung zumindest anteilig entscheidend ist. Des Weiteren erbrachten wir den Nachweis, dass die postischämische Expression von 5-Lipoxygenase und Lyso-PAF-Acetyltransferase in tPA-defizienten Tieren signifikant vermindert ist. 5-Lipoxygenase und Lyso-PAF-Acetyltransferase sind Enzyme, welche die Synthese potenter Neutrophilenlockstoffe (PAF und Leukotriene) katalysieren [210]. Umgekehrt induzierte die direkte intraskrotale Stimulation mit tPA eine stärkere Expression dieser Enzyme. In weiteren Experimenten zeigten wir, dass die Inhibition der PAF- und Leukotriensynthese, jedoch nicht die Inhibition der Prostaglandinsynthese, die tPA-abhängige Extravasation von neutrophilen Granulozyten reduzierte. Wir schlussfolgern aus diesen Ergebnissen, dass extravasiertes tPA die intravaskuläre Akkumulation und Transmigration von neutrophilen Granulozyten in postischämischem Gewebe über die Aktivierung von Mastzellen, die Induktion der Proteinsynthese und die Produktion von Lipidmediatoren verstärkt.

Zusätzlich zu seiner wohlbekanntem fibrinolytischen Funktion, kann tPA durch proteolytische Spaltung auch die zur Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) zählenden Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) aktivieren [211]. Gelatinasen besitzen die Fähigkeit Proteine zu spalten, die Endothelzellen verbinden (zum Beispiel Okkludin, Claudin-5 oder VE-Cadherin). Darüber hinaus können sie enzymatisch Komponenten der perivenulären Basalmembran (zum Beispiel Kollagen IV und Laminin) degradieren und degradiertes Kollagen (= Gelatin) weiter abbauen. Es wurde bereits gezeigt, dass Gelatinasen über diese Funktionen die Transmigration von Leukozyten regulieren können [117, 212]. Unsere Experimente deuten darauf hin, dass die tPA-abhängige Transmigration von neutrophilen Granulozyten durch die pharmakologische Blockade von Plasmin signifikant reduziert wurde. Die intravaskuläre Akkumulation adhärenter Leukozyten verblieb dagegen unbeeinflusst. Des Weiteren fanden

wir heraus, dass auch durch die Blockade von Gelatinasen selektiv die Plasmin-abhängige Transmigration von neutrophilen Granulozyten vermindert wurde. Diese Daten deuten darauf hin, dass tPA mittels proteolytischer Aktivierung von Plasminogen nachfolgend Gelatinasen aktiviert und dass diese Vorgänge an der Transmigration von Leukozyten in das postischämische Gewebe beteiligt sind.

8. Einfluss von uPA und tPA auf die postischämische mikro- vaskuläre Permeabilität

Neben der Rekrutierung von Leukozyten stellt die Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität ein weiteres Schlüsselereignis der Pathogenese des IRS dar. Beide Prozesse sind eng miteinander verknüpft. Während der Transmigration induzieren neutrophile Granulozyten die Öffnung endothelialer Kontaktstellen und initiieren darüber hinaus Umbauprozesse innerhalb der perivenulären Basalmembran [101, 117, 158, 190, 210]. Daraufhin erhöht sich schließlich die mikrovaskuläre Permeabilität und es bildet sich ein Gewebeödem, welches ein weiteres Kennzeichen des IRS darstellt. In Anbetracht unserer bisherigen Ergebnissen, welche einen deutlichen Einfluss von uPA und tPA auf die Leukozytenrekrutierung nach Ischämie und Reperfusion zeigen, stellten wir die Hypothese auf, dass diese Plasminogenaktivatoren auch in die Ausbildung der postischämischen Barrieredysfunktion involviert sind. Mittels *In-vivo*-Fluoreszenzmikroskopie untersuchten wir deshalb die mikrovaskuläre Permeabilität am postischämischen Kremastermuskel.

Es zeigte sich, dass der Austritt von FITC-Dextran nach Ischämie und Reperfusion in uPA-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant verringert ist. Interessanterweise fand sich jedoch ebenfalls eine signifikante Verringerung der Permeabilität in uPA-Rezeptor-defizienten Tieren. Im Gegensatz zur Extravasation von neutrophilen Granulozyten scheint die Interaktion von uPA mit dem uPAR essentiell für die Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität nach Ischämie und Reperfusion zu sein. Diese Ergebnisse unterstützen

Ergebnisse aus einer Studie, in der die Blockade der Interaktion von uPA mit dem uPA-Rezeptor zu einer signifikanten Reduktion der mikrovaskulären Permeabilität in der Retina diabetischer Mäuse führte [213]. In diesem Zusammenhang scheint die Interaktion von uPA mit dem endothelialen uPAR eine Retraktion der Endothelzellen zu induzieren und auf diesem Weg die postischämische mikrovaskuläre Permeabilitätserhöhung zu vermitteln [214].

Auch in tPA-defizienten Tieren zeigte sich eine signifikante Reduktion der mikrovaskulären Permeabilität im Vergleich zu Wildtyptieren. Diese Ergebnisse stützen vorhergegangene Befunde, welche zeigen, dass tPA in der Ausbildung eines Gewebeödems nach Ischämie und Reperfusion involviert ist [148, 215]. Darüber hinaus beobachteten wir, dass die direkte intraskrotale Stimulation mit tPA eine signifikante Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität zur Folge hat. Diese Permeabilitätssteigerung war in Tieren, welche von neutrophilen Granulozyten depletiert wurden, wiederum nahezu aufgehoben. Damit legen diese Daten nahe, dass die tPA-abhängige mikrovaskuläre Permeabilitätserhöhung nach Ischämie und Reperfusion durch neutrophile Granulozyten vermittelt wird. Dadurch werden vorhergegangene Beobachtungen erweitert, in welchen die therapeutische Applikation von rekombinantem tPA die Permeabilität der Blut-Hirnschranke in einem Schlaganfallmodell erhöhte [204]. Weiterhin zeigten wir, dass die Exposition mikrovaskulärer Endothelzellschichten mit tPA *in vitro* zu einer Erhöhung der makromolekularen Permeabilität dieser Endothelzellschichten führt. Dieser Anstieg der makromolekularen Permeabilität wurde interessanterweise durch die Blockade der proteolytischen Aktivität des Moleküls vollständig aufgehoben. Demgegenüber veränderte die Blockade des *low density lipoprotein receptor-related proteins* (LRP), eines endothelial exprimierten Rezeptors für tPA und andere Liganden, den tPA-induzierten Anstieg der makromolekularen Permeabilität nicht. Zusammengefasst scheint tPA auf extravasierenden neutrophilen Granulozyten den Zusammenbruch der mikrovaskulären Barriere während Ischämie und Reperfusion über die proteolytischen Eigenschaften und unabhängig von LRP zu vermitteln. Interessanterweise wurde von anderen Autoren jedoch beschrieben, dass LRP-abhängige Signalwege für die

tPA-induzierte Permeabilitätserhöhung der Blut-Hirn-Schranke wesentlich seien [182, 209, 212, 216]. Die mikrovaskuläre Permeabilität scheint demzufolge im zentralen Nervensystem, welches durch die Blut-Hirn-Schranke von den Mikrogefäßen getrennt ist, im Vergleich zu peripheren Geweben auf unterschiedliche Weise reguliert zu werden.

9. Auswirkungen einer Blockade von uPA auf die Leukozyteninfiltration und den Gewebeschaden der Leber nach Ischämie und Reperfusion

In klinischen Studien wird derzeit das kurative Potential von Serinproteaseinhibitoren in der Tumorthherapie geprüft [217, 218]. Der Einfluss dieser Wirkstoffe auf die Ausbildung eines durch Ischämie und Reperfusion induzierten Gewebeschadens wurde bisher jedoch nicht untersucht. Wir analysierten deshalb in weiteren Experimenten einen neuartigen, hoch spezifischen uPA-Inhibitor (WX-340) [219]. Es zeigte sich, dass die Behandlung von Versuchstieren mit WX-340 während der Ischämiephase die intravaskuläre, feste Adhärenz sowie die nachfolgende Transmigration von neutrophilen Granulozyten im postischämischen Gewebe vermindert. Darüber hinaus reduzierte es die durch Ischämie und Reperfusion induzierte mikrovaskuläre Permeabilität. Diese Befunde bestätigen einerseits unsere Ergebnisse aus Versuchen mit uPA-defizienten Tieren und zeigen andererseits einen neuen Ansatz für die Therapie eines IRS auf.

Um das therapeutische Potential des uPA Inhibitors in Bezug auf den IRS genauer zu evaluieren, verwendeten wir in einer weiteren Reihe von Versuchen ein zusätzliches Tiermodell. In diesem Modell wird ein IRS der Leber induziert. Als Maß für die Gewebeschädigung werden die Serumwerte der Transaminasen Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT) und Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT) gemessen. Im Vergleich zu scheinoperierten Kontrolltieren erhöhten sich die Serumwerte von AST und ALT nach I/R

dramatisch. Die Behandlung mit WX-340 führte dagegen zu einer signifikanten Senkung der Serumwerte dieser Transaminasen. Begleitet wurde diese Wirkung von einer signifikant verminderten Invasion von neutrophilen Granulozyten in die postischämische Leber. Insgesamt scheint die pharmakologische Blockade von uPA die Neutrophilenrekrutierung in der frühen Phase der Reperfusion zu reduzieren und auf diese Weise den Gewebeschaden der postischämischen Leber vermindern. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Beobachtungen, welche zeigen, dass der Schutz der postischämischen, zerebralen Mikrozirkulation durch moderate Hypothermie mit einer verminderten uPA-Aktivität im Gewebe einherging [161]. Beachtenswert ist zudem eine weitere Studie. In dieser wurde gezeigt, dass die Expression von uPA in reperfundierten Nieren herunterreguliert ist und eine uPA-Defizienz – im Gegensatz zu einer uPA-Rezeptor-Defizienz – die postischämische Proteinurie nicht signifikant verändert [147, 220]. Das betroffene Organ und damit die Art des Gewebes scheinen demnach die funktionelle Relevanz von uPA und des uPAR für die Pathogenese eines IRS zu bestimmen. Diese Befunde weisen somit auf eine gewebespezifische Regulierung hin. In Anbetracht der vielversprechenden Daten ist dennoch zu beachten, dass die pharmakologische Blockade der endogenen uPA-vermittelten Plasminogenaktivierung möglicherweise antifibrinolytische Nebenwirkungen verursachen könnte. Diese wiederum könnten sich negativ auf Entwicklung und Prognose eines Herzinfarktes oder Schlaganfalls auswirken. Da jedoch bekannt ist, dass die endogene Fibrinolyse hauptsächlich von endogenem tPA abhängig ist und sich in klinischen Studien keine Beweise für prothrombotische Nebenwirkungen von uPA-Inhibitoren fanden, könnte sich die Inhibition von endogen freigesetztem uPA tatsächlich als eine in der Klinik umsetzbare Strategie für die Prävention des IRS erweisen [221, 222].

10. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass sowohl endogenes uPA als auch endogenes tPA die feste Adhärenz und (nachfolgende) transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten vermittelt. Interessanterweise fanden wir jedoch differenziell geregelte Mechanismen für die induzierten Effekte. uPA rekrutiert neutrophile Granulozyten über den Rezeptor Mac-1, jedoch unabhängig vom uPA-Rezeptor. Dabei scheint endothelial präsentierte uPA die feste Adhärenz von neutrophilen Granulozyten über die nicht-proteolytischen Eigenschaften zu vermitteln, während leukozytäres uPA die nachfolgende parazelluläre Transmigration von neutrophilen Granulozyten in das reperfundierte Gewebe fördert. Parallel dazu wird durch die Interaktion von uPA mit dem uPA-Rezeptor die mikrovaskuläre Permeabilität erhöht. Die pharmakologische Blockade von uPA mit dem Inhibitor WX-340 interferierte mit dem Ablauf dieser inflammatorischen Prozesse und verminderte die Infiltration des postischämischen Gewebes mit neutrophilen Granulozyten, die mikrovaskuläre Permeabilitätserhöhung nach I/R sowie den Gewebeschaden in der reperfundierten Leber.

Demgegenüber zeigen unsere Ergebnisse bezüglich tPA, dass leukozytäres und nicht-leukozytäres endogenes tPA gemeinsam die Extravasation von neutrophilen Granulozyten in das reperfundierte Gewebe koordinieren. Dieser Effekt wird sowohl über proteolytische als auch nicht-proteolytische Eigenschaften von tPA vermittelt. Interessanterweise spielt die mikrovaskuläre Fibrinogendeposition in diesem Zusammenhang keine signifikante Rolle. In der initialen Phase der Reperfusion scheint tPA über die proteolytische Aktivierung von Plasmin(ogen) und Gelatinasen selektiv die Transmigration von neutrophilen Granulozyten zu vermitteln. Als Folge dieses Prozesses erhöht tPA, welches sich auf transmigrierenden neutrophilen Granulozyten befindet, die mikrovaskuläre Permeabilität und ermöglicht dabei zirkulierendem tPA in das perivaskuläre Gewebe zu extravasieren. Ausgetretenes, perivaskulär lokalisiertes tPA verstärkt daraufhin die postischämische Neutrophilen-

rekrutierung durch die Aktivierung von Mastzellen und die Induktion der Synthese von Lipidmediatoren.

Insgesamt können wir anhand unserer Ergebnisse die Relevanz der Plasminogenaktivatoren uPA und tPA für die Pathogenese des IRS belegen und weitere Einblicke in die zugrunde liegenden Mechanismen ermöglichen. Insbesondere verdeutlichen wir dabei die enge Verzahnung des fibrinolytischen mit dem inflammatorischen System. In diesem Kontext scheinen sich tPA und uPA sowie nachgeschaltete Signalmoleküle unabhängig von deren gerinnungsmodulierenden Funktionen als vielversprechende, therapeutische Zielstrukturen in der Prävention und Therapie eines IRS zu erweisen.

VI. Zusammenfassung

Der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) gilt noch immer als die häufigste Ursache für Organdysfunktion und -versagen im Kontext epidemiologisch hoch relevanter Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt, dem hämorrhagischen Schock oder apoplektischen Insulten [2]. Im klinischen Alltag werden bei thromboembolischen Ereignissen rekombinante Plasminogen-aktivatoren wie beispielsweise *tissue-type plasminogen activator* (tPA) oder *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) eingesetzt, um Fibringerinnsel aufzulösen und die Reperfusion des ischämischen Gewebes einzuleiten [12]. tPA und uPA besitzen jedoch über die fibrinolytische Funktion hinaus weitere wichtige Funktionen, die sie über nicht-fibrinolytische Eigenschaften vermitteln. In diesem Zusammenhang sind sie unter anderem wesentlich an der Ausbildung des IRS beteiligt [148, 149, 159-161]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch bislang noch unzureichend verstanden.

Anhand *in-vivo*-mikroskopischer Untersuchungen wurden am Kremastermuskel die Leukozytenrekutierung in perivaskuläres Gewebe und die mikrovaskuläre Permeabilität nach Ischämie und Reperfusion in uPA- und tPA-defizienten Mäusen sowie Wildtypen untersucht. Durch intraskrotale Injektion entsprechender rekombinanter Proteine wurden die direkten Effekte von uPA und tPA auf die Leukozytenrekutierung in perivaskuläres Gewebe und die mikrovaskuläre Permeabilität analysiert. Eine Zelltransfermethode wurde angewandt um den Einfluss von leukozytären uPA/tPA von dem von nicht-leukozytärem uPA/tPA auf die postischämische Leukozytenrekutierung abzugrenzen. Die Expression von uPA und tPA im postischämischen Kremastermuskel wurde mittels Konfokalmikroskopie und Durchflusszytometrie analysiert. Um zugrunde liegende Mechanismen und Signalwege weiter aufzuschlüsseln, wurden zusätzliche Methoden wie qRT-PCR, immunhistochemische Färbungen oder eine Permeabilitätsanalyse von Endothellzellschichten eingesetzt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass uPA und tPA entscheidend in der durch Ischämie und Reperfusion induzierten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie der Erhöhung

der mikrovaskulären Permeabilität im postischämischen Gewebe involviert sind. Wir konnten darüber hinaus belegen, dass während Ischämie und Reperfusion über 90 % der Leukozyten an Endothelzellkontakten adhären und wahrscheinlich überwiegend den parazellulären Transmigrationsweg wählen.

In diesem Zusammenhang scheint endothelial präsentiertes uPA die feste Adhärenz von neutrophilen Granulozyten über nicht-proteolytische Eigenschaften zu vermitteln, während leukozytäres uPA über proteolytische Interaktionen die nachfolgende parazelluläre Transmigration von neutrophilen Granulozyten in das reperfundierte Gewebe fördert. Interessanterweise ist die postischämische Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten unabhängig vom uPA-Rezeptor, jedoch abhängig von Mac-1, einem weiteren Rezeptor von uPA [193]. Dagegen vermittelt uPA die Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität über die Interaktion mit dem uPA-Rezeptor. tPA beeinflusst den Rekrutierungsprozess von neutrophilen Granulozyten in postischämischem Gewebe im Gegensatz zu uPA sowohl über seine proteolytischen wie auch über seine nicht-proteolytischen Eigenschaften. In der initialen Phase des Ischämie-Reperfusionprozesses scheint auf neutrophilen Granulozyten lokalisiertes tPA mittels proteolytischer Aktivierung von Plasminogen nachfolgend Gelatinasen aktivieren, die selektiv die Transmigration vermitteln. Während der Entzündungsreaktion tritt tPA aufgrund der erhöhten mikrovaskulären Permeabilität aus Mikrogefäßen ins perivaskulären Gewebe aus und wird dort zusätzlich von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Bindegewebszellen sezerniert [184, 185, 190, 223]. Dieses paravaskulär lokalisierte tPA verstärkt eine postischämische Neutrophilenrekrutierung auf der Ebene der leukozytären Adhärenz durch die nicht-proteolytische Aktivierung von Mastzellen sowie die Induktion der Synthese von Lipidmediatoren. Weiterhin verstärkt tPA die mikrovaskuläre Permeabilität über proteolytische Eigenschaften und unabhängig von seinem Rezeptor *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP). Zur Analyse der klinischen Relevanz dieser Befunde untersuchten wir die Bedeutung von uPA für den Gewebeschaden in einem Ischämie-Reperfusionsschadensmodell der Leber. Die pharmakologische Blockade von uPA durch einen hochspezifischen Inhibitor (WX-340)

verminderte die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten sowie den Gewebeschaden in der Leber.

Unsere Ergebnisse gewähren somit neue Einblicke in die Pathogenese des IRS und weisen dabei auf die enge Verzahnung des fibrinolytischen Systems mit dem inflammatorischen System hin. Diese Befunde könnten die Grundlage für die Entwicklung vielversprechender, therapeutischer Strategien in der Prävention und Therapie des IRS bilden.

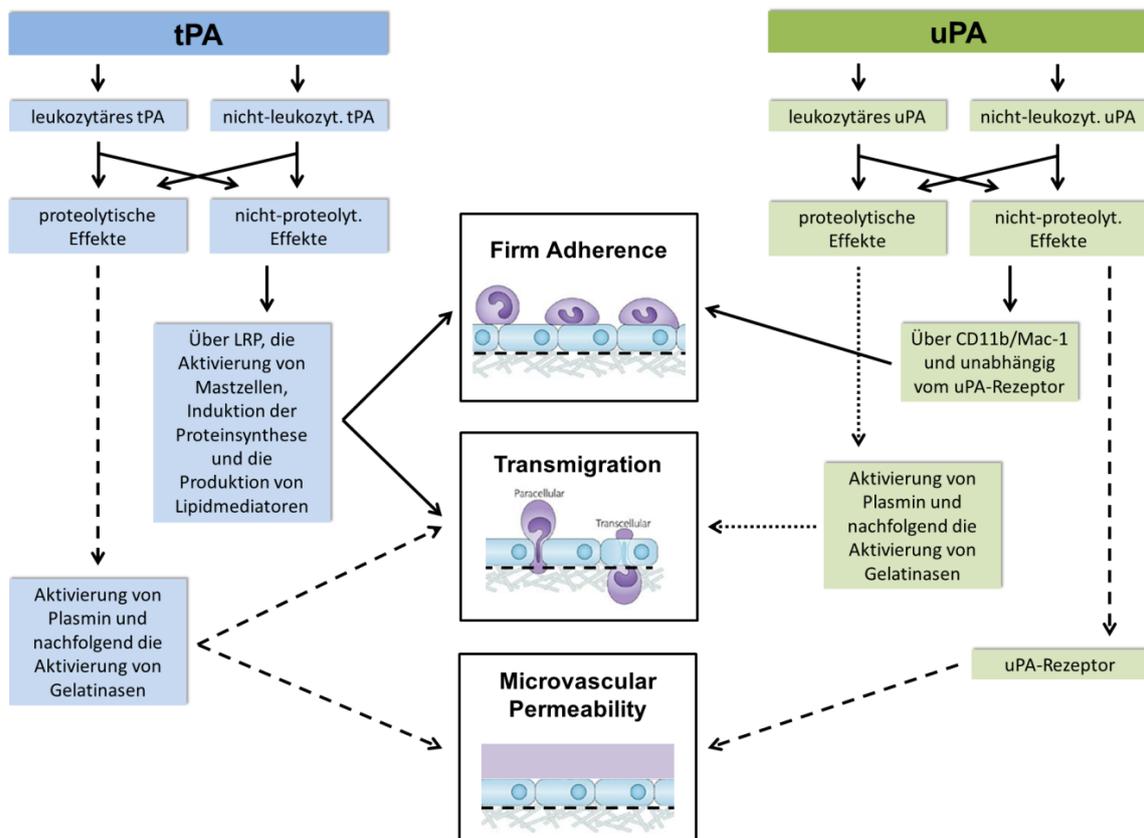


Abb. VI/1: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse. Überblick der Effekte von tPA und uPA auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten sowie die mikrovaskuläre Permeabilität [in Anlehnung an [21]].

VII. Literaturverzeichnis

1. Medzhitov, R., *Inflammation 2010: new adventures of an old flame*. Cell, 2010. **140**(6): p. 771-6.
2. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1391-401.
3. Quindry, J.C. and K.L. Hamilton, *Exercise and cardiac preconditioning against ischemia reperfusion injury*. Curr Cardiol Rev, 2013. **9**(3): p. 220-9.
4. Lenaerts, K., et al., *New insights in intestinal ischemia-reperfusion injury: implications for intestinal transplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2013. **18**(3): p. 298-303.
5. Liu, T., et al., *Adjudin protects against cerebral ischemia reperfusion injury by inhibition of neuroinflammation and blood-brain barrier disruption*. J Neuroinflammation, 2014. **11**: p. 107.
6. Akhtar, M.Z., et al., *Novel approaches to preventing ischemia-reperfusion injury during liver transplantation*. Transplant Proc, 2013. **45**(6): p. 2083-92.
7. Kalogeris, T., et al., *Cell biology of ischemia/reperfusion injury*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **298**: p. 229-317.
8. Li, L. and M.D. Okusa, *Macrophages, dendritic cells, and kidney ischemia-reperfusion injury*. Semin Nephrol, 2010. **30**(3): p. 268-77.
9. Loor, G. and P.T. Schumacker, *Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion*. Cell Death Differ, 2008. **15**(4): p. 686-90.
10. Metz, M. and M. Maurer, *Mast cells--key effector cells in immune responses*. Trends Immunol, 2007. **28**(5): p. 234-41.
11. Kumar, P., et al., *Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation*. Expert Rev Mol Med, 2009. **11**: p. e19.
12. Ueshima, S. and O. Matsuo, *Development of new fibrinolytic agents*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(7): p. 849-57.

13. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
14. Gute, D.C., et al., *Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle*. Mol Cell Biochem, 1998. **179**(1-2): p. 169-87.
15. Baines, C.P., *The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury*. Basic Res Cardiol, 2009. **104**(2): p. 181-8.
16. Friedewald, J.J. and H. Rabb, *Inflammatory cells in ischemic acute renal failure*. Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 486-91.
17. Kvietys, P.R. and D.N. Granger, *Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(3): p. 556-92.
18. Carden, D.L. and D.N. Granger, *Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury*. J Pathol, 2000. **190**(3): p. 255-66.
19. Khandoga, A., et al., *Junctional adhesion molecule-A deficiency increases hepatic ischemia-reperfusion injury despite reduction of neutrophil transendothelial migration*. Blood, 2005. **106**(2): p. 725-33.
20. Gasser, O. and J.A. Schifferli, *Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2543-8.
21. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
22. Nourshargh, S., P.L. Hordijk, and M. Sixt, *Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 366-78.
23. Phillipson, M. and P. Kubes, *The neutrophil in vascular inflammation*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1381-90.
24. Reichel, C.A., S.M. Kanse, and F. Krombach, *At the interface of fibrinolysis and inflammation: the role of urokinase-type plasminogen activator in the leukocyte extravasation cascade*. Trends Cardiovasc Med, 2012. **22**(7): p. 192-6.

25. Vestweber, D., *Novel insights into leukocyte extravasation*. *Curr Opin Hematol*, 2012. **19**(3): p. 212-7.
26. Massberg, S. and K. Messmer, *The nature of ischemia/reperfusion injury*. *Transplant Proc*, 1998. **30**(8): p. 4217-23.
27. Weber, C., L. Fraemohs, and E. Dejana, *The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(6): p. 467-77.
28. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(1): p. 37-49.
29. Ioannou, A., J. Dalle Lucca, and G.C. Tsokos, *Immunopathogenesis of ischemia/reperfusion-associated tissue damage*. *Clin Immunol*, 2011. **141**(1): p. 3-14.
30. Paller, M.S., *Effect of neutrophil depletion on ischemic renal injury in the rat*. *J Lab Clin Med*, 1989. **113**(3): p. 379-86.
31. Thornton, M.A., et al., *An evaluation of the neutrophil as a mediator of in vivo renal ischemic-reperfusion injury*. *Am J Pathol*, 1989. **135**(3): p. 509-15.
32. Rabb, H., et al., *Role of CD11a and CD11b in ischemic acute renal failure in rats*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(6 Pt 2): p. F1052-8.
33. Kelly, K.J., et al., *Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(4): p. 1056-63.
34. Li, L., et al., *IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(1): p. 331-42.
35. Rothenberg, M.E. and S.P. Hogan, *The eosinophil*. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 147-74.
36. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. *Science*, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
37. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(5): p. 503-10.
38. Orr, M.T. and L.L. Lanier, *Natural killer cell education and tolerance*. *Cell*, 2010. **142**(6): p. 847-56.

39. Zhang, Z.X., et al., *NK cells induce apoptosis in tubular epithelial cells and contribute to renal ischemia-reperfusion injury*. J Immunol, 2008. **181**(11): p. 7489-98.
40. Kuboki, S., et al., *Distinct contributions of CD4+ T cell subsets in hepatic ischemia/reperfusion injury*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(5): p. G1054-9.
41. Li, L., et al., *NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5899-911.
42. Swirski, F.K., et al., *Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites*. Science, 2009. **325**(5940): p. 612-6.
43. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
44. Yang, J., et al., *Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases*. Biomark Res, 2014. **2**(1): p. 1.
45. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
46. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
47. Jonuleit, H., et al., *Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1213-22.
48. Dhodapkar, M.V., et al., *Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. 233-8.
49. Verhasselt, V., et al., *Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 762-72.
50. Palucka, K. and J. Banchereau, *Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity*. J Clin Immunol, 1999. **19**(1): p. 12-25.
51. Wu, C.J., et al., *Modulation of monocyte-derived dendritic cell differentiation is associated with ischemic acute renal failure*. J Surg Res, 2006. **132**(1): p. 104-11.

52. Zhou, T., et al., *Role of adhesion molecules and dendritic cells in rat hepatic/renal ischemia-reperfusion injury and anti-adhesive intervention with anti-P-selectin lectin-EGF domain monoclonal antibody*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(7): p. 1005-10.
53. Lee, S., et al., *Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(2): p. 317-26.
54. Tsokos, G.C., *B cells, be gone--B-cell depletion in the treatment of rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2004. **350**(25): p. 2546-8.
55. Burne-Taney, M.J., et al., *B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3210-5.
56. Chen, J., et al., *B cells contribute to ischemia/reperfusion-mediated tissue injury*. J Autoimmun, 2009. **32**(3-4): p. 195-200.
57. Renner, B., et al., *B cell subsets contribute to renal injury and renal protection after ischemia/reperfusion*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 4393-400.
58. Appay, V., et al., *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues*. Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 975-83.
59. Peterson, R.A., *Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression*. Toxicol Pathol, 2012. **40**(2): p. 186-204.
60. Andersen, M.H., et al., *Cytotoxic T cells*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 32-41.
61. Jiang, H. and L. Chess, *Regulation of immune responses by T cells*. N Engl J Med, 2006. **354**(11): p. 1166-76.
62. Goodman, T. and L. Lefrancois, *Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes*. Nature, 1988. **333**(6176): p. 855-8.
63. Burne, M.J., et al., *Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure*. J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1283-90.
64. Gandolfo, M.T., et al., *Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury*. Kidney Int, 2009. **76**(7): p. 717-29.
65. Huang, Y., H. Rabb, and K.L. Womer, *Ischemia-reperfusion and immediate T cell responses*. Cell Immunol, 2007. **248**(1): p. 4-11.

66. Rabb, H., et al., *Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **279**(3): p. F525-31.
67. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
68. Eriksson, E.E., et al., *Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo*. J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 205-18.
69. Sperandio, M., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules*. J Exp Med, 2003. **197**(10): p. 1355-63.
70. da Costa Martins, P., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(5): p. 1023-9.
71. Hidalgo, A., et al., *Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44*. Immunity, 2007. **26**(4): p. 477-89.
72. McEver, R.P. and R.D. Cummings, *Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S97-103.
73. Alon, R., D.A. Hammer, and T.A. Springer, *Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow*. Nature, 1995. **374**(6522): p. 539-42.
74. Berlin, C., et al., *alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow*. Cell, 1995. **80**(3): p. 413-22.
75. Chan, J.R., S.J. Hyduk, and M.I. Cybulsky, *Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration*. J Exp Med, 2001. **193**(10): p. 1149-58.
76. Huo, Y., A. Hafezi-Moghadam, and K. Ley, *Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions*. Circ Res, 2000. **87**(2): p. 153-9.

77. Singbartl, K., et al., *A CD2-green fluorescence protein-transgenic mouse reveals very late antigen-4-dependent CD8+ lymphocyte rolling in inflamed venules*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7520-6.
78. Salas, A., et al., *Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction*. Immunity, 2004. **20**(4): p. 393-406.
79. Dunne, J.L., et al., *Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1*. Blood, 2002. **99**(1): p. 336-41.
80. Campbell, J.J., et al., *Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells*. J Cell Biol, 1996. **134**(1): p. 255-66.
81. Campbell, J.J., et al., *Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions*. Science, 1998. **279**(5349): p. 381-4.
82. Laudanna, C., et al., *Rapid leukocyte integrin activation by chemokines*. Immunol Rev, 2002. **186**: p. 37-46.
83. D'Ambrosio, D., et al., *Quantitative differences in chemokine receptor engagement generate diversity in integrin-dependent lymphocyte adhesion*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2303-12.
84. Kinashi, T., *Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(7): p. 546-59.
85. Giagulli, C., et al., *The Src family kinases Hck and Fgr are dispensable for inside-out, chemoattractant-induced signaling regulating beta 2 integrin affinity and valency in neutrophils, but are required for beta 2 integrin-mediated outside-in signaling involved in sustained adhesion*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 604-11.
86. Kim, M., C.V. Carman, and T.A. Springer, *Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins*. Science, 2003. **301**(5640): p. 1720-5.
87. Chigaev, A., et al., *Alpha4beta1 integrin affinity changes govern cell adhesion*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38174-82.

88. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2569-75.
89. Schenkel, A.R., Z. Mamdouh, and W.A. Muller, *Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation*. Nat Immunol, 2004. **5**(4): p. 393-400.
90. Cinamon, G., et al., *Chemoattractant signals and beta 2 integrin occupancy at apical endothelial contacts combine with shear stress signals to promote transendothelial neutrophil migration*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7282-91.
91. Barreiro, O., et al., *Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes*. J Cell Biol, 2002. **157**(7): p. 1233-45.
92. Millan, J. and A.J. Ridley, *Rho GTPases and leucocyte-induced endothelial remodelling*. Biochem J, 2005. **385**(Pt 2): p. 329-37.
93. Shaw, S.K., et al., *Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2323-30.
94. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 327-34.
95. Vestweber, D., *Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 587-93.
96. Carman, C.V. and T.A. Springer, *A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them*. J Cell Biol, 2004. **167**(2): p. 377-88.
97. Feng, D., et al., *Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 903-15.
98. Engelhardt, B. and H. Wolburg, *Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?* Eur J Immunol, 2004. **34**(11): p. 2955-63.

99. Hallmann, R., et al., *Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(3): p. 979-1000.
100. Wang, S., et al., *Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils*. *J Exp Med*, 2006. **203**(6): p. 1519-32.
101. Reichel, C.A., et al., *Plasmin inhibitors prevent leukocyte accumulation and remodeling events in the postischemic microvasculature*. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e17229.
102. Miyasaka, M. and T. Tanaka, *Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(5): p. 360-70.
103. Nourshargh, S. and F.M. Marelli-Berg, *Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(3): p. 157-65.
104. Lerchenberger, M., et al., *Matrix metalloproteinases modulate ameboid-like migration of neutrophils through inflamed interstitial tissue*. *Blood*, 2013. **122**(5): p. 770-80.
105. De Bruyn, P.P., *The amoeboid movement of the mammalian leukocyte in tissue culture*. *Anat Rec*, 1946. **95**: p. 177-91.
106. Das, R., E. Pluskota, and E.F. Plow, *Plasminogen and its receptors as regulators of cardiovascular inflammatory responses*. *Trends Cardiovasc Med*, 2010. **20**(4): p. 120-4.
107. Smith, H.W. and C.J. Marshall, *Regulation of cell signalling by uPAR*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(1): p. 23-36.
108. Gomez, I.G., et al., *Metalloproteinase-mediated Shedding of Integrin beta2 promotes macrophage efflux from inflammatory sites*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(7): p. 4581-9.
109. Walcheck, B., et al., *Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro*. *Nature*, 1996. **380**(6576): p. 720-3.

110. Fernandez-Patron, C., et al., *Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1*[1-32]. *FASEB J*, 2001. **15**(12): p. 2230-40.
111. Sorokin, L., *The impact of the extracellular matrix on inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(10): p. 712-23.
112. Cauwe, B., P.E. Van den Steen, and G. Opdenakker, *The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2007. **42**(3): p. 113-85.
113. Korpos, E., C. Wu, and L. Sorokin, *Multiple roles of the extracellular matrix in inflammation*. *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(12): p. 1349-57.
114. Boyle, M.D., et al., *Urokinase: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo*. *J Immunol*, 1987. **139**(1): p. 169-74.
115. Keck, T., et al., *Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat*. *Gastroenterology*, 2002. **122**(1): p. 188-201.
116. Young, R.E., et al., *Neutrophil elastase (NE)-deficient mice demonstrate a nonredundant role for NE in neutrophil migration, generation of proinflammatory mediators, and phagocytosis in response to zymosan particles in vivo*. *J Immunol*, 2004. **172**(7): p. 4493-502.
117. Reichel, C.A., et al., *Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling*. *J Leukoc Biol*, 2008. **83**(4): p. 864-74.
118. Gidday, J.M., et al., *Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **289**(2): p. H558-68.
119. Cesarman-Maus, G. and K.A. Hajjar, *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. *Br J Haematol*, 2005. **129**(3): p. 307-21.

120. Raum, D., et al., *Synthesis of human plasminogen by the liver*. Science, 1980. **208**(4447): p. 1036-7.
121. Levin, E.G. and G.J. del Zoppo, *Localization of tissue plasminogen activator in the endothelium of a limited number of vessels*. Am J Pathol, 1994. **144**(5): p. 855-61.
122. Romisch, J., et al., *The FVII activating protease cleaves single-chain plasminogen activators*. Haemostasis, 1999. **29**(5): p. 292-9.
123. Ichinose, A., K. Fujikawa, and T. Suyama, *The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin*. J Biol Chem, 1986. **261**(8): p. 3486-9.
124. Kobayashi, H., et al., *Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-uPA)*. J Biol Chem, 1991. **266**(8): p. 5147-52.
125. Goretzki, L., et al., *Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L*. FEBS Lett, 1992. **297**(1-2): p. 112-8.
126. Keijzer, J., et al., *The interaction of plasminogen activator inhibitor 1 with plasminogen activators (tissue-type and urokinase-type) and fibrin: localization of interaction sites and physiologic relevance*. Blood, 1991. **78**(2): p. 401-9.
127. Samad, F., K. Yamamoto, and D.J. Loskutoff, *Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide*. J Clin Invest, 1996. **97**(1): p. 37-46.
128. Handt, S., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 secretion of endothelial cells increases fibrinolytic resistance of an in vitro fibrin clot: evidence for a key role of endothelial cells in thrombolytic resistance*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4204-13.
129. Kruithof, E.K., C. Tran-Thang, and F. Bachmann, *Studies on the release of a plasminogen activator inhibitor by human platelets*. Thromb Haemost, 1986. **55**(2): p. 201-5.

130. Declerck, P.J., et al., *Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin)*. J Biol Chem, 1988. **263**(30): p. 15454-61.
131. Mottonen, J., et al., *Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1*. Nature, 1992. **355**(6357): p. 270-3.
132. Preissner, K.T., *Specific binding of plasminogen to vitronectin. Evidence for a modulatory role of vitronectin on fibrin(ogen)-induced plasmin formation by tissue plasminogen activator*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **168**(3): p. 966-71.
133. Holmes, W.E., et al., *Primary structure of human alpha 2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin)*. J Biol Chem, 1987. **262**(4): p. 1659-64.
134. Aoki, N., M. Moroi, and K. Tachiya, *Effects of alpha2-plasmin inhibitor on fibrin clot lysis. Its comparison with alpha2-macroglobulin*. Thromb Haemost, 1978. **39**(1): p. 22-31.
135. Nesheim, M., *Thrombin and fibrinolysis*. Chest, 2003. **124**(3 Suppl): p. 33S-9S.
136. Huang, Y. and N. Noble, *An unexpected role of plasminogen activator inhibitor-type 1 (PAI-1) in renal fibrosis*. Kidney Int, 2005. **67**(6): p. 2502-3.
137. Medcalf, R.L., *Fibrinolysis, inflammation, and regulation of the plasminogen activating system*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 132-42.
138. Barthel, D., S. Schindler, and P.F. Zipfel, *Plasminogen is a complement inhibitor*. J Biol Chem, 2012. **287**(22): p. 18831-42.
139. Campbell, W., N. Okada, and H. Okada, *Carboxypeptidase R is an inactivator of complement-derived inflammatory peptides and an inhibitor of fibrinolysis*. Immunol Rev, 2001. **180**: p. 162-7.
140. Myles, T., et al., *Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51059-67.
141. Robson, S.C., R. Saunders, and R.E. Kirsch, *Monocyte-macrophage release of IL-1 is inhibited by type-1 plasminogen activator inhibitors*. J Clin Lab Immunol, 1990. **33**(2): p. 83-90.

142. Massignon, D., et al., *Coagulation/fibrinolysis balance in septic shock related to cytokines and clinical state*. Haemostasis, 1994. **24**(1): p. 36-48.
143. Szaba, F.M. and S.T. Smiley, *Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo*. Blood, 2002. **99**(3): p. 1053-9.
144. de Almeida, V.V., et al., *Fibrinogen modulates leukocyte recruitment in vivo during the acute inflammatory response*. Clin Hemorheol Microcirc, 2012.
145. Buerke, M., et al., *Effects of aprotinin on gene expression and protein synthesis after ischemia and reperfusion in rats*. Circulation, 2007. **116**(11 Suppl): p. I121-6.
146. Edagawa, M., et al., *Reduction of post-ischemic lung reperfusion injury by fibrinolytic activity suppression*. Transplantation, 1999. **67**(7): p. 944-9.
147. Gueler, F., et al., *Renal urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor but not uPA deficiency strongly attenuates ischemia reperfusion injury and acute kidney allograft rejection*. J Immunol, 2008. **181**(2): p. 1179-89.
148. Zhao, Y., et al., *Depletion of tissue plasminogen activator attenuates lung ischemia-reperfusion injury via inhibition of neutrophil extravasation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **300**(5): p. L718-29.
149. Roelofs, J.J., et al., *Tissue-type plasminogen activator modulates inflammatory responses and renal function in ischemia reperfusion injury*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(1): p. 131-40.
150. Lau, C.L., et al., *Enhanced fibrinolysis protects against lung ischemia-reperfusion injury*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **137**(5): p. 1241-8.
151. Watanabe, R., et al., *Effects of pharmacological suppression of plasminogen activator inhibitor-1 in myocardial remodeling after ischemia reperfusion injury*. Int Heart J, 2011. **52**(6): p. 388-92.
152. Conway, R.S., et al., *Microvascular reactivity of the myopathic Syrian hamster cremaster muscle*. Cardiovasc Res, 1987. **21**(11): p. 796-803.

153. Khandoga, A., et al., *Leukocyte transmigration in inflamed liver: A role for endothelial cell-selective adhesion molecule*. J Hepatol, 2009. **50**(4): p. 755-65.
154. Woodfin, A., et al., *JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration*. Blood, 2007. **110**(6): p. 1848-56.
155. Mempel, T.R., et al., *Visualization of leukocyte transendothelial and interstitial migration using reflected light oblique transillumination in intravital video microscopy*. J Vasc Res, 2003. **40**(5): p. 435-41.
156. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
157. Khandoga, A., et al., *Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil and T cell recruitment and migration in the postischemic liver*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(6): p. 1295-305.
158. Strbian, D., et al., *Mast cell stabilization reduces hemorrhage formation and mortality after administration of thrombolytics in experimental ischemic stroke*. Circulation, 2007. **116**(4): p. 411-8.
159. Ito, T., et al., *Elevation of mRNA levels of tissue-type plasminogen activator and urokinase-type plasminogen activator in hippocampus and cerebral cortex following middle cerebral artery occlusion in rats*. Neurol Res, 2000. **22**(4): p. 413-9.
160. Wang, Y.F., et al., *Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice*. Nat Med, 1998. **4**(2): p. 228-31.
161. Burk, J., et al., *Protection of cerebral microvasculature after moderate hypothermia following experimental focal cerebral ischemia in mice*. Brain Res, 2008. **1226**: p. 248-55.
162. Gyetko, M.R., et al., *Urokinase is required for the pulmonary inflammatory response to Cryptococcus neoformans. A murine transgenic model*. J Clin Invest, 1996. **97**(8): p. 1818-26.

163. Abraham, E., et al., *Urokinase-type plasminogen activator potentiates lipopolysaccharide-induced neutrophil activation*. J Immunol, 2003. **170**(11): p. 5644-51.
164. Stoppelli, M.P., et al., *Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(15): p. 4939-43.
165. May, A.E., et al., *Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta 2 integrins in vivo*. J Exp Med, 1998. **188**(6): p. 1029-37.
166. Rijneveld, A.W., et al., *Urokinase receptor is necessary for adequate host defense against pneumococcal pneumonia*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3507-11.
167. Deindl, E., et al., *Receptor-independent role of the urokinase-type plasminogen activator during arteriogenesis*. FASEB J, 2003. **17**(9): p. 1174-6.
168. Van Lint, P. and C. Libert, *Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(6): p. 1375-81.
169. Declerck, P.J., M. Verstreken, and D. Collen, *Immunoassay of murine t-PA, u-PA and PAI-1 using monoclonal antibodies raised in gene-inactivated mice*. Thromb Haemost, 1995. **74**(5): p. 1305-9.
170. Ho, C.H., C.C. Yuan, and S.M. Liu, *Diagnostic and prognostic values of plasma levels of fibrinolytic markers in ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 1999. **75**(3): p. 397-400.
171. Sheehan, J.J. and S.E. Tsirka, *Fibrin-modifying serine proteases thrombin, tPA, and plasmin in ischemic stroke: a review*. Glia, 2005. **50**(4): p. 340-50.
172. White, W.F., G.H. Barlow, and M.M. Mozen, *The isolation and characterization of plasminogen activators (urokinase) from human urine*. Biochemistry, 1966. **5**(7): p. 2160-9.
173. Barlow, G.H., A. Rueter, and I. Tribby, *Biosynthesis of plasminogen activator by tissue culture technique*. Vasc Surg, 1977. **11**(6): p. 406-12.

174. Wun, T.C., W.D. Schleuning, and E. Reich, *Isolation and characterization of urokinase from human plasma*. J Biol Chem, 1982. **257**(6): p. 3276-83.
175. Liu, G., M.A. Shuman, and R.L. Cohen, *Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells*. Int J Cancer, 1995. **60**(4): p. 501-6.
176. Bykowska, K., et al., *Characterization of a plasminogen activator secreted by cultured bovine aortic endothelial cells*. Biochim Biophys Acta, 1982. **703**(1): p. 113-5.
177. Booyse, F.M., et al., *Isolation and characterization of a urokinase-type plasminogen activator (Mr = 54,000) from cultured human endothelial cells indistinguishable from urinary urokinase*. J Biol Chem, 1984. **259**(11): p. 7198-205.
178. Levin, E.G., *Latent tissue plasminogen activator produced by human endothelial cells in culture: evidence for an enzyme-inhibitor complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(22): p. 6804-8.
179. Kristensen, P., et al., *Human endothelial cells contain one type of plasminogen activator*. FEBS Lett, 1984. **168**(1): p. 33-7.
180. Rosenberg, G.A., et al., *Injury-induced 92-kilodalton gelatinase and urokinase expression in rat brain*. Lab Invest, 1994. **71**(3): p. 417-22.
181. Yepes, M., et al., *Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic*. Trends Neurosci, 2009. **32**(1): p. 48-55.
182. Yepes, M., et al., *Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein*. J Clin Invest, 2003. **112**(10): p. 1533-40.
183. van Hinsbergh, V.W., *Regulation of the synthesis and secretion of plasminogen activators by endothelial cells*. Haemostasis, 1988. **18**(4-6): p. 307-27.
184. Heiple, J.M. and L. Ossowski, *Human neutrophil plasminogen activator is localized in specific granules and is translocated to the cell surface by exocytosis*. J Exp Med, 1986. **164**(3): p. 826-40.

185. Chandler, W.L., W.C. Levy, and J.R. Stratton, *The circulatory regulation of TPA and UPA secretion, clearance, and inhibition during exercise and during the infusion of isoproterenol and phenylephrine*. *Circulation*, 1995. **92**(10): p. 2984-94.
186. Takahashi, K., et al., *Increased secretion of urokinase-type plasminogen activator by human lung microvascular endothelial cells*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(1 Pt 1): p. L47-54.
187. Herndon, M.E., C.S. Stipp, and A.D. Lander, *Interactions of neural glycosaminoglycans and proteoglycans with protein ligands: assessment of selectivity, heterogeneity and the participation of core proteins in binding*. *Glycobiology*, 1999. **9**(2): p. 143-55.
188. Pedersen, T.L., et al., *Subcellular distribution of urokinase and urokinase receptor in human neutrophils determined by immunoelectron microscopy*. *Ultrastruct Pathol*, 2000. **24**(3): p. 175-82.
189. Nourshargh, S., F. Krombach, and E. Dejana, *The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues*. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(4): p. 714-8.
190. DiStasi, M.R. and K. Ley, *Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability*. *Trends Immunol*, 2009. **30**(11): p. 547-56.
191. Jin, T., et al., *Urokinase, a constitutive component of the inflamed synovial fluid, induces arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2003. **5**(1): p. R9-R17.
192. Cubellis, M.V., et al., *Accessibility of receptor-bound urokinase to type-1 plasminogen activator inhibitor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(13): p. 4828-32.
193. Pluskota, E., D.A. Soloviev, and E.F. Plow, *Convergence of the adhesive and fibrinolytic systems: recognition of urokinase by integrin alpha Mbeta 2 as well as by the urokinase receptor regulates cell adhesion and migration*. *Blood*, 2003. **101**(4): p. 1582-90.
194. Wei, Y., et al., *Regulation of integrin function by the urokinase receptor*. *Science*, 1996. **273**(5281): p. 1551-5.

195. Simon, D.I., et al., *Identification of a urokinase receptor-integrin interaction site. Promiscuous regulator of integrin function.* J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10228-34.
196. Lefort, C.T., et al., *Outside-in signal transmission by conformational changes in integrin Mac-1.* J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6460-8.
197. Brooks, A.M., et al., *Urokinase-type plasminogen activator modulates airway eosinophil adhesion in asthma.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **35**(4): p. 503-11.
198. Olson, S.T., et al., *Resolution of Michaelis complex, acylation, and conformational change steps in the reactions of the serpin, plasminogen activator inhibitor-1, with tissue plasminogen activator and trypsin.* Biochemistry, 2001. **40**(39): p. 11742-56.
199. Werner, F., T.M. Razzaq, and V. Ellis, *Tissue plasminogen activator binds to human vascular smooth muscle cells by a novel mechanism. Evidence for a reciprocal linkage between inhibition of catalytic activity and cellular binding.* J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21555-61.
200. Higgins, D.L., et al., *The effect of the one-chain to two-chain conversion in tissue plasminogen activator: characterization of mutations at position 275.* Thromb Res, 1990. **57**(4): p. 527-39.
201. Tate, K.M., et al., *Functional role of proteolytic cleavage at arginine-275 of human tissue plasminogen activator as assessed by site-directed mutagenesis.* Biochemistry, 1987. **26**(2): p. 338-43.
202. Lijnen, H.R., et al., *Plasminogen activation with single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA). Studies with active site mutagenized plasminogen (Ser740----Ala) and plasmin-resistant scu-PA (Lys158----Glu).* J Biol Chem, 1990. **265**(9): p. 5232-6.
203. Khandoga, A., et al., *Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo.* Transplantation, 2002. **74**(5): p. 681-8.

204. Massberg, S., et al., *Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo*. *Blood*, 1999. **94**(11): p. 3829-38.
205. Salter, J.W., et al., *Platelets modulate ischemia/reperfusion-induced leukocyte recruitment in the mesenteric circulation*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **281**(6): p. G1432-9.
206. Boyce, J.A., *Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation*. *Immunol Rev*, 2007. **217**: p. 168-85.
207. Triggiani, M., et al., *Allergy and the cardiovascular system*. *Clin Exp Immunol*, 2008. **153 Suppl 1**: p. 7-11.
208. Vivien, D., et al., *Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011. **31**(11): p. 2119-34.
209. An, J., et al., *Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein induce Akt phosphorylation in the ischemic brain*. *Blood*, 2008. **112**(7): p. 2787-94.
210. Reichel, C.A., et al., *Ccl2 and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid mediators*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(11): p. 1787-93.
211. Syrovets, T., O. Lunov, and T. Simmet, *Plasmin as a proinflammatory cell activator*. *J Leukoc Biol*, 2012. **92**(3): p. 509-19.
212. Jin, R., G. Yang, and G. Li, *Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator*. *Neurobiol Dis*, 2010. **38**(3): p. 376-85.
213. Navaratna, D., et al., *A peptide inhibitor of the urokinase/urokinase receptor system inhibits alteration of the blood-retinal barrier in diabetes*. *FASEB J*, 2008. **22**(9): p. 3310-7.

214. Conforti, G., et al., *Cell-surface plasminogen activation causes a retraction of in vitro cultured human umbilical vein endothelial cell monolayer*. Blood, 1994. **83**(4): p. 994-1005.
215. Thiex, R., et al., *The role of endogenous versus exogenous tPA on edema formation in murine ICH*. Exp Neurol, 2004. **189**(1): p. 25-32.
216. Polavarapu, R., et al., *Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3270-8.
217. Fayard, B., et al., *The serine protease inhibitor protease nexin-1 controls mammary cancer metastasis through LRP-1-mediated MMP-9 expression*. Cancer Res, 2009. **69**(14): p. 5690-8.
218. Putnam, J.B., et al., *Evaluating the role of serine protease inhibition in the management of tumor micrometastases*. Oncology (Williston Park), 2003. **17**(10 Suppl 10): p. 9-30; quiz 31-2.
219. Glas, M., et al., *A role for the urokinase-type plasminogen activator system in amyotrophic lateral sclerosis*. Exp Neurol, 2007. **207**(2): p. 350-6.
220. Sugiki, M., et al., *Downregulation of urokinase-type and tissue-type plasminogen activators in a rabbit model of renal ischemia/reperfusion*. J Biochem, 2002. **132**(3): p. 501-8.
221. Carmeliet, P., et al., *Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice*. Nature, 1994. **368**(6470): p. 419-24.
222. Goldstein, L.J., *Experience in Phase I Trials and an Upcoming Phase II Study with uPA Inhibitors in Metastatic Breast Cancer*. Breast Care (Basel), 2008. **3**(s2): p. 25-28.
223. Weckroth, M., et al., *Epithelial tissue-type plasminogen activator expression, unlike that of urokinase, its receptor, and plasminogen activator inhibitor-1, is increased in chronic venous ulcers*. Br J Dermatol, 2004. **151**(6): p. 1189-96.

VIII. Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase	LRP	low density lipoprotein receptor-related protein
AST	Aspartat-Aminotransferase	MAC-1	macrophage-1 antigen
ATP	Adenosintriphosphat	MADCAM-1	mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1
CCD	charge-coupled device	MALT	mukosaassoziiertem lymphatischem Gewebe
DFP	diisopropylfluorphosphat	MHC	major histocompatibility complex
DNA	deoxyribonucleic acid	MMP	Matrix-Metalloproteinase
EACA	epsilon-aminocaproic acid	MW	Mittelwert
ESAM	endothelial cell-selective adhesion molecule	PAF	Plättchenaktivierender Faktor
FCS	fetal calf serum	PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
FITC	fluorescein-Isothiocyanat	PBS	phosphate buffered saline
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine	PECAM-1	platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1
FSAP	factor VII activating protease	PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase	RAP	Rezeptor-assoziiertes Protein
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase	RLOT	reflected light oblique transillumination-Mikroskopie
HIF	hypoxia-inducible factor	ROI	regions of interest
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	SDS	sodium dodecyl sulfate
IFN- γ	Interferon- γ	SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
IL	Interleukin	SEM	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Ischämie-Reperfusionsschaden	TAFI	thrombin-aktivatable fibrinolysis inhibitor
JAM-A	junctional adhesion molecule A	TCR	T cell receptor
JAM-B	junctional adhesion molecule B	TNF	Tumornekrosefaktor
JAM-C	junctional adhesion molecule C	tPA	tissue-type plasminogen activator
KG	Körpergewicht		
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1		
LIX	LPS induziertes CXC Chemokin		

TXA	tranexamic acid	VLA-4	very late antigen 4
uPA	urokinase-type plasminogen activator	VTN	Vitronektin
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor	WT	Wildtyp
VCAM-1	vascular cell-adhesion molecule 1	α 2AP	α 2-Antiplasmin
		α 2M	α 2-Makroglobulin

IX. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl danke ich sehr herzlich für die Aufnahme an das Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Fritz Krombach, der mir dieses hochinteressante Thema überlassen hat und damit die Möglichkeit gab, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Mit viel Geduld und Fürsorge lehrte er mich die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens. Durch unzählige Diskussionen und Ratschläge sowie seine Hilfsbereitschaft unterstützte er mich in jeder Phase dieses Projektes. Seine fachliche Kompetenz als akademischer Lehrer, sein Führungsstil, seine Begeisterungsfähigkeit und Kreativität sowie seine herausragenden menschlichen Qualitäten haben mich tief beeindruckt und sind zugleich Vorbild und Ansporn für meinen weiteren Lebensweg.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Christoph Reichel bedanken, der mich während meiner Zeit als Doktorand am Institut für Chirurgische Forschung exzellent betreute. Dankbar bin ich ihm für seine immer freundliche und geduldige Bereitschaft, mich das wissenschaftliche Arbeiten zu lehren. Für die unermüdliche und professionelle Einführung in sämtliche Methoden der Arbeitsgruppe, die Planung und Durchführung der Experimente sowie Interpretation, Diskussion und Präsentation der Ergebnisse danke ich ihm ebenso. Seine konstruktiven, hervorragenden Ideen, seine umfassenden Fachkenntnisse sowie die freundlichen Anregungen und Ratschläge haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Als Mentor und als Freund danke ich ihm für die Begleitung und aufopferungsvolle Unterstützung meiner Dissertationsarbeit.

Herrn Professor Dr. Stefan Zahler von der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die experimentelle Unterstützung. Die fruchtbare Zusammenarbeit in den gemeinsamen Projekten sowie die kritische und zugleich konstruktive Diskussion unserer Ergebnisse waren mir eine große Hilfe.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich Herrn Professor Dr. Sandip Kanse vom *Institute of Basic Medical Sciences* der Universität von Oslo für die freundliche Bereitstellung der uPA-defizienten Mäuse und die hervorragende Kooperation in den gemeinsamen Projekten.

Dem Vorstand der *Integrated Research Training Group* des Sonderforschungsbereiches (SFB) 914 „Trafficking of Immune Cells in Inflammation, Development and Disease“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die freundliche Aufnahme in das Graduiertenkolleg. Die bei den wöchentlichen Seminaren in intensiven Diskussionen mit den Kollegiaten gewonnenen Anregungen und Erkenntnisse haben wesentlichen Anteil am Erfolg der vorliegenden Arbeit.

Mein Dank gebührt auch Herrn Gerhard Adams für die kompetente Einweisung in die Durchflusszytometrie und die freundliche Unterstützung bei den Laborarbeiten. Auch Frau Claudia Fahney und Frau Silvia Münzing sowie allen anderen medizinisch-technischen Assistentinnen und Assistenten, die mich während meiner Zeit am Institut unterstützt haben, danke ich für die engagierte Hilfe bei den Laborarbeiten.

Herrn Dr. Jürgen Peters danke ich für die fachkundige und engagierte Beratung in allen statistischen Fragen sowie Herrn Dieter Müller für die Beratung und Hilfe bei allen organisatorischen Fragestellungen.

Den Tierpflegern im Institut, insbesondere Frau Brigitte Blount, danke ich für die verantwortungsvolle und zuverlässige Pflege der Versuchstiere.

Meinen Dank schulde ich auch den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, Herrn Max Lerchenberger, Herrn Marc Praetner, Herrn Martin Holzer, Herrn Peter Bihari, Herrn Daniel Pühr-Westerheide, Frau Gabriele Zuchtriegel, Herrn Maximilian Hessenauer, Herrn Matthias Fabritius, Frau Michaela Pörnbacher, Frau Stefanie Hirn, Frau Katharina Nekolla, Frau Sabine Sellner, Herrn Kariem Sharaf, und Herrn Markus Rehberg für ihre tatkräftige Unterstützung und die außergewöhnliche Arbeitsatmosphäre. Auch durch ihre Kollegialität

und Freundschaft wird mir dieser Lebensabschnitt als eine besondere Zeit in Erinnerung bleiben.

Ebenso danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Doktoranden im Hause für das professionelle und einzigartig kollegiale Arbeitsklima, ohne welches die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zu tiefstem Dank verpflichtet bin ich außerdem meiner ganzen Familie und insbesondere meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

X. Publikationen

1. Aus der Dissertation hervorgegangene Publikationen

1. **Uhl B**, Zuchtriegel G, Pühr-Westerheide D, Praetner M, Rehberg M, Fabritius M, et al. Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**. 2014;34(7):1495-504.
2. Reichel CA, **Uhl B**, Lerchenberger M, Pühr-Westerheide D, Rehberg M, Liebl J, et al. Urokinase-type plasminogen activator promotes paracellular transmigration of neutrophils via Mac-1, but independently of urokinase-type plasminogen activator receptor. **Circulation**. 2011;124(17):1848-59.

2. Weitere Publikationen

3. Holzer M, Bihari P, Praetner M, **Uhl B**, Reichel C, Fent J, et al. Carbon-based nanomaterials accelerate arteriolar thrombus formation in the murine microcirculation independently of their shape. **Journal of applied toxicology** : JAT. 2014;34(11):1167-76.
4. Lerchenberger M, **Uhl B**, Stark K, Zuchtriegel G, Eckart A, Miller M, et al. Matrix metalloproteinases modulate ameboid-like migration of neutrophils through inflamed interstitial tissue. **Blood**. 2013;122(5):770-80.
5. Lech M, Rommele C, Grobmayr R, Eka Susanti H, Kulkarni OP, Wang S, Grone HJ, **Uhl B**, et al. Endogenous and exogenous pentraxin-3 limits postischemic acute and chronic kidney injury. **Kidney international**. 2013;83(4):647-61.
6. Allam R, Scherbaum CR, Darisipudi MN, Mulay SR, Hagele H, Lichtnekert J, Hagemann JH, Rupanagudi, KV, Ryu M, Schwarzenberger C, Hohenstein B, Hugo C, **Uhl B**, et al. Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4. **Journal of the American Society of Nephrology** : JASN. 2012;23(8):1375-88.
7. Reichel CA, Pühr-Westerheide D, Zuchtriegel G, **Uhl B**, Berberich N, Zahler S, et al. C-C motif chemokine CCL3 and canonical neutrophil attractants promote neutrophil extravasation through common and distinct mechanisms. **Blood**. 2012;120(4):880-90.

8. Berberich N, **Uhl B**, Joore J, Schmerwitz UK, Mayer BA, Reichel CA, et al. Roscovitine blocks leukocyte extravasation by inhibition of cyclin-dependent kinases 5 and 9. **British journal of pharmacology**. 2011;163(5):1086-98.
9. Reichel CA, Lerchenberger M, **Uhl B**, Rehberg M, Berberich N, Zahler S, et al. Plasmin inhibitors prevent leukocyte accumulation and remodeling events in the postischemic microvasculature. **PloS one**. 2011;6(2):e17229.
10. Praetner M, Rehberg M, Bihari P, Lerchenberger M, **Uhl B**, Holzer M, et al. The contribution of the capillary endothelium to blood clearance and tissue deposition of anionic quantum dots in vivo. **Biomaterials**. 2010;31(26):6692-700.