

Aus der Klinik und Poliklinik
für Strahlentherapie und Radioonkologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. C. Belka

**Mechanismen der Extravasation von neutrophilen
Granulozyten und inflammatorischen Monozyten im
akuten Entzündungsgeschehen**



DISSERTATION

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

**vorgelegt von
Gabriele Zuchriegel
aus Schwabmünchen
2015**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Betreuerin: Prof. Dr. rer. nat. Kirsten Lauber

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Peter J. Nelson

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

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	15
1.1 Zelluläre Bestandteile des Immunsystems.....	15
1.1.1 Angeborenes Immunsystem	15
1.1.2 Erworbenes Immunsystem	20
1.2 Chemokine.....	21
1.2.1 Klassifizierung von Chemokinen	21
1.2.2 Chemokinrezeptoren	24
1.2.3 CCL2.....	26
1.3 Extravasation von Leukozyten	27
1.3.1 Kaskade der Leukozytenrekrutierung	27
1.3.2 Selektine und Interaktionspartner	30
1.3.3 Integrine und Interaktionspartner	34
2. Zielsetzung	38
3. Material und Methoden	39
3.1 Reagenzien.....	39
3.2 <i>In-vivo</i>-Experimente	40
3.2.1 Vorbemerkungen	40

3.2.2	Versuchstiere	40
3.2.3	Narkose.....	41
3.2.4	Peritonitismodell.....	42
3.2.4.1	Versuchsdurchführung.....	42
3.2.4.2	Induktion einer Peritonitis durch intraperitoneale Injektion.....	43
3.2.4.3	Intravenöse Applikation von monoklonalen Antikörpern.....	43
3.2.4.4	Versuchsgruppen.....	43
3.2.4.5	Versuchsprotokolle	44
3.2.5	Kremastermodell.....	45
3.2.5.1	Chirurgische Präparation des Kremastermuskels	45
3.2.5.2	Stimulation des <i>M. cremaster</i> durch intraskrotale Injektion.....	46
3.2.5.3	Intraarterielle Applikation von monoklonalen Antikörpern und Reagenzien	47
3.2.5.4	Blutentnahme über die <i>V. cava</i>	47
3.2.5.5	Intravitalmikroskopie.....	48
3.2.5.6	Quantifizierung der Leukozytenkinetik und mikrohämodynamischer Parameter.....	48
3.2.5.7	Analyse der Leukozytenmigrationswege.....	50
3.2.5.8	Analyse des Crawlingverhaltens von Leukozyten	50
3.2.5.9	Versuchsgruppen.....	51

3.2.5.10	Versuchsprotokolle	52
3.3	Ex-vivo-Experimente	54
3.3.1	Messung der Leukozytenzahl.....	54
3.3.2	Durchflusszytometrie	55
3.3.2.1	Durchflusszytometrische Analyse der Peritoneallavage.....	55
3.3.2.2	Durchflusszytometrische Analyse von Expressionsprofilen	56
3.3.3	Konfokalmikroskopie	57
3.3.3.1	Konfokalmikroskopie isolierter Blutzellen.....	57
3.3.3.2	Konfokalmikroskopie des <i>M. cremaster</i>	58
3.3.4	mRNA-Expressionsanalyse (qRT-PCR).....	59
3.4	Statistik	61
4.	Ergebnisse.....	62
4.1	Untersuchungen zur Bedeutung von Selektinen für die Extravasation von Leukozyten myeloiden Ursprungs.....	62
4.1.1	Expressionsanalyse von L-Selektin/CD62L, PSGL-1/CD162 und CD44 auf der Oberfläche von Leukozyten myeloiden Ursprungs.....	62
4.1.2	Expressionsanalyse von P-Selektin/CD62P, E-Selektin/CD62E, PSGL-1/CD162 und CD44 in der Mikrovaskulatur	64

4.1.3	Einfluss von Selektinen sowie den Selektinliganden PSGL-1/CD162 und CD44 für die CCL2-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten.....	67
4.1.4	Dynamik der Rekrutierung einzelner Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs im Kremastermodell.....	70
4.1.5	Interaktionen von Leukozyten myeloiden Ursprungs mit Endothelzellen.....	72
4.1.6	Einfluss von Selektinen auf die einzelnen Schritte der Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs.....	75
4.1.7	Einfluss der Selektinliganden PSGL-1/CD162 und CD44 auf die einzelnen Schritte der Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs	79
4.1.8	Einfluss von Selektinen auf das intravaskuläre Crawlingverhalten von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten	81
4.1.9	Einfluss von Selektinliganden auf das intravaskuläre Crawlingverhalten von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten	83
4.1.10	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Bedeutung von Selektinen.....	85
4.1.11	Systemische Leukozytenzahlen und mikrohämodynamische Parameter.....	86
4.2	Untersuchungen zur Bedeutung von Integrinen für die Extravasation von Leukozyten myeloiden Ursprungs	87
4.2.1	Expressionsanalyse von LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d auf der Oberfläche von Leukozyten myeloiden Ursprungs.....	87

4.2.2	Expressionsanalyse von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A in der Mikrovaskulatur	89
4.2.3	Einfluss von β 1- und β 2-Integrinen und Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie auf die CCL2-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten.....	92
4.2.4	Einfluss von LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d auf die einzelnen Schritte der Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs	93
4.2.5	Einfluss von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A auf die einzelnen Schritte der Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs.....	96
4.2.6	Einfluss von LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d auf das intravaskuläre Crawlingverhalten von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten	99
4.2.7	Einfluss von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A auf das intravaskuläre Crawlingverhalten von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten	101
4.2.8	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Bedeutung von Integrinen.....	103
4.2.9	Systemische Leukozytenzahlen und mikrohämodynamische Parameter ...	104
5.	Diskussion.....	105
5.1	Wissenschaftlicher Hintergrund	105

5.2	Material und Methoden	109
5.3	Bedeutung von Selektinen für die Extravasation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten.....	114
5.4	Bedeutung von Integrinen für die Extravasation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten	119
6.	Zusammenfassung	125
7.	Literatur.....	128
8.	Danksagung	154
9.	Publikationen	155
10.	Eidesstattliche Versicherung	159

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. femoralis</i>	<i>Arteria femoralis</i>
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APCs	<i>antigen-presenting cells</i>
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
CaIDAG-GEFI	<i>calcium-diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor I</i>
CCL2/MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
CCL21/SLC	<i>secondary lymphoid-tissue chemokine</i>
CCL3/MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein 1-alpha</i>
CCL5/RANTES	<i>regulated on activation normal T-cell expressed and secreted</i>
CCL7/MCP-3	<i>monocyte chemoattractant protein-3</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CXCL1/GRO- α	<i>growth related oncogene-alpha</i>
CXCL12/SDF-1 α	<i>stromal cell-derived factor 1-alpha</i>
CXCL8/IL-8	Interleukin-8
Cy7	Cyanin-7
DAP12	<i>DNAX activation protein of 12 kDa</i>
DARC	Duffy Antigen Rezeptor für Chemokine
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ESAM	<i>endothelial-specific adhesion molecule</i>

ESL-1	<i>E-selectin ligand-1</i>
FcR γ	<i>Fc receptor γ-chain</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
GAGs	Glykosaminoglykane
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GlyCAM-1	<i>glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1</i>
GPCRs	<i>G-protein-coupled receptors</i>
GPIb α	Glykoprotein-1-b-alpha
GTP	Guanosintriphosphat
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
i. a.	intraarteriell
i. p.	intraperitoneal
i. s.	intraskrotal
i. v.	intravenös
ICAM-1/CD54	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
ICAM-2/CD102	<i>intercellular adhesion molecule-2</i>
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin
IL-1 β	Interleukin-1-beta
<i>iMOs</i>	inflammatorische Monozyten
IVM	Intravitalmikroskopie
JAM-A	<i>junctional adhesion molecule A</i>
JAM-C	<i>junctional adhesion molecule C</i>
JAMs	<i>junctional adhesion molecules</i>
LFA-1/CD11a	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPC	Lysophosphatidylcholin

Ly6C	<i>lymphocyte antigen 6C</i>
Ly6G	<i>lymphocyte antigen 6G</i>
<i>M. cremaster</i>	<i>Musculus cremaster</i>
Mac-1/CD11b	<i>macrophage-1 antigen</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MHCI	MHC der Klasse I
MHCII	MHC der Klasse II
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MW	Mittelwert
N	neutrophile Granulozyten
NA	numerische Apertur
NET	<i>neutrophil extracellular trap</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-kinase
PLCγ2	Phospholipase-gamma-2
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSGL-1/CD162	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rap1	<i>Ras-proximate-1/Ras-related protein 1</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family member A</i>

RLOT	<i>reflected light oblique transillumination</i>
rMOs	residente Monozyten
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAse	Ribonuklease
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RT	reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>standard error of mean</i>
SLC	<i>systemic leukocyte count</i>
SSC	<i>side scatter</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
<i>V. cava</i>	<i>Vena cava</i>
VCAM-1/CD106	<i>vascular cellular adhesion molecule-1</i>
VE-cadherin	<i>vascular endothelial-cadherin</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLA-4/CD49d	<i>very late antigen-4</i>
vs.	<i>versus</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Zelluläre Bestandteile des Immunsystems

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Täglich wird der menschliche Körper mit einer Vielzahl unterschiedlicher Pathogene, wie Viren, Bakterien, Toxine oder veränderte körpereigene Bestandteile, konfrontiert. Bevor diese Krankheitserreger von uns bemerkt werden, reagiert das angeborene Immunsystem innerhalb weniger Minuten. Nur in seltenen Fällen löst dies eine akute inflammatorische Reaktion aus, die als Abwehrmechanismus des Körpers dient. Neben anatomischen Barrieren und humoralen Faktoren besteht das angeborene Immunsystem aus verschiedenen zellulären Bestandteilen, welche für die erfolgreiche Bekämpfung der Krankheitserreger verantwortlich sind ^{1, 2}. An der Abwehrreaktion des Körpers sind gewebeständige Mastzellen und Makrophagen beteiligt. Bei Bedarf werden auch natürliche Killerzellen und Phagozyten, wie neutrophile Granulozyten und Monozyten, über die Blutbahn an den Ort der Infektion rekrutiert (vgl. **Abb. 1.1**).

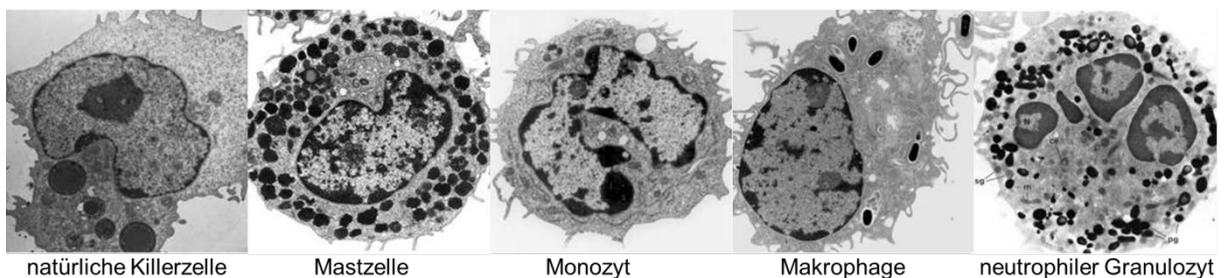


Abb. 1.1: Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen von zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems (von links nach rechts): Natürliche Killerzelle, Mastzelle, Monozyt, Makrophage und neutrophiler Granulozyt (modifiziert nach ³).

Mastzellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab und haben eine Lebensdauer von Wochen bis Monaten. Diese Zellen des angeborenen Immunsystems reifen in fast jedem Gewebe des Körpers, wo sie vor allem in der Nähe von Gefäßen und Nerven zu finden sind. Dadurch gehören sie zu den ersten Zellen, welche mit Pathogenen in Kontakt kommen. Durch ihre Fähigkeit zur Synthese und Freisetzung von unterschiedlichen Proteasen oder Proteoglykanen können sie sowohl antiinflammatorische oder immunsuppressive als auch proinflammatorische Reaktionen auslösen ^{4, 5, 6, 7, 8}.

Natürliche Killerzellen differenzieren sich aus lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark und gehören daher der Klasse der im Blutkreislauf zirkulierenden Lymphozyten an ^{9, 10}. Nach ihrer Lokalisation im Körper, wie beispielsweise in der Leber, im Darm, im Endometrium oder im Thymus, können gewebespezifische Subtypen dieser Immunzellen unterschieden werden ^{11, 12}. Charakteristisch für natürliche Killerzellen ist, dass sie Viren oder entartete Zellen erkennen und abtöten können. Dabei kommen direkte Mechanismen, bei denen Perforine, Granzyme oder Tumornekrosefaktor (TNF) aus den Granula der natürlichen Killerzellen freigesetzt werden, aber auch indirekte Mechanismen, bei denen durch die Sekretion von Interferon-gamma (IFN- γ) zytotoxische Lymphozyten mobilisiert werden, zum Einsatz ^{12, 13, 14}.

Neutrophile Granulozyten bilden zusammen mit eosinophilen und basophilen Granulozyten die Gruppe der polymorphkernigen Leukozyten. Nach ihrer Reifung aus myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark zirkulieren neutrophile Granulozyten im Blut und stellen einen Anteil von 40 – 60 % aller zirkulierenden Leukozyten im humanen System dar. Bei akuten oder chronischen inflammatorischen Ereignissen werden jedoch deutlich mehr neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark in das Blut mobilisiert, welche in der Folge in das entzündete Gewebe auswandern ^{15, 16, 17, 18, 19}. Dort werden nach Aktivierung dieser Immunzellen in Granula gespeicherte Enzyme, wie z. B. Gelatinasen, oder proinflammatorische Zytokine, wie z. B. Interleukin-8 (CXCL8/IL-8) oder TNF, freigesetzt. Dadurch werden Pathogene eliminiert und die Entzündungsreaktion weiter verstärkt ^{20, 21, 22}.

Des Weiteren können neutrophile Granulozyten reaktive Sauerstoffradikale bilden. Durch diese Moleküle werden neben Bakterien, Parasiten oder anderen Pathogenen allerdings auch gesunde Zellen unspezifisch zerstört und die auf Entzündungsereignisse folgenden Gewebeschäden verursacht^{23, 24}. Daneben wurde ein weiterer Vorgang, die „NETosis“ (NET = *neutrophil extracellular trap*), beschrieben: Durch Bildung eines aus *desoxyribonucleic acid* (DNA) der neutrophilen Granulozyten bestehenden extrazellulären Netzwerkes dient dieser Mechanismus der Bindung und damit der effektiven Bekämpfung von Bakterien ohne diese in das Zellinnere aufzunehmen^{25, 26}. Die Lebensdauer von neutrophilen Granulozyten wird kontrovers diskutiert und beträgt etwa 5 Stunden bis 5 Tage²⁷. Nach ihrer Rekrutierung in das Gewebe werden sie schließlich von Monozyten bzw. Makrophagen phagozytiert^{4, 28}.

Ebenso wie die neutrophilen Granulozyten differenzieren sich Monozyten im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen. Etwa 10 % aller im Blut zirkulierenden Leukozyten im menschlichen Organismus bzw. 4 % in der Maus gehören der Klasse der Monozyten an. Zirkulierende Monozyten können aus dem Blutstrom in das Gewebe auswandern, wo sie sich in gewebespezifische Makrophagen oder dendritische Zellen differenzieren können^{29, 30}.³¹ Einerseits besitzen Monozyten die Fähigkeit, Viren, Bakterien oder andere Krankheitserreger zu bekämpfen^{32, 33}. Andererseits sind sie auch an der Progression von inflammatorischen oder degenerativen Krankheiten, wie z. B. Atherosklerose oder *Morbus Alzheimer*, beteiligt^{34, 35, 36}. Eindeutig charakterisiert werden die im Blut zirkulierenden Monozyten durch die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen (murin: CD11b, F4/80; human: CD11b, CD11c und CD14)^{29, 30}.

In der Maus können diese Immunzellen des angeborenen Immunsystems anhand der Expression weiterer Oberflächenmoleküle und entsprechend ihrer Funktion in zwei Subpopulationen unterteilt werden^{30, 37} (**vgl. Abb. 1.2**): Inflammatorische Monozyten (*iMOs*) werden durch starke Expression des Proteins Ly6C und des Chemokinrezeptors CCR2 identifiziert, während sie den Chemokinrezeptor CX₃CR-1 in geringem Maße auf ihrer Oberfläche exprimieren. Über einen CCR2-abhängigen Mechanismus können sie schnell an

den Ort der Entzündung oder Infektion rekrutiert werden und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehrreaktion gegen Viren, Bakterien, Pilze oder Protozoen^{38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45}. Residente Monozyten (*rMOs*) dagegen sind durch eine starke Oberflächenexpression von CX₃CR-1 gekennzeichnet und besitzen wenig CCR2 sowie Ly6C. Sowohl unter unstimulierten als auch unter stimulierten Bedingungen wurde gezeigt, dass residente Monozyten entlang der luminalen Gefäßoberfläche „patrouillieren“. Des Weiteren können sie nach Extravasation ins Gewebe und Differenzierung zu alternativ aktivierten Makrophagen die Wundheilung fördern. Inflammatorische und residente Monozyten weisen zudem einige Unterschiede bezüglich der Expression von Molekülen auf, welche für die Extravasation in entzündetes Gewebe relevant sind. Beispiele hierfür sind die Proteine L-Selektin/CD62L, CD44, *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1/CD162) oder *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1/CD11a).

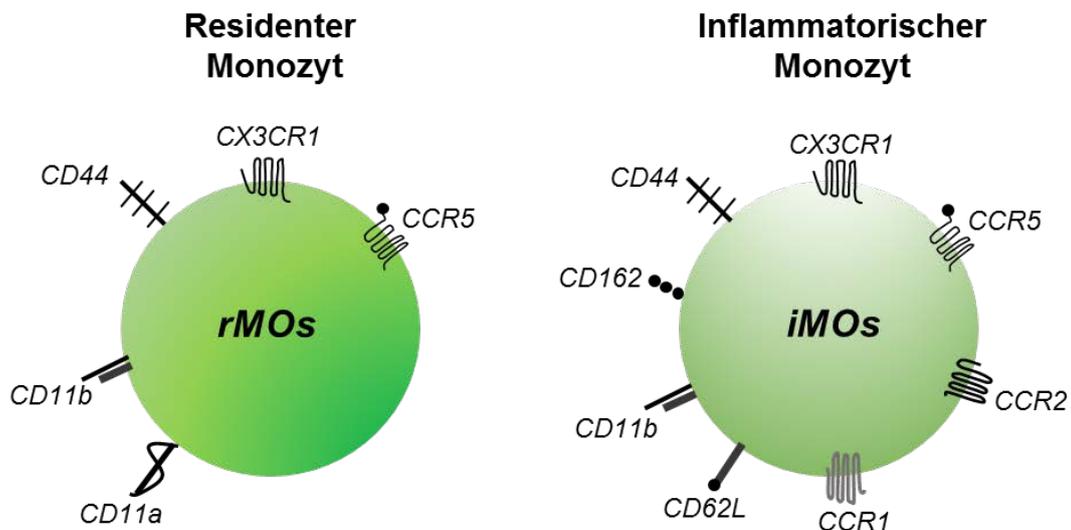


Abb. 1.2.: Expression von unterschiedlichen Oberflächenmolekülen auf residenten (links, *rMOs*) und inflammatorischen Monozyten (rechts, *iMOs*) in der Maus. Auf der Oberfläche von residenten Monozyten sind der Selektinligand CD44, die β 2-Integrine lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1/CD11a) und macrophage-1 antigen (Mac-1/CD11b) sowie die Chemokinrezeptoren CX₃CR-1 und CCR5 exprimiert. Auf der Oberfläche von inflammatorischen Monozyten sind L-Selektin/CD62L, die Selektinliganden CD44 und *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1/CD162), das β 2-Integrin Mac-1/CD11b sowie die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5 und CX₃CR-1 exprimiert.

Im humanen System werden Monozyten anhand ihrer Expression von CD14 und CD16 in Subpopulationen eingeteilt^{30, 46, 47, 48, 49}: Inflammatorische (Synonym: klassische) Monozyten sind stark positiv für CD14 und negativ für CD16. In ihrer Funktion als Phagozyten und durch die Expression von CCR2 sind sie den murinen Ly6C-positiven (Ly6C⁺) inflammatorischen Monozyten sehr ähnlich. Die CD16-positive (CD16⁺) Monozytensubpopulation kann weiter in CD14⁺CD16⁺⁺ und CD14⁺⁺CD16⁺ Zellen unterteilt werden, welche als nicht-klassische und intermediäre Monozyten bezeichnet werden. Die Population der CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten kann mit den murinen residenten Monozyten verglichen werden, da sie ebenfalls in den Gefäßen der Mikrovaskulatur „patrouilliert“. Obwohl die murinen und humanen Monozyten-subpopulationen nicht identisch sind, stimmen sie in ihrer Funktion für das Immunsystem und in der Expression der wichtigsten Oberflächenmoleküle größtenteils überein (**vgl. Abb. 1.3**).

	Oberflächenmoleküle		Chemokinrezeptoren		Funktionen	
	<i>murin</i>	<i>human</i>	<i>murin</i>	<i>human</i>	<i>murin</i>	<i>human</i>
residente Monozyten	CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ^{low}	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	CCR2 ^{low} CX ₃ CR-1 ^{high}	CCR2 ^{low} CX ₃ CR-1 ^{high}	„Patrouillieren“, frühe Immun- Antwort, Reparatur	„Patrouillieren“, antiviral
intermediäre Monozyten	-	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	-	CCR2 ^{high} CX ₃ CR-1 ^{low}	-	proinflamma- torisch
inflammatorische Monozyten	CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ^{high}	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CCR2 ^{high} CX ₃ CR-1 ^{low}	CCR2 ^{high} CX ₃ CR-1 ^{low}	proinflamma- torisch, antimikrobiell	proinflamma- torisch, antimikrobiell

Abb. 1.3: Tabellarische Gegenüberstellung der murinen und humanen Monozytensubpopulationen hinsichtlich der klassifizierenden Oberflächenmoleküle, der Chemokinrezeptoren CCR2 bzw. CX₃CR-1 und der Funktionen für das Immunsystem (modifiziert nach³⁰).

1.1.2 Erworbenes Immunsystem

Das erworbene Immunsystem wird erst verzögert nach einer Infektion aktiv und bekämpft eingedrungene Pathogene deutlich spezifischer als das angeborene Immunsystem. Die zellulären Hauptbestandteile des erworbenen Immunsystems sind *antigen-presenting cells* (APCs), wie Makrophagen oder dendritische Zellen, sowie T- und B-Lymphozyten^{1, 50, 51, 52}.

Makrophagen oder dendritische Zellen, welche im Gewebe lokalisiert sind und sich zum Teil aus Monozyten differenzieren, können nach der Phagozytose der Krankheitserreger Bruchstücke von diesen auf ihrer Oberfläche präsentieren. Diese Antigene sind an *major histocompatibility complex* (MHC)-Molekülen auf der Oberfläche der APCs gebunden und werden so den B- und T-Lymphozyten präsentiert^{50, 51}.

Im Anschluss interagieren naive T-Lymphozyten über spezifische T-Zellrezeptoren mit den jeweiligen Antigenen und werden durch kostimulatorische Faktoren, welche von denselben APCs exprimiert werden, aktiviert. T-Lymphozyten gehören den Leukozyten an, entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark und reifen im Thymus. Anhand ihrer Funktion sowie der Expression von Oberflächenmolekülen werden CD4-positive (CD4⁺) und CD8-positive (CD8⁺) T-Zellen unterschieden. Die CD4⁺-Zellen können weiter in T-Helferzellen, welche mithilfe ihres spezifischen T-Zellrezeptors mit den an MHC-Molekülen der Klasse II (MHCII-Moleküle) gebundenen Antigenen interagieren, und regulatorische T-Zellen, welche die Immunantwort gegen körpereigene Bestandteile und harmlose Antigene unterdrücken, unterteilt werden. Die T-Zellrezeptoren der CD8⁺-Zellen dagegen binden an Antigene, welche über MHC-Moleküle der Klasse I (MHCI-Moleküle) auf der Oberfläche der APCs präsentiert werden. Nach ihrer Aktivierung vermehren sich diese CD8⁺-Zellen und sezernieren Substanzen, wie Granzyme oder Perforine, welche die Apoptose der infizierten Zellen induzieren^{50, 51, 52}.

B-Lymphozyten gehören ebenfalls den Leukozyten an, differenzieren sich aus lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark und zirkulieren im Blut sowie in den Lymphgefäßen. Über spezifische Rezeptoren können diese Leukozyten mit bestimmten Antigenen interagieren und werden mithilfe von Zytokinen, welche unter anderem von T-Zellen sezerniert werden, aktiviert. Im Thymus oder in der Milz differenzieren sich B-Zellen in der Folge zu Plasmazellen, welche spezifische Antikörper produzieren. Diese Antikörper binden an definierte Pathogene und mobilisieren hierdurch weitere Phagozyten. Daneben können aus den aktivierten B-Lymphozyten auch Gedächtniszellen entstehen. Diese Immunzellen sind zusammen mit den von Plasmazellen produzierten Antikörpern für die schnelle Antwort bei einer Zweitinfektion verantwortlich^{50, 53}.

1.2 Chemokine

1.2.1 Klassifizierung von Chemokinen

Die Freisetzung bestimmter Leukozytensubpopulationen aus dem Knochenmark und die Rekrutierung dieser Immunzellen in Zielorgane des Körpers werden durch chemotaktische Zytokine, kurz Chemokine^{53, 54, 55, 56}, koordiniert. Chemokine sind eine Gruppe von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 8 - 12 kDa, welche systematisch nach den N-terminalen Cysteinresten in ihrer Aminosäure-Struktur in 4 Familien eingeteilt werden: Die C-motif-Chemokine, die CC-motif-Chemokine, die CXC-motif-Chemokine und das CX₃C-motif-Chemokin (vgl. Abb. 1.4).

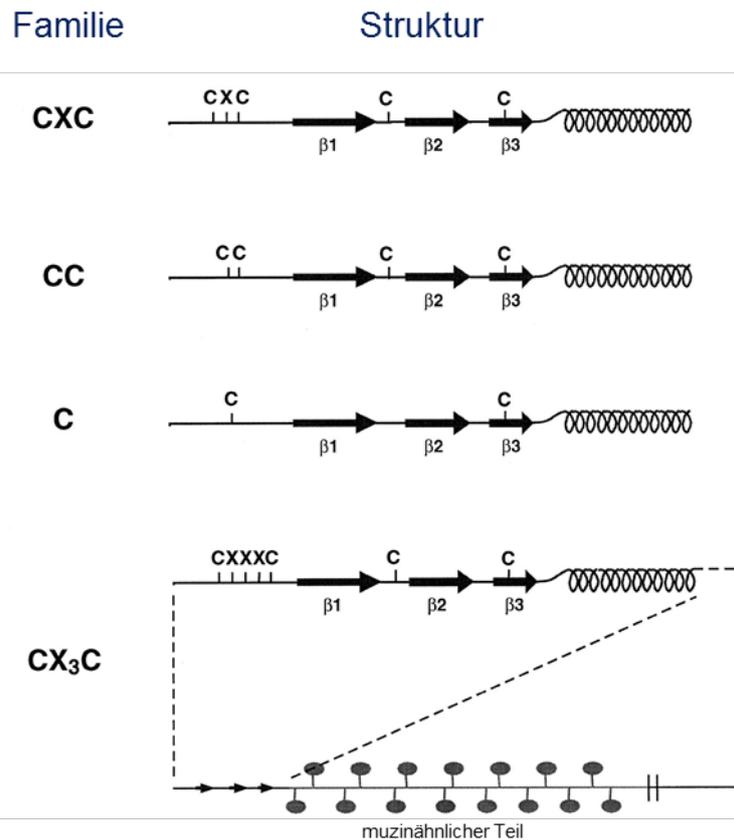


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Struktur der unterschiedlichen Chemokinfamilien (von oben nach unten): CXC-motif-Chemokine, CC-motif-Chemokine, C-motif-Chemokine und CX₃C-motif-Chemokine (modifiziert nach ⁵⁵).

Bei CC-motif-Chemokinen, wie z. B. *monocyte chemoattractant protein-1* (CCL2/MCP-1), *macrophage inflammatory protein 1-alpha* (CCL3/MIP-1 α) oder *regulated on activation normal T-cell expressed and secreted* (CCL5/RANTES), folgen die ersten beiden Cysteine am aminoterminalen Ende direkt aufeinander. Diese Familie stellt mit 24 Vertretern im humanen System die größte Familie von Chemokinen dar. CXC-motif-Chemokine, wie z. B. *growth related oncogene-alpha* (CXCL1/GRO α), CXCL8 oder *stromal cell-derived factor 1-alpha* (CXCL12/SDF-1 α), gehören der zweitgrößten Klasse von Chemokinen an. Ihre beiden ersten Cysteine am aminoterminalen Ende sind durch eine Aminosäure voneinander getrennt. C-motif-Chemokine dagegen besitzen nur ein konserviertes Cystein. CX₃CL1, der einzige Vertreter aus der Klasse der CX₃C-motif-Chemokine, besitzt drei Aminosäuren zwischen den ersten beiden Cysteinen am aminoterminalen Ende. Durch ihre ähnliche Aminosäuresequenz besitzen die unterschiedlichen Chemokinfamilien auch große

Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer Sekundär- und Tertiärstrukturen, welche durch mindestens drei β -Faltblätter gekennzeichnet sind. Erst die Dimerisierung der Chemokine führt zu einer unterschiedlichen räumlichen Anordnung von geladenen und polaren Seitenketten der CXC-motif- und CC-motif-Chemokine. Dadurch werden ihre Eigenschaften, wie beispielsweise ihre Dissoziationskonstante oder ihre Affinität für Rezeptoren, verändert. Zusätzlich wurden unterschiedliche Isoformen, Polymorphismen und Splice-Varianten einzelner Chemokine beschrieben, welche weitere funktionelle Unterschiede aufweisen können^{53, 55, 57, 58, 59, 60, 60}.

Verallgemeinernd werden CXC-motif-Chemokine häufig für die Extravasation von neutrophilen Granulozyten im akuten Entzündungsgeschehen, wie z. B. bei bakteriellen Infektionen^{56, 62, 63}, verantwortlich gemacht. CC-motif-Chemokine dagegen sind bekannt für die Rekrutierung von Monozyten, wie anhand von Studien im Peritonitismodell^{64, 65} oder bei Atherosklerose⁶⁶, nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu zeigen neuere Studien, dass diese funktionelle Abgrenzung der CC-motif-Chemokine von den CXC-motif-Chemokinen *in vivo* nicht zutrifft, da CCL2, CCL3 oder CCL5 sowohl neutrophile Granulozyten als auch Monozyten rekrutieren können^{67, 68, 69}. Neben ihrer prominenten Rolle für die Chemotaxis und Adhäsion von Leukozyten an aktivierte Endothelzellen sind Chemokine auch an Prozessen der Reifung, Differenzierung, Proliferation und Apoptose von unterschiedlichen Zelltypen beteiligt⁵³. Großen Einfluss auf die Funktion der Chemokine hat außerdem deren Lokalisation im Körper: Während im Knochenmark oder in Lymphgefäßen exprimierte Chemokine, wie beispielsweise *secondary lymphoid-tissue chemokine* (CCL21/SLC) oder CXCL12, überwiegend für die Homöostase zuständig sind, erfüllen Chemokine in peripheren Organen Aufgaben der Immunantwort im Entzündungsgeschehen^{53, 70, 71}.

1.2.2 Chemokinrezeptoren

Die verschiedenen Funktionen von Chemokinen werden über Interaktionen mit bestimmten Oberflächenrezeptoren ausgelöst. CC-motif-Chemokine binden dabei an verschiedene CC-motif-Chemokinrezeptoren, C-motif-Chemokine an C-motif-Chemokinrezeptoren, CXC-motif-Chemokine an CXC-motif-Chemokinrezeptoren und das Chemokin CX₃CL1 interagiert mit dem CX₃CR1-Chemokinrezeptor. Ein Chemokin kann dabei mit mehreren Chemokinrezeptoren interagieren bzw. verschiedene Chemokine können an den gleichen Chemokinrezeptor binden^{53, 72} (vgl. Abb. 1.5).

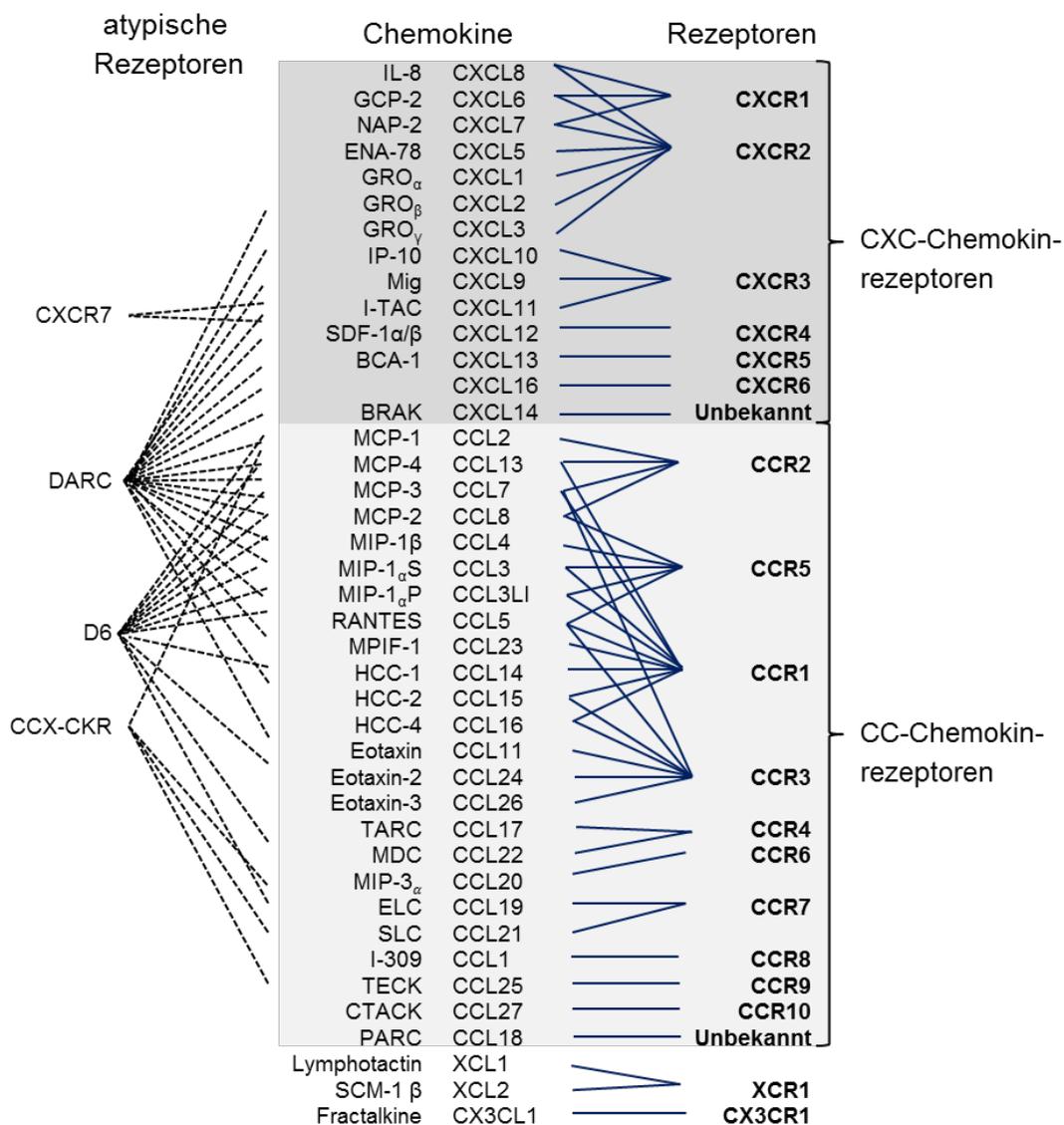


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Interaktionen von CXC-motif-Chemokinen, CC-motif-Chemokinen, C-motif-Chemokinen und dem CX₃C-motif-Chemokin mit klassischen CXC-motif- bzw. CC-motif-Chemokinrezeptoren (rechte Spalte) sowie mit den atypischen Rezeptoren CXCR7, DARC, D6 bzw. CCX-CKR (linke Spalte; modifiziert nach⁵³).

Gemeinsam ist diesen Chemokinrezeptoren, dass sie der Klasse der *G-protein-coupled receptors* (GPCRs) angehören: Diese Rezeptoren gehören zu den allosterischen Rezeptoren und bestehen aus sieben transmembranären Helixstrukturen, welche über drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Die extrazellulären Domänen dienen der Bindung der Liganden, welche zu einer Konformationsänderung führt und eine intrazelluläre Signaltransduktion über heterotrimere G-Proteine auslöst^{53, 73, 74, 75}: Nach Aktivierung des Rezeptors kommt es zum Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) in Guanosintriphosphat (GTP), welches in seine α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten dissoziiert⁷⁷. In der Folge aktivieren diese Untereinheiten verschiedene intrazelluläre Enzyme, wie z. B. die Phosphoinositol-3-kinase (PI3K), welche eine essentielle Rolle für die Chemotaxis von Leukozyten myeloiden Ursprungs spielt⁷⁷. Über eine Kaskade von weiteren intrazellulären Molekülen werden schließlich membranständige Proteine aktiviert. Dies führt beispielsweise zu Konformationsänderungen von leukozytären Integrinen oder zur Aktinpolymerisation und letztendlich zur gerichteten Migration von Leukozyten^{53, 78}.

Neben den klassischen GPCRs wurden weitere atypische Rezeptoren identifiziert^{79, 80}: CXCR7 und CCX-CKR, welche überwiegend Chemokine mit homöostatischen Funktionen binden, der Duffy Antigen Rezeptor für Chemokine (DARC) und D6. DARC und D6 werden als internalisierende Rezeptoren bezeichnet, da sie eine Vielzahl inflammatorischer Chemokine aufnehmen können. Strukturell ähneln diese Rezeptoren stark den GPCRs, jedoch aktivieren sie keine nachgeschalteten intrazellulären Signalkaskaden. Deshalb werden sie in der Literatur häufig auch als „stille“ Rezeptoren benannt. D6 wird von Endothelzellen in Lymphgefäßen, Syncytiotrophoblasten der Plazenta oder Leukozyten im Blut exprimiert und führt zur Degradation der Liganden in Lysosomen^{80, 81}. DARC dagegen wird von Erythrozyten und Endothelzellen exprimiert. Erythrozyten dienen damit als Chemokinspeicher, wodurch die Chemokinkonzentration im Blut konstant gehalten werden kann und der Transport der frei im Blut vorliegenden Chemokine in andere Organe, wie z. B. Lunge oder Niere, verhindert wird. Der von Endothelzellen exprimierte DARC dagegen vermittelt die Transzytose von Chemokinen, welche im extravaskulären Gewebe synthetisiert

werden. Dadurch können Chemokine, welche über die Bindung an Glykosaminoglykane (GAGs) oder Heparansulfate auf der luminalen Oberfläche von Endothelzellen präsentiert werden, mit auf der luminalen Endothelzelloberfläche rollenden Leukozyten interagieren^{80, 82}.

1.2.3 CCL2

CCL2 gehört zur Klasse der CC-motif-Chemokine und wird vor allem von Monozyten bzw. Makrophagen, jedoch auch von Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Mesangiumzellen, Astrozyten und Mikrogliazellen synthetisiert^{83, 84, 85, 86, 87, 88}. Diese Zellen setzen das Chemokin entweder konstitutiv oder als Reaktion auf oxidativen Stress, Zytokine oder Wachstumsfaktoren frei⁸³. In den unterschiedlichsten Erkrankungen, wie z. B. bei allergischem Asthma, rheumatoider Arthritis, beim humanen Immundefizienz-Virus (HIV), im ischämischen Herz oder in diversen Tumoren, wurde eine Erhöhung von CCL2 festgestellt^{89, 90, 91, 92, 93, 94} (vgl. **Abb. 1.6**).

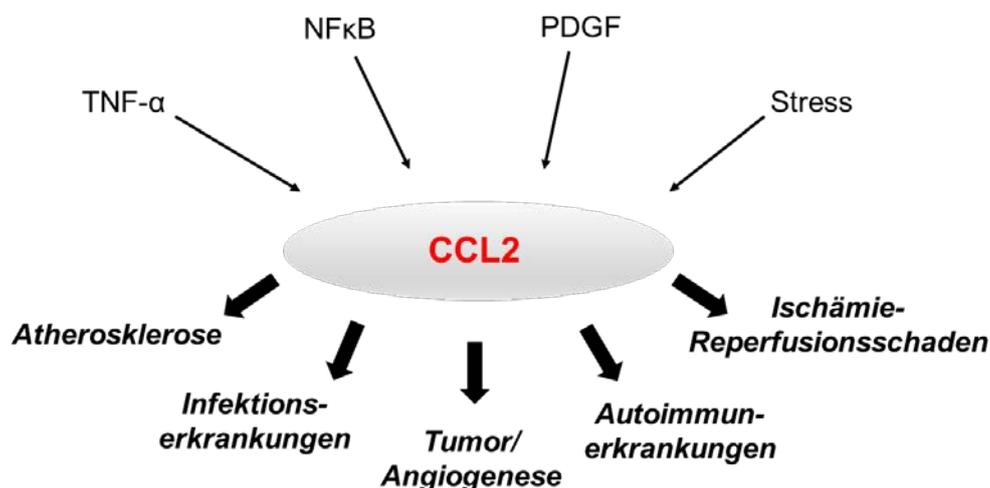


Abb. 1.6: Schematische Darstellung von den Induktoren TNF, nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFκB), platelet-derived growth factor (PDGF) oder Stressfaktoren (oben), welche die Produktion bzw. Sekretion des Chemokins CCL2 auslösen, sowie der mit CCL2 assoziierten Krankheiten (unten), wie Atherosklerose, Infektionserkrankungen, Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und dem Ischämie-Reperfusionsschaden.

Über die Interaktion mit dem Chemokinrezeptor CCR2, welcher auf Monozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen, T-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, übt CCL2 seine vielfältigen Funktionen im Immunsystem aus⁸³. So ist CCL2 beispielsweise für die Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten bei einer Vielzahl viraler oder bakterieller Infektionen verantwortlich^{68, 95}. Bei kardiovaskulären Erkrankungen, wie z. B. der Atherosklerose, wurde gezeigt, dass CCL2 eine Akkumulation von Monozyten in den atherosklerotischen Plaques vermittelt^{66, 96}. Des Weiteren wurde in Studien mit CCL2- oder CCR2-defizienten Mäusen bei experimenteller multipler Sklerose eine Reduktion von Monozyten im zentralen Nervensystem und eine dadurch verlangsamte Progression dieser Erkrankung beschrieben⁹⁸. In Studien zum Mammakarzinom wird die Rolle von CCL2, welches von metastasierenden Tumorzellen gebildet wird, kontrovers diskutiert: Einerseits werden inflammatorische Monozyten über einen CCR2-abhängigen Mechanismus rekrutiert und ermöglichen (über ihre proangiogenetische Wirkung) die Auswanderung von Tumorzellen in andere Organe. Andererseits rekrutiert CCL2 auch neutrophile Granulozyten, welche eine gegen das Tumorgewebe gerichtete Immunantwort auslösen können⁹⁸. CCL2 spielt somit eine zentrale Rolle für unterschiedliche Erkrankungen, welche mit einer verstärkten Rekrutierung von Monozyten oder neutrophilen Granulozyten einhergehen.

1.3 Extravasation von Leukozyten

1.3.1 Kaskade der Leukozytenrekrutierung

Bei der Extravasation von Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe werden zirkulierende Leukozyten zunächst von endothelialen Rezeptoren in postkapillären Venolen eingefangen. Sodann rollen diese Immunzellen entlang des Gefäßendothels, bevor sie aktiviert werden

und fest daran adhären. In einem nächsten Schritt kriechen („crawlen“) Leukozyten zu geeigneten Stellen für ihre Transmigration in das entzündete Gewebe (vgl. **Abb. 1.7**). Die einzelnen Schritte dieses kaskadenartigen Prozesses werden durch die Interaktionen von unterschiedlichen Oberflächenmolekülen auf Leukozyten mit deren Liganden auf Endothelzellen, Thrombozyten, weiteren Leukozyten oder Perizyten reguliert ^{99, 100, 101}.

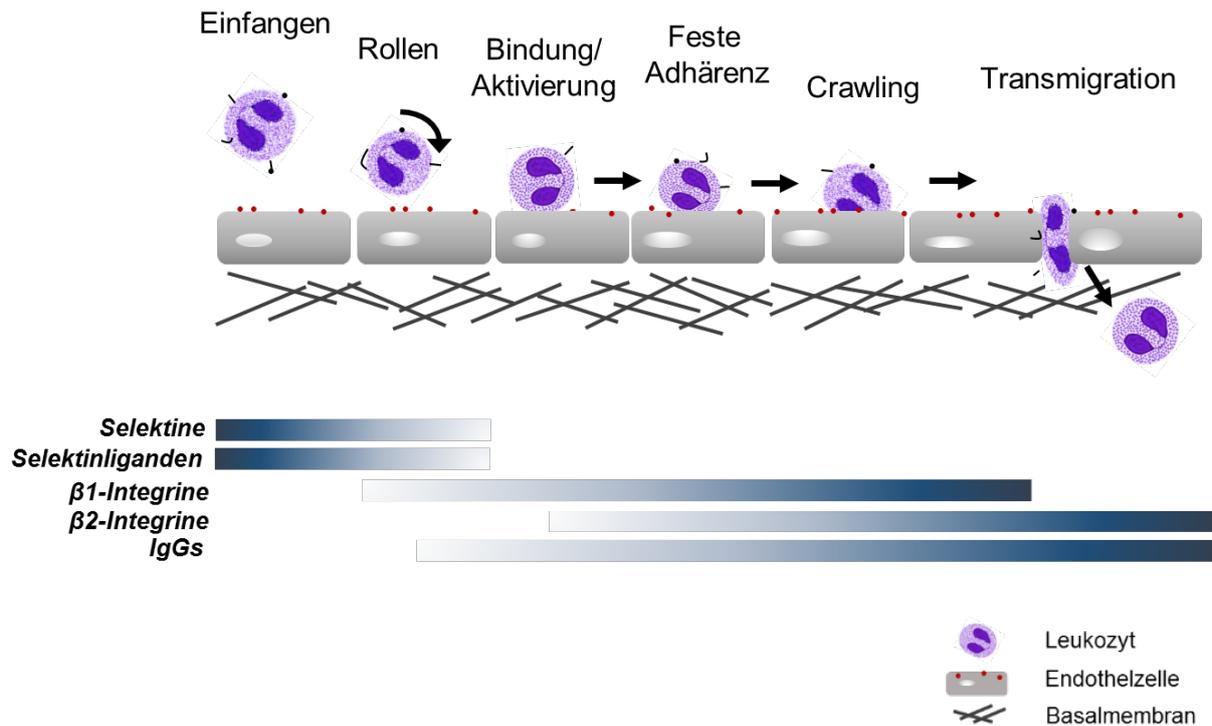


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Rekrutierung von Leukozyten aus der Blutbahn in entzündetes Gewebe und der daran beteiligten Moleküle: Zunächst werden zirkulierende Leukozyten „eingefangen“ und rollen auf dem Endothel, was durch die Interaktionen von Selektinen und deren Liganden vermittelt wird. Anschließend binden Leukozyten unter Beteiligung von Integrinen und Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie an die Endothelzellen, wodurch sie aktiviert werden. Dadurch wird die Adhärenz gefestigt und die Leukozyten beginnen am Gefäßendothel entlang zu „kriechen“, bis sie schließlich in das entzündete Gewebe transmigrieren.

Durch Interaktionen von Selektinen mit deren Interaktionspartnern (siehe Kapitel 1.3.2) werden die frei im Blutstrom zirkulierenden Leukozyten abgefangen und bilden zunächst temporäre Kontakte mit dem Gefäßendothel der postkapillären Venolen. Dieser Prozess des intravaskulären Rollens kommt dadurch zustande, dass Leukozyten wiederholt an Endothelzellen entlang des Gefäßes binden und sich nach kurzer Zeit wieder ablösen. Dabei

wurden sog. „Slings“ der rollenden Leukozyten identifiziert, welche durch die Rollbewegung unter hoher Schubspannung entstehen, sich um die Leukozyten wickeln und dadurch die Drehbewegung der Immunzellen abbremsen^{102, 103}. Daran beteiligt sind, neben Selektinen und deren Liganden, auch das β 2-Integrin LFA-1/CD11a oder das β 1-Integrin *very late antigen-4* (VLA-4/CD49d) in der Konformation niedriger Affinität^{104, 105}. In der Folge verlangsamten die Leukozyten ihre Rollbewegung bis sie schließlich fest an den Endothelzellen der postkapillären Venolen adhärieren. Dieser Schritt sowie die nachfolgenden Vorgänge der Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe werden vor allem über Interaktionen von leukozytären Integrinen mit den endothelial exprimierten Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie, wie *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1/CD54), *intercellular adhesion molecule-2* (ICAM-2/CD102), *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM-1/CD106), *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1/CD31), *junctional adhesion molecule A* (JAM-A), *junctional adhesion molecule C* (JAM-C) vermittelt (siehe Kapitel 1.3.3). Dabei führt ein Großteil der fest adhärenen Leukozyten sog. „Crawlingbewegungen“ aus, was das Kriechen der Leukozyten entlang des Gefäßendothels zu für die Transmigration geeigneten Stellen beschreibt^{99, 100, 101, 106}. Anschließend transmigrieren Leukozyten über den para- oder transzellulären Weg aus den postkapillären Venolen in extravaskuläres Gewebe, was vor allem durch das Zusammenspiel von leukozytär und endothelial exprimierten Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie ermöglicht wird. Abhängig vom Gewebe benutzen etwa 70 – 90 % der Leukozyten den parazellulären Weg, wobei Endothelzellverbindungen geöffnet werden müssen. Dies wird durch die Dissoziation von *vascular endothelial-cadherin* (VE-Cadherin)-Molekülen, welche benachbarte Endothelzellen über homophile Interaktionen miteinander verbinden, initiiert¹⁰⁷. Um die Gefäßwand zu überqueren und an den Ort Entzündung zu gelangen, müssen die Leukozyten die Endothelzellen und die Basalmembran aus extrazellulären Matrixproteinen, wie Kollagen IV oder Laminin (welche über die Glykoproteine Nidogen und Perlecan miteinander vernetzt sind), durchdringen¹⁰⁸. Dieser Prozess ist mit 20 - 45 Minuten der zeitintensivste Vorgang. Auch hier wurden spezifische Migrationsbewegungen, welche als

„abluminales Crawling“ der Leukozyten bezeichnet werden, beschrieben. Diese Vorgänge entlang der abluminalen Seite des Gefäßes werden von Integrinen und Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie kontrolliert ¹⁰⁰. Darüber hinaus dienen Perizyten, welche zwischen den Endothelzellen der mikrovaskulären Gefäße und dem interstitiellen Gewebe lokalisiert sind ^{109, 110}, als Wegweiser für transmigrierte Leukozyten. Unter inflammatorischen Bedingungen exprimieren sie vermehrt Adhäsionsmoleküle, wie ICAM-1/CD54 oder VCAM-1/CD106, und setzen chemotaktisch wirkende Moleküle, wie *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), frei ^{111, 112, 113}. Im extravaskulären Gewebe angekommen, migrieren die Leukozyten im Interstitium entlang eines Chemokingradienten zu den Orten der eingedrungenen Pathogene oder Gewebeschäden, wo sie schließlich ihre Effektorfunktionen erfüllen ^{114, 115}.

1.3.2 Selektine und Interaktionspartner

Selektine und ihre Hauptinteraktionspartner PSGL-1/CD162 und CD44 sind vor allem am Rollen, dem ersten Schritt der Extravasation von Leukozyten in entzündetes Gewebe, beteiligt. E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P und L-Selektin/CD62L gehören zur Klasse der Ca^{2+} -abhängigen Lektine, welche aus einer N-terminalen Karbohydrat-Domäne, einem transmembranären Teil sowie einem zytoplasmatischen Rest bestehen. In ihrer Aminosäuresequenz sowie ihren Interaktionspartnern unterscheiden sich diese Adhäsionsmoleküle. P-Selektin/CD62P wird in α -Granula von Thrombozyten und in sog. Weibel-Palade-Körperchen von Leukozyten gespeichert. Nach Aktivierung dieser Zellen wird P-Selektin/CD62P an deren Oberfläche transloziert, wo es mit PSGL-1/CD162 auf Leukozyten interagiert. E-Selektin/CD62E wird *de novo* von entzündeten Endothelzellen synthetisiert, was durch Entzündungsmediatoren, wie z. B. TNF, ausgelöst wird. Nachdem dieses Molekül auf die Oberfläche der Endothelzellen transportiert wurde, bindet es die von Leukozyten exprimierten Liganden PSGL-1/CD162, CD44 oder *E-selectin ligand-1* (ESL-1).

L-Selektin/CD62L ist das einzige leukozytäre Selektin. Es wird auf diesen Zellen konstitutiv exprimiert und interagiert mit verschiedenen Molekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen, wie beispielsweise CD34, *glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1* (GlyCAM-1) oder Podocalyxin. Über die Bindung von leukozytärem PSGL-1/CD162 mit L-Selektin/CD62L können Leukozyten zudem Kontakte untereinander herstellen ^{102, 116} (**vgl. Abb. 1.8**). Dieser Vorgang, bei dem am Gefäßendothel adhärenente Leukozyten weitere Leukozyten aus dem Blutstrom abfangen, wird als „secondary tethering“ bezeichnet ^{117, 118}. Nach Aktivierung von Zellen mit inflammatorischen Stimuli, wie z. B. Phorbol ester oder Leukotrien B₄, wird L-Selektin/CD62L von der Zelloberfläche abgespalten. Dieser Vorgang ist auch als „shedding“ bekannt und führt zu einer verringerten Migration der Leukozyten in entzündetes Gewebe ^{119, 120, 121}.

Die Adhäsion von Leukozyten wird durch die Bindung von unterschiedlichen Molekülen an den N-terminalen extrazellulären Teil der Selektine vermittelt ¹¹⁶. PSGL-1/CD162 ist der wichtigste Selektinligand und interagiert vor allem mit P-Selektin/CD62P, aber auch mit E-Selektin/CD62E, L-Selektin/CD62L oder Chemokinen. Dieses membranständige Protein ist an der Spitze von Mikrovilli lokalisiert und wird von Leukozyten und aktivierten Endothelzellen exprimiert ^{116, 122, 123, 124, 125, 126, 127}. CD44 ist ein Transmembranprotein, welches von einer Vielzahl von Zellen, wie hämatopoetischen Stammzellen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten sowie Endothelzellen, exprimiert wird. Neben E-Selektin/CD62E bindet dieser Selektinligand auch an extrazelluläre Matrixproteine, wie Hyaluron, Kollagen, Laminin, Fibronectin und GAGs ^{128, 129}.

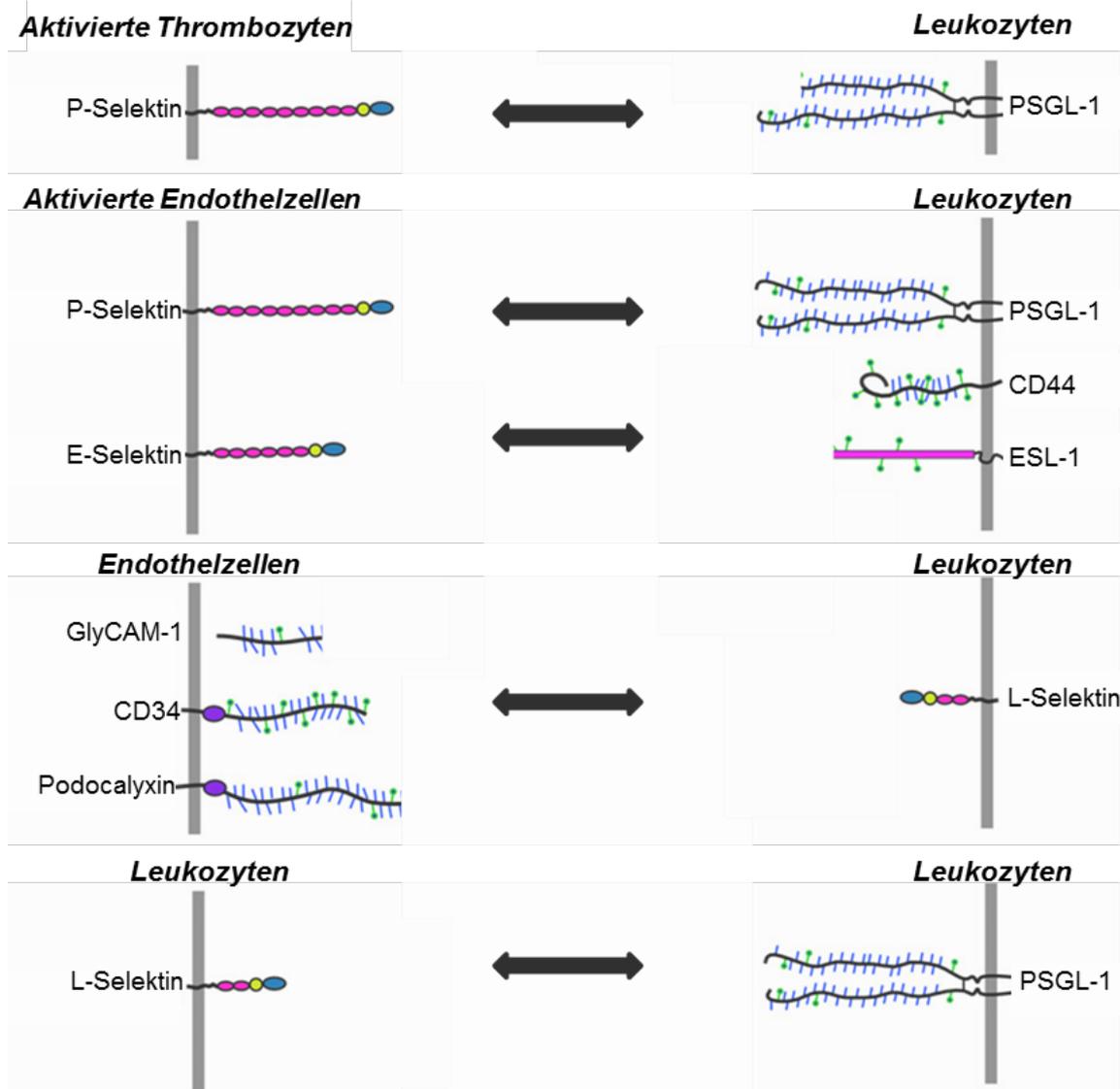


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Interaktionen von P-Selektin/CD62P, E-Selektin/CD62E und L-Selektin/CD62L mit ihren Hauptinteraktionspartnern (modifiziert nach ¹⁰²).

Zusätzlich zu ihrer Funktion als Adhäsionsmoleküle dienen Selektine auch als Signalmoleküle, welche über die Interaktion mit ihren Liganden intrazelluläre Signalwege aktivieren (vgl. **Abb. 1.9**). Dabei werden über sog. „inside-out-signaling“ Konformationsänderungen von membranständigen Molekülen, wie z. B. leukozytären Integrinen, ausgelöst ^{102, 116}. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene intrazelluläre Signalwege beschrieben: Durch die Interaktion von P- oder E-Selektin mit dem Liganden PSGL-1/CD162 auf der Oberfläche von Leukozyten bzw. durch Interaktion von E-Selektin/CD62E mit seinem Liganden CD44 auf Leukozyten werden die Kinasen der Src-

Familie Fgr, Hck und Lyn aktiviert. Dies führt zur *spleen tyrosine kinase* (Syk)-vermittelten Aktivierung der *Bruton's tyrosine kinase* (Btk)^{130, 131}. In der Folge kommt es zur Aktivierung der Phospholipase-gamma-2 (PLC γ 2), von *calcium-diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor 1* (CalDAG-GEFI) und schließlich von *Ras-proximate-1/Ras-related protein 1* (Rap1). Dadurch wird eine Konformationsänderung des membranständigen Integrins LFA-1/CD11a zur sog. „extended“ Konformation ausgelöst, welche das langsame Rollen von Leukozyten vermittelt¹³². Ebenso wurde gezeigt, dass die Bindung von E-Selektin/CD62E an leukozytäres ESL-1 eine Aktivierung des Integrins *macrophage-1 antigen* (Mac-1/CD11b) hervorruft, wobei der genaue intrazelluläre Signalweg weitestgehend unbekannt ist¹³³.

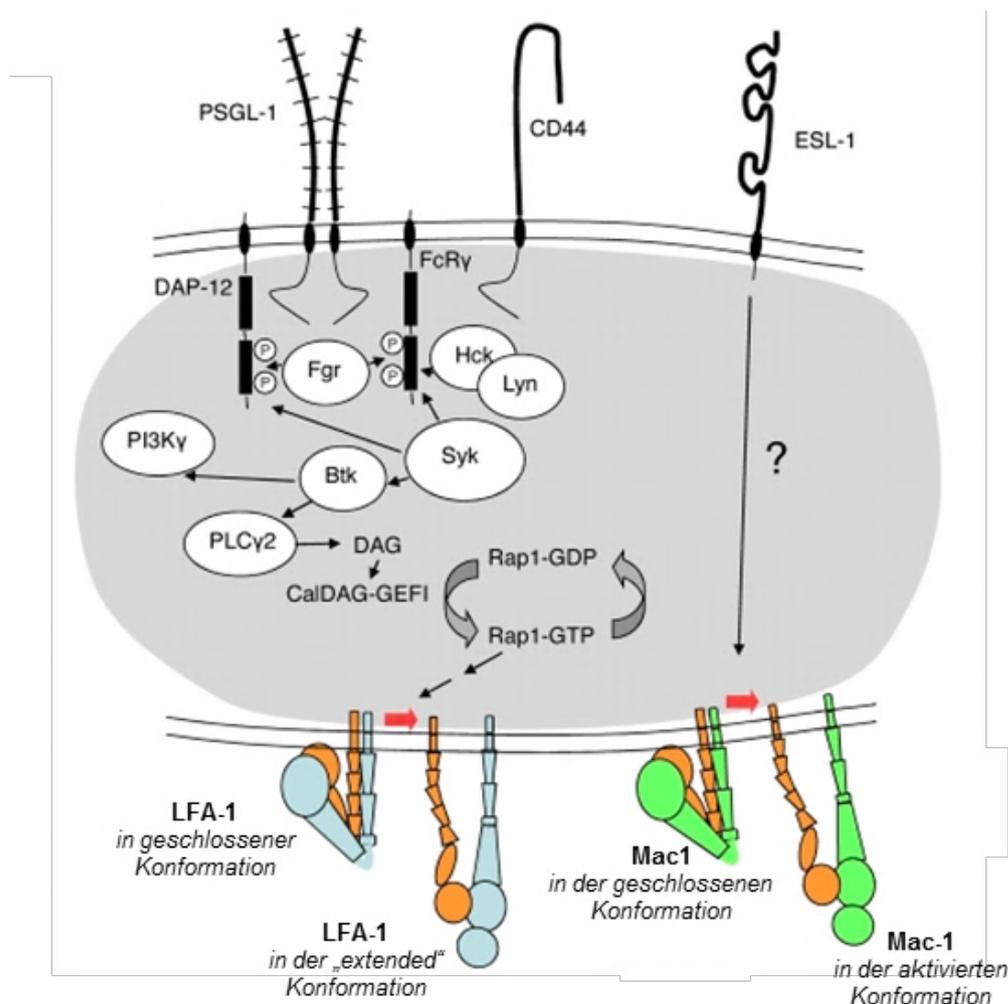


Abb. 1.9: Darstellung der intrazellulären Signalwege, welche durch die Bindung von Selektinliganden an Selektine ausgelöst werden. Die Selektininteraktionspartner PSGL-1/CD162 und CD44 sind an intrazelluläre Kinasen gekoppelt und lösen die Konformationsänderung des Integrins LFA-1/CD11a aus. Der Selektinligand ESL-1 wird für die Aktivierung des Integrins Mac-1/CD11b verantwortlich gemacht (modifiziert nach¹¹⁶).

1.3.3 Integrine und Interaktionspartner

Während die temporären Interaktionen von Selektinen mit ihren Liganden nicht ausreichen, um die Leukozyten fest an das Gefäßendothel zu binden, vermitteln Integrine auf der Oberfläche von Leukozyten stabilere Kontakte zu Endothelzellen. Dadurch beteiligen sich diese Oberflächenmoleküle am langsamen Rollen, an der festen Adhärenz, am intraluminalen Crawling, an der transendothelialen Migration, am abluminalen Crawling sowie an der interstitiellen Migration der Leukozyten während ihrer Rekrutierung im akuten Entzündungsgeschehen^{99, 100, 101}.

Integrine sind Heterodimere aus nicht-kovalent gebundenen transmembranären Glykoproteinen, den α - und β -Untereinheiten. Die jeweils 18 unterschiedlichen Untereinheiten bestehen aus einer großen extrazellulären Domäne, einer transmembranären Domäne und einem kurzen zytoplasmatischen Rest, über welchen die Integrine an intrazelluläre Signalmoleküle gekoppelt sind^{134, 135}. Auf der Oberfläche von Leukozyten myeloiden Ursprungs sind vor allem die Integrine LFA-1/CD11a, bestehend aus den Untereinheiten α L und β 2, Mac-1/CD11b, bestehend aus den Untereinheiten α M und β 2, sowie das β 1-Integrin VLA-4/CD49d, bestehend aus den Untereinheiten α 4 und β 1, exprimiert. Monozyten sind sowohl mit β 1- als auch β 2-Integrinen ausgestattet, während neutrophile Granulozyten hauptsächlich β 2-Integrine exprimieren^{134, 136}.

Die Struktur der Integrine kann unterschiedliche Konformationen einnehmen und spiegelt damit den Aktivierungszustand der Leukozyten wider (**vgl. Abb. 1.10**): Die geschlossene Konformation, welche für Zellen im unaktivierten Zustand beschrieben wurde, die intermediäre Konformation, welche vor allem für das langsame Rollen von Leukozyten eine Rolle spielt und die offene Form, bei welcher die α - und β -Untereinheit räumlich am weitesten voneinander getrennt sind. Diese letztere Konformation mit der höchsten Affinität für Liganden kann durch Chemokin-vermittelte Aktivierung der Leukozyten entstehen¹³⁵. Nach Interaktion von Chemokinen mit GPCRs auf der Oberfläche von Leukozyten werden

intrazelluläre Signalwege aktiviert ¹³⁷, welche unter Beteiligung der GTPasen *Ras homolog gene family member A* (RhoA), Rap1 und *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) zur Aktinpolymerisation führen ¹³⁸. Da die Aktinfilamente über die Proteine Talin und Kindlin an den zytoplasmatischen Rest der β 2-Untereinheit gebunden sind, wird schließlich eine Konformationsänderung der β 2-Untereinheit des Integrins zu einer offenen Struktur ausgelöst. In diesem Zustand können Leukozyten mit ihren Liganden auf den Endothelzellen interagieren, was für die feste Adhärenz, das intraluminale Crawling sowie die nachfolgende Transmigration der Leukozyten in das entzündete Gewebe verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu verursacht die Interaktion von P-Selektin/CD62P oder E-Selektin/CD62E mit dem Liganden PSGL-1/CD162 auf Leukozyten die Konformationsänderung von β 2-Integrinen zur „extended“ Struktur, welche insbesondere das langsame Rollen dieser Immunzellen am Gefäßendothel vermittelt ¹³⁹. An diesem intrazellulären Signalweg beteiligt sind Src-Kinasen, die Adapterproteine DAP12/FcR γ und Syk sowie das einerseits an die β 2-Untereinheit ^{140, 141, 142}, andererseits an Aktin gekoppelte α -Aktinin ¹⁴³. Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind allerdings weitestgehend unbekannt ¹⁰².

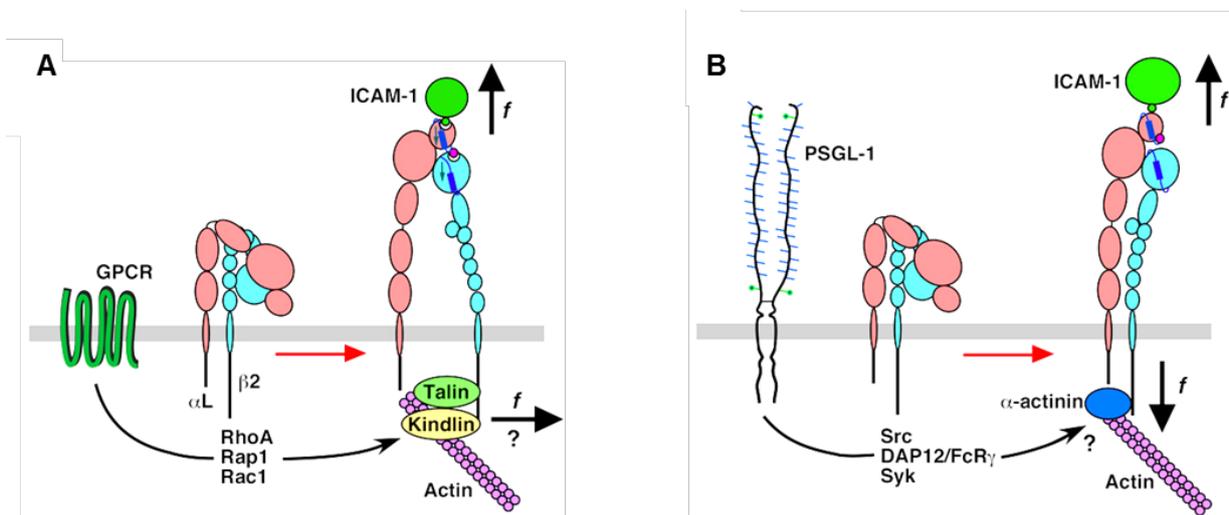


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der Chemokin-vermittelten Konformationsänderung von β 2-Integrinen in die aktivierte Form (A) bzw. der Selektinligand-vermittelten Konformationsänderung in die intermediären Form (B; modifiziert nach ¹⁰²).

Für die von Leukozyten myeloiden Ursprungs exprimierte Integrine wurden folgende Interaktionsmöglichkeiten beschrieben^{99, 100, 101} (vgl. **Abb. 1.11**): Das β 2-Integrin LFA-1/CD11a interagiert mit ICAM-1/CD54 und ICAM-2/CD102, welche konstitutiv von Endothelzellen exprimiert werden. Neben dem langsamen Rollen, der festen Adhärenz und der transendothelialen Transmigration von Leukozyten in entzündetes Gewebe kontrolliert dieses Integrin das intraluminale Crawling von Monozyten unter unstimulierten Bedingungen¹⁴⁴. Zudem bindet es an das Molekül JAM-A, welches zur Gruppe der *junctional adhesion molecules* (JAMs) gehört und unterschiedliche Vorgänge während der Angiogenese, Atherogenese, bei ischämischen Ereignissen oder vaskulären Erkrankungen reguliert. Dieses Protein wird von Endothelzellen, aber auch von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Thrombozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen exprimiert und geht auch homophile Bindungen ein¹⁴⁵. Für das β 2-Integrin Mac-1/CD11b wurden Interaktionen mit ICAM-1/CD54 und ICAM-2/CD102 beschrieben. Dadurch werden vor allem die feste Adhärenz, das lumenale Crawling von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten¹⁴⁴, die Transmigration sowie das abluminale Crawling vermittelt. Das β 1-Integrin VLA-4/CD49d dient als Ligand des Immunglobulins VCAM-1/CD106, welches von Endothelzellen in der Mikrovaskulatur exprimiert wird. Diese Interaktion reguliert das langsame Rollen sowie die feste Adhärenz von Leukozyten während ihrer Rekrutierung in entzündetes Gewebe¹⁴⁶. Am Schritt der Transmigration von Leukozyten beteiligt sich außerdem das Adhäsionsmolekül PECAM-1/CD31, welches homophile Interaktionen bildet. Während es nur in geringem Maß von Leukozyten oder Thrombozyten exprimiert wird, ist es dagegen sehr stark auf Endothelzellen zu finden und hauptsächlich an Endothelzellkontakten lokalisiert¹⁴⁷.

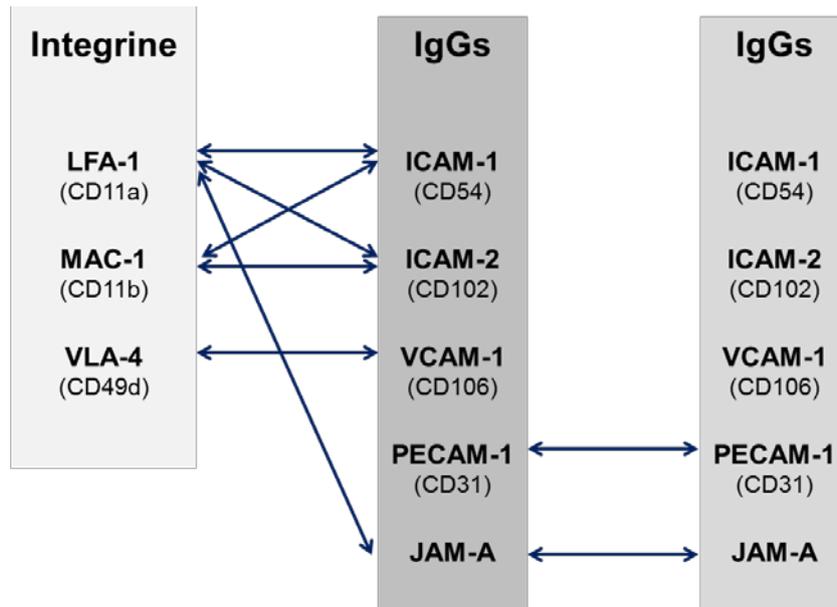


Abb. 1.11: Schematische Darstellung der wichtigsten Interaktionsmöglichkeiten von β 1- und β 2-Integrinen mit Mitgliedern der Immunglobulin(IgG)-Superfamilie.

Für den Schritt der Transmigration von Leukozyten wurden Ringstrukturen, welche auch als „transmigratory cups“ bezeichnet werden und vor allem aus ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 bestehen, identifiziert ¹⁴⁸. Die Interaktion von Integrinen der adhärennten Leukozyten mit endothelialelem ICAM-1/CD54 löst zunächst über das sog. „outside-in-signaling“ die Dissoziation von endothelialelem VE-cadherin, welches über homophile Interaktionen benachbarte Endothelzellen miteinander verbindet, aus. Dadurch werden Endothelzellverbindungen geöffnet und die parazelluläre Transmigration der Leukozyten ermöglicht ¹⁴⁹, ¹⁵⁰. Neben JAM-A, PECAM-1/CD31, ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 wurden eine Vielzahl weiterer Moleküle identifiziert, welche von Endothelzellen exprimiert werden und unterschiedliche Funktionen in der Rekrutierung von Leukozyten erfüllen: JAM-C ¹⁴⁵, Claudin-5, *endothelial-specific adhesion molecule* (ESAM) oder CD99. Diese Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sind ebenfalls an der Transmigration von Leukozyten in entzündetes Gewebe beteiligt ¹⁵¹.

2. Zielsetzung

Während die grundlegenden Prinzipien der Extravasation von Leukozyten in den letzten Jahrzehnten weitgehend aufgeschlüsselt wurden, sind die Mechanismen, welche die einzelnen Schritte der Rekrutierungskaskade von unterschiedlichen Leukozyten-subpopulationen regulieren, größtenteils unbekannt.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war deshalb, die Funktionen von Selektinen, Integrinen und den Hauptinteraktionspartnern dieser Moleküle für die intravaskulären Schritte des Rekrutierungsprozesses von **neutrophilen Granulozyten** und **inflammatorischen Monozyten** zu untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1 Reagenzien

Die Leukozytenrekrutierung wurde durch rekombinantes murines CCL2 (R&D Systems, Nordenstadt, Deutschland) induziert, wovon 0,45 µg gelöst in 600 µl *phosphate buffered saline* (PBS) intraperitoneal (i. p.) bzw. 0,3 µg gelöst in 400 µl PBS intraskrotal (i. s.) appliziert wurden. Für die Depletion von neutrophilen Granulozyten wurde ein monoklonaler anti-Ly6G Antikörper (Klon 1A8; 150 µg intravenös (i. v.), 24 und 6 Stunden vor Applikation des Stimulus; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) verwendet. Die Depletion von Thrombozyten wurde mit einem monoklonalen anti-GPIIb Antikörper (CD42b; Klon Xia.B2; 50 µg i. v., 24 und 6 Stunden vor Applikation des Stimulus; emfret Analytics, Eibelstadt, Deutschland) durchgeführt. Folgende blockierende monoklonale Antikörper wurden zur Analyse der Migration von Leukozyten eingesetzt: monoklonaler anti-CD62E Antikörper (Klon 10E9.6; 50 µg gelöst in 100 µl PBS intraarteriell (i. a.) oder i. v.; BD Biosciences), monoklonaler anti-CD62P Antikörper (Klon RB40.34; 50 µg gelöst in 100 µl PBS i. a. oder i. v.; BD Biosciences), monoklonaler anti-CD62L Antikörper (Klon MEL-14; 50 µg gelöst in 100 µl PBS i. a. oder i. v.; Biolegend, San Diego, CA, USA), monoklonaler anti-CD44 Antikörper (Klon IM7; 50 µg gelöst in 100 µl PBS i. a. oder i. v.; Biolegend), monoklonaler anti-CD162 Antikörper (Klon 4RA10; 50 µg gelöst in 100 µl PBS i. a. oder i. v.; BD Biosciences), monoklonaler anti-CD11a Antikörper (Klon M17/4; 50 µg gelöst in 100 µl PBS i. a. oder i. v.; Biolegend), monoklonaler anti-CD11b Antikörper (Klon M1/70; 50 µg gelöst in 100 µl PBS i. a. oder i. v.; Biolegend), monoklonaler anti-CD49d Antikörper (Klon R1-2; 50 µg gelöst in 100 µl PBS i. a. oder i. v.; Biolegend), monoklonaler anti-CD54 Antikörper (Klon YN1/1.7.4; 50 µg gelöst in 100 µl PBS i. a. oder i. v.; Biolegend), monoklonaler anti-CD102 Antikörper (Klon 3C4; 50 µg gelöst in 100 µl PBS i. a. oder i. v.; Biolegend), monoklonaler anti-CD106

Antikörper (Klon 425; 50 µg gelöst in 100 µl PBS i. a. oder i. v.; Biolegend), monoklonaler anti-CD31 Antikörper (Klon MEC 13.3; 50 µg gelöst in 100 µl PBS i. a. oder i. v.; BD Biosciences), monoklonaler anti-JAM-A Antikörper (Klon BV-11; 50 µg gelöst in 100 µl PBS i. a. oder i. v.; generiert von Dejana E. et al. ¹⁵²).

3.2 *In-vivo*-Experimente

3.2.1 Vorbemerkungen

Die folgenden Untersuchungen wurden in der Zeit von Oktober 2011 bis September 2014 mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (AZ 55.2-1-54-2531.84/09 und 55.2-1-54-2532-115-12) im Rahmen einer Kooperation der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

3.2.2 Versuchstiere

Die Experimente wurden mit Mäusen unterschiedlicher Zuchtlinien durchgeführt. Für die Versuche im Peritonitismodell, für die Untersuchung der Expression unterschiedlicher Adhäsionsmoleküle und deren Liganden auf Leukozyten und Endothelzellen sowie für die Analyse der Interaktionsorte von neutrophilen Granulozyten mit dem Gefäßendothel im Kremastermodell wurden männliche Wildtyp (WT)-Mäuse der Linie C57BL/6N (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Zur Untersuchung der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und residenten/inflammatorischen Monozyten im Kremaster-

modell wurden männliche heterozygote $Cx_3CR-1^{GFP/+}$ -Mäuse verwendet, welche wie kürzlich beschrieben generiert und über 6 bis 10 Generationen auf den Hintergrund von C57BL/6N-Mäusen zurückgekreuzt wurden¹⁵³. Bei diesen Tieren wurde ein Allel des Chemokinrezeptors CX_3CR-1 durch *green fluorescent protein* (GFP) ersetzt, wodurch unterschiedliche Zelltypen je nach Expressionsniveau von CX_3CR-1 sichtbar gemacht werden konnten.

Die Versuchstiere waren 8 bis 12 Wochen alt, 20 bis 30 g schwer und wurden in der Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München in Käfigen zu je 3 Tieren gehalten. Dabei wurde der Tag-Nachtrhythmus eingehalten und freier Zugang zu Standardfutter (ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Wasser gewährleistet.

3.2.3 Narkose

Vor Experimenten im Kremastermodell sowie vor der Blutabnahme über die *Vena cava* (*V. cava*) wurde die Narkose der Versuchstiere mit einer Kurznarkose zusammengesetzt aus Isofluran (5,0 Vol.%; Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und Stickstoffdioxid (N_2O) bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0,35 eingeleitet. Dann wurde eine Mischung aus Ketamin (100 mg / kg Körpergewicht (KG); Ketavet, Pfizer, Berlin, Deutschland), Xylazin (10 mg / kg KG; Rompun 2 %, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und Kochsalzlösung im Verhältnis 2,5 : 0,5 : 7 durch i. p. Injektion appliziert. Nach Bedarf wurde diese Mischung mehrmals i. p. injiziert, um die Narkose während des Experiments aufrecht zu erhalten. Mit Hilfe von Heizplatten und -strahlern wurde die Körpertemperatur der narkotisierten Versuchstiere über die gesamte Versuchsdauer konstant gehalten.

Bei Versuchen im Peritonitismodell sowie zur i. s. Stimulation der Versuchstiere wurde ausschließlich die Kurznarkose aus Isofluran und N_2O eingesetzt (siehe oben).

3.2.4 Peritonitismodell

3.2.4.1 Versuchsdurchführung

Der Einfluss von Selektinen, Selektinliganden, Integrinen, Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten auf die Rekrutierung von unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen wurde im Peritonitismodell in WT-Tieren untersucht. Selektine, Integrine und deren Interaktionspartner wurden durch i. v. Applikation (vgl. Kapitel 3.2.4.3) von monoklonalen Antikörper blockiert. Im Anschluss daran wurden der Stimulus CCL2 bzw. PBS i. p. verabreicht (vgl. Kapitel 3.2.4.2). Danach wurden die Versuchstiere in Einzelkäfigen gehalten, in welchen sie bis zur Durchführung der Peritoneallavage freien Zugang zu Wasser sowie Standardfutter (ssniff Spezialdiäten) hatten.

Sechs Stunden nach Applikation des Stimulus wurde eine Kurznarkose eingeleitet (vgl. Kapitel 3.2.3) und das Versuchstier durch Genickbruch getötet. Das Versuchstier wurde auf einer Plattform fixiert und desinfiziert (Bacilol; BODE Chemie, Hamburg, Deutschland). Mithilfe einer feinen Kanüle (30 G; 100 Sterican; B. Braun, Melsungen, Deutschland) wurden 10 ml eiskaltes PBS in die Peritonealhöhle injiziert. Anschließend wurde mittels einer Butterfly-Kanüle, die zuvor injizierte Flüssigkeit mit den in die Peritonealhöhle eingewanderten Leukozyten in einem Falcon-Tube (15 ml; BD Falcon Tube; BD Biosciences) aufgefangen. Die Peritonealhöhle wurde mit 5 ml eiskaltem PBS nachgespült. Die Flüssigkeit mit den darin befindlichen Zellen wurde bei 940 g und 25°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Rückstand ad 500 µl PBS gelöst. 50 µl der Zellsuspension wurden für die Messung der gesamten Leukozytenzahl (vgl. Kapitel 3.3.1) und damit für die Konzentrationsberechnung der peritonealen Leukozyten verwendet, 200 µl der Suspension wurden für die durchflusszytometrische Detektion der Leukozytensubpopulationen eingesetzt (vgl. Kapitel 3.3.2.1).

3.2.4.2 Induktion einer Peritonitis durch intraperitoneale Injektion

Zur Durchführung der i. p. Applikation des Stimulus CCL2 bzw. PBS wurde eine Kurznarkose, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, angewandt. Die Versuchstiere wurden auf einer beheizbaren Plattform fixiert. Die Injektion erfolgte mit einer feinen Kanüle (30 G; B. Braun). Anschließend wurden die Versuchstiere in Einzelkäfigen gehalten, in welchen sie bis zur Durchführung der Peritoneallavage freien Zugang zu Wasser sowie Standardfutter (ssniff Spezialdiäten) hatten.

3.2.4.3 Intravenöse Applikation von monoklonalen Antikörpern

Die monoklonalen Antikörper zur Blockade von Selektinen, Integrinen und deren Liganden wurden über i. v. Injektion in die Schwanzvene appliziert. Vor Durchführung wurde eine Kurznarkose, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, eingeleitet. Die Versuchstiere wurden auf einer beheizbaren Plattform fixiert. Danach wurde der Schwanz des Tieres desinfiziert, das Blut durch Abklemmen des Schwanzes gestaut und die Schwanzvene mit Hilfe einer 30 G Nadel (B. Braun) und eines Polypropylenkatheters (Innendurchmesser 0,28 mm, Portex, Lythe, Großbritannien) kanüliert. Nach Injektion der zu applizierenden Substanzen wurde der Katheter wieder entfernt und die Blutung mit einer Kompresse zu Sistieren gebracht.

3.2.4.4 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden nach dem Zufallsprinzip folgenden Gruppen zugeordnet: WT-Tiere wurden durch i. p. Applikation des murinen rekombinanten CCL2 stimuliert und erhielten

zusätzlich eine i. v. Injektion von monoklonalen Antikörpern gegen E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P, L-Selektin/CD62L, CD44, PSGL-1/CD162, LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b, VLA-4/CD49d, ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31, JAM-A oder eines Isotyp-Antikörpers. In weiteren in WT-Tieren durchgeführten Experimenten wurden neutrophile Granulozyten mit Hilfe eines monoklonalen anti-Ly6G Antikörpers bzw. Thrombozyten mit Hilfe eines monoklonalen anti-GPIIb/CD42b Antikörpers depletiert und das Protein CCL2 i. p. appliziert. Für Kontrollexperimente wurde den WT-Tieren PBS i. p. verabreicht (n=7).

3.2.4.5 Versuchsprotokolle

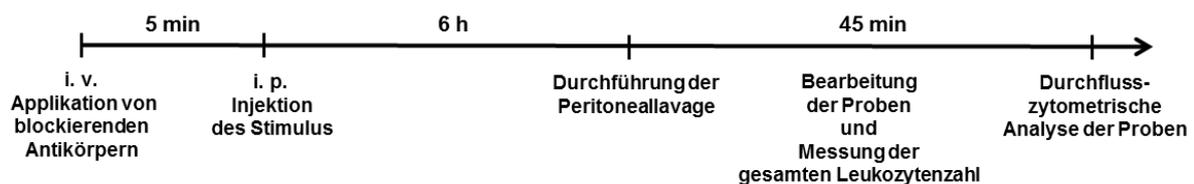


Abb. 3.1: Versuchsprotokoll zur Analyse des Einflusses von Selektinen, Integrinen und deren Liganden auf die Rekrutierung unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen im Peritonitismodell.

Zur Analyse des Einflusses von Selektinen, Selektinliganden, Integrinen und Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie wurden zunächst monoklonale Antikörper gegen E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P, L-Selektin/CD62L, CD44, PSGL-1/CD162, , LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b, VLA-4/CD49d, ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31, JAM-A oder der entsprechende Isotyp-Antikörper i. v. appliziert (vgl. Kapitel 3.2.4.3). Fünf Minuten später wurde der inflammatorische Stimulus CCL2 i. p. injiziert (vgl. Kapitel 3.2.4.2). Nach 6 Stunden wurde die Peritoneallavage durchgeführt (vgl. Kapitel 3.2.4.1), die Gesamtzahl peritonealer Leukozyten gemessen (vgl. Kapitel 3.3.1) und die gewonnenen Proben bis zur durchflusszytometrischen Messung (vgl. Kapitel 3.3.2.1) weiterverarbeitet (vgl. **Abb. 3.1**).

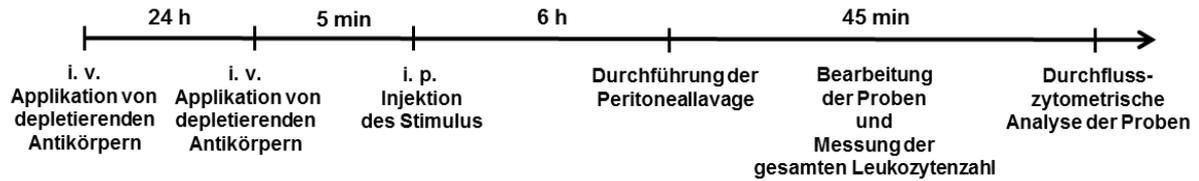


Abb. 3.2: Versuchsprotokoll zur Analyse des Einflusses von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten auf die Rekrutierung unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen im Peritonitismodell.

Um den Einfluss von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten auf die Rekrutierung unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen zu charakterisieren, wurden der Isotyp-Antikörper, der monoklonale anti-Ly6G Antikörper oder der monoklonale anti-CD42b Antikörper WT-Tieren zweimal im Abstand von 24 Stunden i. v. appliziert und anschließend wie in den Experimenten mit Blockade von Selektinen, Integrinen oder deren Liganden (siehe oben) verfahren (vgl. **Abb. 3.2**).

3.2.5 Kremastermodell

3.2.5.1 Chirurgische Präparation des Kremastermuskels

Zur Analyse der einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung wurde das Kremastermodell in CX₃CR-1^{GFP/+}-Mäusen bzw. in WT-Mäusen eingesetzt. Die Einleitung der Narkose erfolgte wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Die Versuchstiere wurden auf einer beheizbaren Plattform fixiert. Zunächst wurde ein Katheter in die *Arteria femoralis* (*A. femoralis*; vgl. Kapitel 3.2.5.3) gelegt.

Die Durchführung der chirurgischen Präparation des *Musculus cremaster* (*M. cremaster*) erfolgte unter Verwendung eines Operationsmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland, 5 – 42-fache Vergrößerung) mit kleineren Modifikationen nach der Erstbeschreibung von Baez¹⁵⁴.

Das Skrotum wurde ventral inzidiert und das Bindegewebe vom Hoden entfernt, wodurch der rechte Hoden für die Präparation des Muskels freigelegt wurde. Nach Elektrokoagulation mittels einer bipolaren Pinzette wurde der Kremastermuskel vorsichtig ventral eröffnet und über einem transparenten Podest auf einer spezialangefertigten Bühne aufgespannt. Danach wurden Nebenhoden und Hoden durch Elektrokoagulation mit der bipolaren Pinzette vom *M. cremaster* getrennt und zurück in die Bauchhöhle geschoben. Dadurch wurde der *M. cremaster* optimal für die Intravitalmikroskopie (IVM) zugänglich. Der Kremastermuskel wurde während der gesamten chirurgischen Präparation sowie während der nachfolgenden intravitalmikroskopischen Aufnahmen mit einer etwa 37°C warmen PBS-Lösung superfundiert. Nach Beendigung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurde das Tier durch Entbluten über die *V. cava* (vgl. Kapitel 3.2.5.4) und Genickbruch getötet.

3.2.5.2 Stimulation des *M. cremaster* durch intraskrotale Injektion

Während der intraskrotalen Injektion von CCL2 bzw. PBS wurde das Versuchstier mit einer Kurznarkose (vgl. Kapitel 3.2.3) anästhesiert und auf einer Wärmeplatte fixiert. Die intraskrotale Applikation der entsprechenden Substanz wurde mit einer feinen Kanüle (30 G) durchgeführt. Anschließend wurden die Versuchstiere in Einzelkäfigen gehalten, in welchen sie bis zur Durchführung der chirurgischen Präparation des Kremastermuskels freien Zugang zu Wasser sowie Standardfutter (ssniff Spezialdiäten) hatten.

3.2.5.3 Intraarterielle Applikation von monoklonalen Antikörpern und Reagenzien

Sowohl monoklonale Antikörper zur Blockade von Oberflächenrezeptoren und deren Liganden als auch fluoreszierende Reagenzien, wie z. B. Antikörper zur Visualisierung des Endothels oder Mikropartikel zur Messung der Blutflussgeschwindigkeit, wurden über Injektion in die *Arteria femoralis* (*A. femoralis*) appliziert. Zur Durchführung der Präparation wurde ein Operationsmikroskop (Leitz) verwendet. Die Einleitung der Narkose erfolgte wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Die Versuchstiere wurden auf einer beheizbaren Plattform fixiert. Danach wurde die Haut über der linken Leistenregion der Maus eröffnet, die linke *A. femoralis* aus der Gefäß-Nerven-Scheide des linken Beines präpariert und retrograd mit einem Polypropylenkatheter (Innendurchmesser 0,28 mm, Portex) kanüliert. Vor der chirurgischen Präparation des *M. cremaster* wurde der Katheter mittels zweier Ligaturen fixiert. Anschließend wurde die Wunde fortlaufend vernäht.

3.2.5.4 Blutentnahme über die *V. cava*

Unter Verwendung eines Operationsmikroskops (Leitz) wurde die Bauchhöhle des in tiefer Narkose (vgl. Kapitel 3.2.3) liegenden Versuchstieres eröffnet und die *V. cava* freipräpariert. Daraufhin wurde mithilfe einer Kanüle (20 G; BD Microlance 3; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) die *V. cava* punktiert. Das Blut des Tieres wurde in eine mit Heparin (10 µl; Heparin-Natrium-25000-ratiopharm; Ratiopharm, Ulm, Deutschland) befüllte Spritze aufgenommen und für weitere Messungen, wie zur Bestimmung der systemischen Leukozytenzahl (vgl. Kapitel 3.3.1) oder der Oberflächenexpression von Selektinen, Integrinen und Liganden auf unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen (vgl. Kapitel 3.3.2.2, 3.3.3.1), benutzt.

3.2.5.5 Intravitalmikroskopie

Durch die Kombination von Transilluminations- und Fluoreszenz-Intravitalmikroskopie konnten sowohl Gefäße als auch unterschiedliche Leukozytensubpopulationen visualisiert werden. Zur Durchführung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde ein AxioTech-Vario 100 Mikroskop (Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) benutzt, welches sich sowohl für *reflected light oblique transillumination* (RLOT)¹⁵⁵ Mikroskopie als auch für Fluoreszenzmikroskopie eignete. Für die Mikroskopie mit Epiillumination diente eine Colibri LED Lichtquelle (Zeiss MicroImaging GmbH). Über den Filterblock 62HE (Zeiss MicroImaging GmbH), welcher mit dichroischen Filtern und Emissionsfiltern [TFT495 + 610 (HE); TBP 527 + LP615 (HE)] ausgestattet war, wurde das Licht auf das Untersuchungsobjekt geleitet. Es wurde mit einem Wasserimmersionsobjektiv mit 20-facher Vergrößerung gearbeitet (0,5 NA; Zeiss MicroImaging GmbH). Die Untersuchungsobjekte wurden mit der digitalen Kamera AxioCam Hsm (Zeiss MicroImaging GmbH) als Videoclips aufgenommen. Anschließend wurden die Aufnahmen mit der Software AxioVision 4.6 (Zeiss MicroImaging GmbH) weiterverarbeitet.

3.2.5.6 Quantifizierung der Leukozytenkinetik und mikrohämo-dynamischer Parameter

Zur Analyse der intravitalmikroskopisch generierten Aufnahmen (Kapitel 3.2.5.5) wurde die Auswertesoftware ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) verwendet.

Wie in einer kürzlich publizierten Studie beschrieben¹⁵⁶, wurden GFP^{neg} (ohne Expression von GFP), GFP^{high} (mit hoher Expression von GFP) und GFP^{low} (mit niedriger Expression von GFP) Zellen nach ihrer Fluoreszenzintensität differenziert. Dementsprechend repräsentierten

die GFP^{neg} Zellen die Leukozytenpopulation der neutrophilen Granulozyten, GFP^{high} Zellen die residente Monozytensubpopulation und GFP^{low} Zellen die inflammatorischen Monozyten im Kremastermuskel. Makrophagen oder dendritische Zellen, welche ebenfalls stark fluoreszierten, konnten aufgrund ihrer auffälligen Morphologie (Größe, Dendriten, etc.) von Leukozyten unterschieden werden.

Die relevanten Parameter zur Analyse der Leukozytenrekrutierung wurden folgendermaßen ermittelt: Rollende Leukozyten wurden dadurch definiert, dass sie sich deutlich langsamer als der Blutfluss bewegten. Die Anzahl rollender Leukozyten wurde über ein Zeitintervall von 60 Sekunden quantifiziert. Als fest adhärente Leukozyten wurden jene Leukozyten definiert, welche sich innerhalb von 30 Sekunden im Blutstrom nicht mehr als um den eigenen Durchmesser bewegten, und wurden in geraden, unverzweigten postkapillären Venolen von 100 µm Länge bestimmt. Der Parameter der Transmigration von Leukozyten wurde ausgewertet, indem auf beiden Seiten einer postkapillären Venole anliegende Bereiche mit einer Länge von 100 µm entlang des Gefäßes und einer Breite von 75 µm in das perivaskuläre Gewebe hinein ausgewählt wurden und die Anzahl der darin befindlichen Leukozyten gezählt wurde. Für alle Parameter wurden Mittelwerte aus 3 bis 5 postkapillären Venolen pro Versuchstier ermittelt.

Die zentrale Blutflussgeschwindigkeit wurde durch die Messung der Distanz zwischen eines im Blutfluss strömenden grün fluoreszierenden Mikropartikels (i. a.; 0,96 µm Durchmesser; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in zwei aufeinander folgenden Bildern bestimmt, wobei die Geschwindigkeit aus dem zeitlichen Abstand der Bildaufnahmen errechnet wurde und pro Gefäß ein Mittelwert aus drei Messungen gebildet wurde.

Des Weiteren wurde die Scherrate unter der Annahme einer parabolischen Flussgeschwindigkeitskurve über den Gefäßquerschnitt aus den ermittelten Gefäßdurchmessern und der zentralen Blutfließgeschwindigkeit berechnet. Die Werte wurden mit Hilfe folgender Formel errechnet (vgl. **Abb. 3.3**):

$$\sigma = 4,9 * 8 * (v_m/d) / 1000$$

v_m mittlere Fließgeschwindigkeit
 d Gefäßdurchmesser

Abb. 3.3: Mathematische Ermittlung der Scherrate σ .

3.2.5.7 Analyse der Leukozytenmigrationswege

Zur Analyse der Leukozytenmigrationswege wurde das Kremastermodell in $CX_3CR-1^{GFP/+}$ -Mäusen bzw. WT-Mäusen angewandt. Um Endothelzellkontakte zu visualisieren, wurde bei WT-Tieren ein nicht blockierender, monoklonaler, Alexa Fluor 488-konjugierter anti-CD31 Antikörper (Klon 390; 10 μ g / 100 μ l PBS i. a.; eBiosciences) appliziert, zur Darstellung von neutrophilen Granulozyten wurde zusätzlich ein monoklonaler, PE-konjugierter anti-Ly6G Antikörper (Klon 1A8; 10 μ g / 100 μ l PBS i. a.; BD Biosciences) verwendet. Bei $CX_3CR-1^{GFP/+}$ -Tieren wurden die Endothelzellkontakte in postkapillären Venolen durch einen nicht blockierenden, monoklonalen, PE-konjugierten anti-CD31 Antikörper (Klon 390; 10 μ g / 100 μ l PBS i. a.; eBiosciences) visualisiert. Nach fünf Minuten wurden postkapilläre Venolen des Kremastermuskels mittels *In-vivo*-Fluoreszenzmikroskopie (vgl. Kapitel 3.2.5.5) dargestellt und Kollokalisierungen von neutrophilen Granulozyten bzw. residenten/inflammatorischen Monozyten mit Endothelzellverbindungen während der einzelnen Schritte ihrer Rekrutierungskaskade analysiert.

3.2.5.8 Analyse des Crawlingverhaltens von Leukozyten

Das intraluminale Crawlingverhalten von unterschiedlichen Leukozytenpopulationen wurde in postkapillären Venolen des Kremastermuskels von $CX_3CR-1^{GFP/+}$ -Mäusen untersucht. Bewegungen von GFP^{neg} und GFP^{low} Zellen konnten verfolgt werden, indem in einem Zeitintervall von 30 Minuten im Abstand von 5 Sekunden intravitalmikroskopische

Aufnahmen (vgl. Kapitel 3.2.5.5) des Gefäßes erstellt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Auswerteprogramms ImageJ (National Institutes of Health): Zur Darstellung der intraluminalen Bewegungen einzelner Leukozyten wurden zunächst Diagramme mit den Migrationswegen erstellt. Außerdem wurde der prozentuale Anteil der intraluminal crawlingden GFP^{neg} bzw. GFP^{low} Leukozyten an allen fest adhärennten GFP^{neg} bzw. GFP^{low} Leukozyten in einem Gefäßabschnitt von 200 µm Länge ermittelt. Die Parameter Crawlingdirektionalität und Crawlinggeschwindigkeit wurden automatisch vom Auswerteprogramm berechnet.

3.2.5.9 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden nach dem Zufallsprinzip folgenden Gruppen zugeordnet:

Für die Analyse der zeitlichen Abfolge der Leukozytenrekrutierung wurde der Kremastermuskel von CX₃CR-1^{GFP/+}-Mäusen durch i. s. Injektion mit CCL2 für 1, 2, 3 oder 6 Stunden stimuliert und den Tieren zusätzlich ein monoklonaler, PE-konjugierter anti-CD11b Antikörper (Klon M1/70; 50 µg / 100 µl PBS i. a.; Biolegend) für die Visualisierung aller Leukozyten myeloiden Ursprungs appliziert (n=3).

Um die einzelnen Schritte der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten hinsichtlich der Lokalisation am Gefäßendothel zu charakterisieren, wurde der Kremastermuskel von WT-Tieren durch i. s. Injektion von CCL2 stimuliert und monoklonale, anti-CD31 Alexa Fluor 488 und anti-Ly6G PE Antikörper i. a. appliziert. Zur Analyse der Lokalisation von Monozyten im Rekrutierungsprozess wurde der Kremastermuskel von CX₃CR-1^{GFP/+}-Tieren durch eine i. s. Injektion von CCL2 stimuliert und ein monoklonaler, anti-CD31 PE-konjugierter Antikörper appliziert (n=3).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Kremastermuskel von CX₃CR-1^{GFP/+}-Mäusen durch i. s. Applikation des murinen rekombinanten CCL2 stimuliert. Zusätzlich erhielten die Versuchstiere eine i. a. Injektion von monoklonalen Antikörpern gegen E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P, L-Selektin/CD62L, CD44, PSGL-1/CD162, LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b, VLA-4/CD49d, ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31, JAM-A oder eines Isotyp-Antikörpers (n=4-5).

3.2.5.10 Versuchsprotokolle

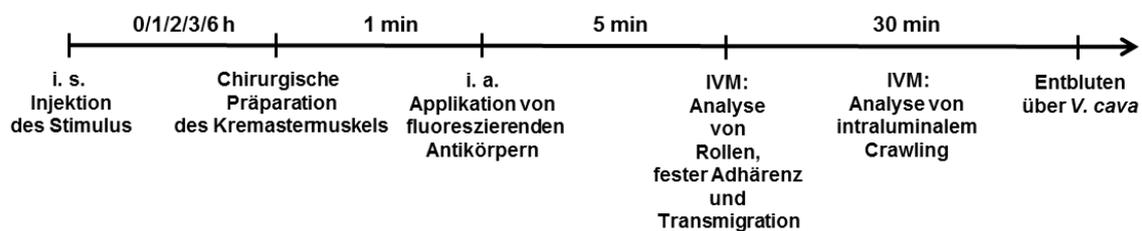


Abb. 3.4: Versuchsprotokoll zur Analyse der zeitlichen Abfolge der Rekrutierung unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen im Kremastermodell.

Um die zeitliche Abfolge der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, residenten und inflammatorischen Monozyten in entzündetes Gewebe zu analysieren, wurden die Versuchstiere durch i. s. Applikation von CCL2 (vgl. Kapitel 3.2.5.2) für die Dauer von 1, 2, 3 oder 6 Stunden stimuliert. Die i. s. Applikation von PBS diente als Negativkontrolle. Im Anschluss wurde der Kremastermuskel präpariert (vgl. Kapitel 3.2.5.1) und der fluoreszierende Antikörper gegen CD11b i. a. appliziert (vgl. Kapitel 3.2.5.3). Fünf Minuten später wurden intravitalmikroskopische Aufnahmen vom Rollen, der festen Adhärenz, der Transmigration und dem Crawling der unterschiedlichen Leukozyten myeloiden Ursprungs angefertigt (vgl. Kapitel 3.2.5.5). Danach wurde das Tier durch Entbluten (vgl. Abb. 3.2.5.4) und Genickbruch euthanasiert und die systemische Leukozytenzahl im Vollblut bestimmt (vgl. Kapitel 3.3.1; vgl. **Abb. 3.4**).

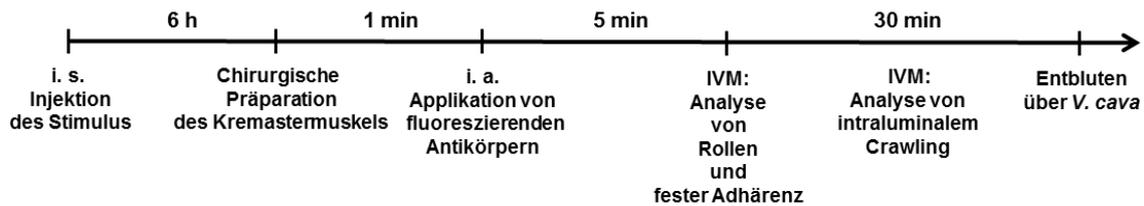


Abb. 3.5: Versuchsprotokoll zur Studie der Lokalisation von Interaktionen zwischen unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen und dem inflammatorischen Gefäßendothel im Kremastermodell.

Die Interaktionsorte von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten mit Endothelzellen in postkapillären Venolen wurden ermittelt, indem der Stimulus CCL2 i. s. (vgl. Kapitel 3.2.5.2) verabreicht wurde, 6 Stunden später der Kremastermuskel präpariert (vgl. Kapitel 3.2.5.1) wurde und die fluoreszierenden Antikörper gegen PECAM-1/CD31 oder gegen Ly6G und PECAM-1/CD31 i. a. (vgl. Kapitel 3.2.5.3) appliziert wurden. Daraufhin wurden die Parameter Rollen, feste Adhärenz und intraluminales Crawling von neutrophilen Granulozyten oder residenten/inflammatorischen Monozyten in postkapillären Venolen mit Hilfe von *In-vivo*-Fluoreszenzmikroskopie (vgl. Kapitel 3.2.5.5) bestimmt. Die Versuchstiere wurden nach Beendigung der Aufnahmen durch Entbluten über die *V. cava* (vgl. Kapitel 3.2.5.4) und Genickbruch euthanasiert. Danach wurde die systemische Leukozytenzahl im Vollblut gemessen (vgl. Kapitel 3.3.1; **vgl. Abb. 3.5**).

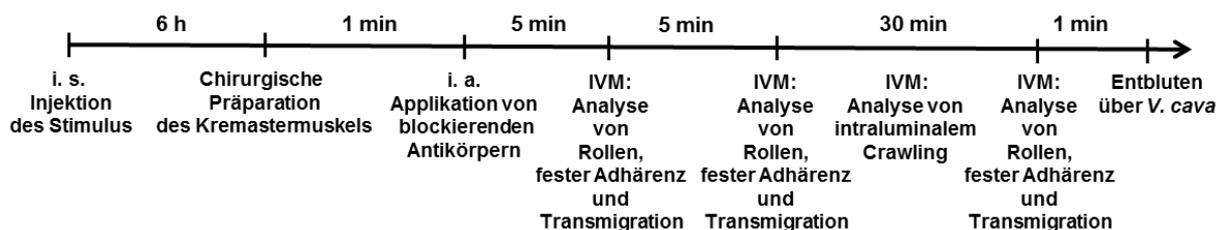


Abb. 3.6: Versuchsprotokoll zur Analyse des Einflusses von Selektinen, Selektinliganden, Integrinen und Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie auf die Rekrutierung unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen im Kremastermodell.

Schließlich wurde der Einfluss von Selektinen, Selektinliganden, Integrinen und Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie auf die einzelnen Schritte der Extravasation von

neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten analysiert. Sechs Stunden nach i. s. Stimulation mit CCL2 (vgl. Kapitel 3.2.5.2) wurde der Kremastermuskel präpariert (vgl. Kapitel 3.2.5.1) und monoklonale Antikörper gegen E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P, L-Selektin/CD62L, CD44, PSGL-1/CD162, LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b, VLA-4/CD49d, ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31, JAM-A oder der Isotyp-Antikörper i. a. (vgl. Kapitel 3.2.5.3) appliziert. Fünf Minuten später wurden intravitalmikroskopische Aufnahmen (vgl. Kapitel 3.2.5.5) von postkapillären Venolen angefertigt. Weitere 5 Minuten später wurden die Aufnahmen derselben Gefäße zum wiederholten Mal durchgeführt und die Zeitraffer-Aufnahme zur Studie des intraluminalen Crawlings der unterschiedlichen Leukozytenpopulationen begonnen. 45 Minuten nach Applikation der blockierenden monoklonalen Antikörper wurden dieselben Mikrogefäße im Kremastermuskel ein drittes Mal mikroskopiert und die Versuchstiere im Anschluss durch Entbluten über die *V. cava* (vgl. Kapitel 3.2.5.4) sowie durch Genickbruch getötet. Abschließend wurde die systemische Leukozytenzahl ermittelt (vgl. Kapitel 3.3.1; **vgl. Abb. 3.6**).

3.3 Ex-vivo-Experimente

3.3.1 Messung der Leukozytenzahl

Die Gesamtzahl an Leukozyten, welche aus der Peritonealhöhle des Versuchstieres gespült wurde, sowie die systemische Leukozytenzahl im aus der *V. cava* entnommenen, heparinisierten Vollblut (vgl. Kapitel 3.2.5.4) wurde mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Coulter® AC-T-Serie; Coulter Corporation) bestimmt und in der Einheit [$n \times 10^3$ pro μl] angegeben.

3.3.2 Durchflusszytometrie

3.3.2.1 Durchflusszytometrische Analyse der Peritoneallavage

Die in die Peritonealhöhle eingewanderten Leukozytenpopulationen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Folgende fluoreszenzmarkierte Antikörper wurden für die 30-minütige Inkubation (bei 4°C) der aus WT-Mäusen isolierten Leukozyten (vgl. Kapitel 3.2.4.1) verwendet: Monoklonaler anti-CD45 APC-Cy7 Antikörper (Klon 30-F7; BD Biosciences), monoklonaler anti-CD11b FITC (Klon M1/70; eBioscience, San Diego, CA, USA), monoklonaler anti-Gr-1 PE Antikörper (Klon RB6-5C8; eBioscience), monoklonaler anti-CD115 APC Antikörper (Klon AFS98; eBioscience), monoklonaler anti-F4/80 eFluor450 Antikörper (Klon BM8; eBioscience). Erythrozyten wurden anschließend mit einem Lyse-Puffer (1:10; 2 ml, 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT); BD FACS Lysing Solution; BD Biosciences) und 2-maligem Waschen mit PBS entfernt. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurde das Zellpellet in 250 µl PBS resuspendiert.

Die Messung der Proben erfolgte an einem Durchflusszytometer (Gallios; Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA): Leukozyten myeloiden Ursprungs wurden durch ihre Expression von CD45 und CD11b identifiziert. Makrophagen wurden anhand ihrer starken Expression von F4/80 von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Im Folgenden wurde die Leukozyten myeloiden Ursprungs (CD45⁺CD11b⁺ Zellen) weiter in neutrophile Granulozyten, welche eine hohe Expression für Gr-1 und eine niedrige Expression für CD115 aufweisen, in inflammatorische Monozyten, welche eine hohe Expression für Gr-1 und CD115 aufweisen, und in residente Monozyten, welche eine niedrige Expression für Gr-1 und eine hohe Expression für CD115 aufweisen, unterschieden.

3.3.2.2 Durchflusszytometrische Analyse von Expressionsprofilen

Die Oberflächenexpression von L-Selektin/CD62L, PSGL-1/CD162, CD44, LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d auf neutrophilen Granulozyten sowie auf residenten und inflammatorischen Monozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Um das Expressionsniveau der Oberflächenmoleküle in unterschiedlich aktivierten Zuständen zu analysieren, wurde das aus WT-Tieren entnommene, heparinisierte Vollblut (vgl. Kapitel 3.2.5.4) zunächst mit CCL2 (100 ng / ml), Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; 50 ng / ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oder PBS für 30 Minuten bei 37°C stimuliert. Anschließend wurden die Proben mit folgenden primären monoklonalen Antikörpern 30 Minuten auf Eis inkubiert: anti-CD45 APC-Cy7 Antikörper (Klon 30-F7; BD Biosciences), anti-Gr-1 PE Antikörper (Klon RB6-5C8; eBioscience) bzw. anti-Gr-1 FITC Antikörper (Klon RB6-5C8; eBioscience) und anti-CD115 APC Antikörper (Klon AFS98; eBioscience) zur Differenzierung der myeloiden Leukozytenpopulationen sowie anti-CD62L PE-Cy7 Antikörper (Klon MEL-14; eBioscience), anti-CD162 PE Antikörper (Klon 2PH1; BD Biosciences), anti-CD44 PE-Cy7 Antikörper (Klon IM7; eBioscience), anti-CD11a PE-Cy7 Antikörper (Klon M17/4; eBioscience), anti-CD11b PE-Cy7 Antikörper (Klon M1/70; eBioscience) oder anti-CD49d PE Antikörper (Klon R1-2; eBioscience) zur Messung des Expressionsniveaus von den zu untersuchenden Oberflächenmolekülen. Anschließend wurden Erythrozyten durch Inkubation mit einem Lyse-Puffer (1:10; 10 Minuten bei RT; BD Biosciences) und durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Die gefärbten Leukozyten wurden unter Verwendung des Durchflusszytometers (Gallios; Beckman Coulter Inc.) analysiert, wobei etwa 20000 Ereignisse in jeder Probe gemessen wurden. Von allen ermittelten Werten für die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Oberflächenmoleküle wurden die Messergebnisse der mit Isotyp-Antikörpern gefärbten Proben subtrahiert.

3.3.3 Konfokalmikroskopie

3.3.3.1 Konfokalmikroskopie isolierter Blutzellen

Zur Visualisierung der Expression von L-Selektin/CD62L, PSGL-1/CD162, CD44, LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d auf der Oberfläche von aus dem Vollblut isolierten murinen Leukozyten wurde WT-Tieren Blut, wie in Kapitel 3.2.5.4 beschrieben, entnommen. Das heparinisierte Vollblut wurde 30 Minuten bei 37°C mit CCL2 (100 ng / ml) oder PBS stimuliert. Danach wurden die Proben mit primären monoklonalen Antikörpern der Spezies Ratte gegen murines L-Selektin/CD62L (Biolegend), CD44 (Biolegend), PSGL-1/CD162 (BD Biosciences), LFA-1/CD11a (Biolegend), Mac-1/CD11b (Biolegend), VLA-4/CD49d (Biolegend) sowie mit monoklonalen anti-CD115 Alexa Fluor 488 (Ratte anti-Maus; Klon AFS98; eBioscience) und anti-Ly6G/C (Gr-1) Alexa Fluor 647 Antikörpern (Ratte anti-Maus; Klon RB6-8C5; Molecular Probes, Frederick, USA) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit dem sekundären Alexa Fluor 555-konjugierten gegen Ratte gerichteten unspezifischen Antikörper aus der Spezies Ziege (Molecular Probes) für 30 Minuten auf Eis. Erythrozyten wurden mithilfe des Lyse-Puffers (1:10; 10 Minuten bei RT; BD Biosciences) entfernt. Danach wurden die Zellen auf Objektträger aufgetragen, welche mit Fibronectin (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) beschichtet waren, und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die gefärbten murinen Blutzellen wurden mit einem Deckplättchen (18 mm x 18 mm; Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) mittels PermaFluor (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) auf dem Objektträger befestigt. Für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Leica SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) mit einer Öl-Immersion-Linse (Leica; 63x; NA 1,4) verwendet.

3.3.3.2 Konfokalmikroskopie des *M. cremaster*

Um die Expression von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P, PSGL-1/CD162, CD44, ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A auf Endothelzellen von unstimulierten sowie von CCL2-stimulierten postkapillären Venolen zu bestimmen, wurde der Kremastermuskel, wie in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben, präpariert, durch Elektrokauterisierung vom Versuchstier isoliert und durch zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur in 4 % Paraformaldehyd fixiert (n=4). Zur Blockade von unspezifischen Bindungen der verwendeten Antikörper sowie zur Permeabilisierung des Kremastermuskels wurde eine Lösung aus 10 % Ziegenserum (Sigma-Aldrich) und 0,5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS verwendet, mit welcher das Gewebe eine Stunde inkubiert wurde. Anschließend wurde der Muskel für 12 Stunden bei 4 °C mit primären Antikörpern gegen PECAM-1/CD31 (Ziege anti-Maus; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) und E-Selektin/CD62E (Ratte anti-Maus; BD Biosciences), PECAM-1/CD31 (Ziege anti-Maus; Santa Cruz Biotechnology) und P-Selektin/CD62P (Ratte anti-Maus; BD Biosciences), PECAM-1/CD31 (Ziege anti-Maus; Santa Cruz Biotechnology) und PSGL-1/CD162 (Ratte anti-Maus; BD Biosciences), PECAM-1/CD31 (Ziege anti-Maus; Santa Cruz Biotechnology) und CD44 (Ratte anti-Maus; Biolegend), PECAM-1/CD31 (Ziege anti-Maus; Santa Cruz Biotechnology) und ICAM-1/CD54 (Ratte anti-Maus; Biolegend), PECAM-1/CD31 (Ziege anti-Maus; Santa Cruz Biotechnology) und ICAM-2/CD102 (Ratte anti-Maus; Biolegend), PECAM-1/CD31 (Ziege anti-Maus; Santa Cruz Biotechnology) und VCAM-1/CD106 (Ratte anti-Maus; Biolegend) oder PECAM-1/CD31 (Ziege anti-Maus; Santa Cruz Biotechnology) und JAM-A (Ratte anti-Maus) inkubiert. Danach wurde das Gewebe mit dem sekundären Alexa Fluor 633-konjugierten Antikörper der Spezies Affe anti-Ziege (Molecular Probes) und anschließend mit dem sekundären Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörper der Spezies Ziege anti-Ratte (Molecular Probes) für jeweils 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der immungefärbte Kremastermuskel mit PermaFluor (Beckman Coulter) und

einem Deckplättchen auf einem Objektträger befestigt. Für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Leica SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) mit einer Öl-Immersions-Linse (Leica; 63x; NA 1,4) verwendet. Zur Messung der Fluoreszenzintensität von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P, PSGL-1/CD162, CD44, ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A wurde das Auswerteprogramm ImageJ verwendet. Dabei wurden ausschließlich die Bereiche des Endothels der postkapillären Venolen analysiert, in welchen keine morphologisch eindeutig differenzierbaren, PECAM-1/CD31-positiven Leukozyten und Thrombozyten gegenwärtig waren.

3.3.4 mRNA-Expressionsanalyse (qRT-PCR)

Die Expression der *messenger ribonucleic acid* (mRNA) der zu untersuchenden Selektinen, Selektinliganden und Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie im gesamten Kremastergewebe wurde mittels *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) analysiert. 2, 4 oder 6 Stunden nach i. s. Injektion von CCL2 bzw. zu Baseline-Bedingungen wurde der Kremastermuskel von WT-Tieren, wie in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben, präpariert und durch Elektrokauterisierung vom Versuchstier getrennt (n=3). Darauf folgten die Isolation der *ribonucleic acid* (RNA) aus dem Kremastermuskel und die qRT-PCR: Die Extraktion der gesamten RNA erfolgte unter Verwendung von TriZol (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland). Die reverse Transkription von 1 µg RNA wurde mithilfe von 200 Einheiten reverser Transkriptase RevertAid, 50 µM Zufallshexameren, 5 µM Oligo(dT)18, 400 µM nNTPs und 1,6 Einheiten / µl Ribolock RNase Inhibitor (alle Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt. Die daraus gewonnene *complementary desoxyribonucleic acid* (cDNA; 20 ng pro Reaktion) wurde für mehrere qRT-PCR Vorgänge (20 µl als finales Volumen) mit 300 nM Primern (synthetisiert von Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in

1x Maxima CYBR Green qPCR Mastermix (Fermentas) eingesetzt, wobei ein Standardprotokoll (10 Minuten 95°C, 45 x (15 s 95°C, 30 s 60°C)) an einem LC480 qPCR Cycler (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) angewandt wurde. Folgende Primerpaare wurden verwendet: CD62E Forward 5`-CCC CTC CTG CCA AGT GGT A-3`, CD62E Reverse 5`-TCA TGT TCA TCT TTC CCG GG-3`, CD62P Forward 5`-ATG TGC AGA GCG GTC AAA TG-4`, CD62P Reverse 5`-GAT GGT CAG CAG CAC AAG GAA-3`, CD44 Forward 5`-TTC AAT GCC TCA GCC CCT C-3`, CD44 Reverse 5`-TGG GTA GGT CTG TGA CTG ATG TAC A-3`, CD11a Forward 5`-ATC AAC TAT GTG GTG GCA CAC GT-3`, CD11a Reverse 5`-GCA CCT TGG TAG CAT CCG G-3`, CD11b Forward 5`-TCA TCA ACA CAA CCA GAG TGG ATT-3`, CD11b Reverse 5`-ATG ACT GCA GAA GCA TAA CCC AG-3`, CD49d Forward 5`-TAA TGG GAC TTC TGA CGT GAT TAC AG-3`, CD49d Reverse 5`-GCA CGT CTT TCC GCA TGA A-3`, CD54 Forward 5`-CCG TTG TGA TCC CTG GGC-3`, CD54 Reverse 5`-GGC TTC TCT GGG ATG GAT GG-3`, CD102 Forward 5`-GCA TCT CGG AGT ACC AGA TCC TT-3`, CD102 Reverse 5`-TTG TCC TGC ATC GGC TCA TAG-3`, CD106 Forward 5`-AAC TAC AAG TCT ACA TCT CTC CCA GGA A-3`, CD106 Reverse 5`-GTC ACA GCA CCA CCC TCT TGA-3`, CD31 Forward 5`-GTC ACC GTG CAG GAG TCC TT-3`, CD31 Reverse 5`-AAT GTG CAG CTG GTC CCC T-3`, JAM-A Forward 5`-GGC GTC TGG TTT GCC TAT AGC-3`, JAM-A Reverse 5`-TGA ATT CCC CCT CAC TTC GAG-3`, 18S rRNA Forward 5`-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3`, 18S rRNA Reverse 5`-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3`, beta-2-Mikroglobulin Forward 5`-CGG CCT GTA TGC TAT CCA GAA A-3`, beta-2-Mikroglobulin Reverse 5`-AAT GTG AGG CGG GTG GAA CT-3`, delta-Amino-Laevulinat-Synthase Forward 5`-ATC ATC CCT GTG CGG GTT G-3`, delta-Amino-Laevulinat-Synthase Reverse 5`-TAA TTG ATG GCC TGG ACG TAG ATA TT-3`. Die relative Quantifizierung der mRNA erfolgte anhand einer Standardkurve. Die Ergebnisse wurden auf eine Matrix bestehend aus 18S *ribosomal ribonucleic acid* (rRNA), beta-2-Mikroglobulin und delta-Amino-Laevulinat-Synthase normalisiert. Die unbehandelten Kontrollen, bei welchen der Kremastermuskel ohne vorherige Stimulation entnommen wurde, dienten zur Kalibrierung.

3.4 Statistik

Die Versuchsergebnisse wurden als Mittelwert (MW) \pm *standard error of mean* (SEM) angegeben und mit Hilfe der Software Sigma Stat TM (Jandel Corporation, St. Rafael, CA, USA) statistisch analysiert. Nach Durchführung einer One-Way-ANOVA (Kapitel 4.1 bis 4.2.3, Kapitel 4.2.6) bzw. einer ANOVA-on-ranks (Kapitel 4.2.4 und 4.2.5) gefolgt vom Dunnetts Test wurden Unterschiede ermittelt, welche bei Werten von $p < 0,05$ als signifikant bezeichnet wurden.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Bedeutung von Selektinen für die Extravasation von Leukozyten myeloiden Ursprungs

4.1.1 Expressionsanalyse von L-Selektin/CD62L, PSGL-1/CD162 und CD44 auf der Oberfläche von Leukozyten myeloiden Ursprungs

Zunächst wurde die Oberflächenexpression von L-Selektin/CD62L und den Selektinliganden PSGL-1/CD162 und CD44 auf residenten und inflammatorischen Monozyten sowie auf neutrophilen Granulozyten analysiert. Anhand von konfokalmikroskopischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass diese Proteine konstitutiv auf der Oberfläche von Leukozyten myeloiden Ursprungs exprimiert werden. Unter unstimulierten Bedingungen konnte L-Selektin/CD62L (**vgl. Abb. 4.1A**) am stärksten auf neutrophilen Granulozyten und am schwächsten auf residenten Monozyten detektiert werden. Nach Stimulation der isolierten Blutleukozyten mit dem Chemokin CCL2 oder PMA als Positivkontrolle war die Expression von L-Selektin/CD62L auf der Oberfläche der myeloiden Leukozyten signifikant reduziert. Der Selektinligand PSGL-1/CD162 (**vgl. Abb. 4.1B**) war im Vergleich der drei untersuchten Oberflächenmoleküle am stärksten auf allen untersuchten Leukozyten myeloiden Ursprungs präsent. Die höchste Expression von PSGL-1/CD162 konnte auf inflammatorischen Monozyten detektiert werden, während dieses Oberflächenmolekül etwas schwächer auf neutrophilen Granulozyten und in deutlich geringerem Maß auf residenten Monozyten nachgewiesen werden konnte. Stimulation mit CCL2 oder PMA verursachte eine signifikante Verringerung von PSGL-1/CD162 auf der

Oberfläche von neutrophilen Granulozyten. Auf residenten und inflammatorischen Monozyten wurde die Expression dieses Moleküls dagegen nicht reduziert. Ähnlich wie der Selektinligand PSGL-1/CD162 konnte auch der Selektinligand CD44 (vgl. **Abb. 4.1C**) stärker auf der Oberfläche von inflammatorischen Monozyten als auf der von neutrophilen Granulozyten oder residenten Monozyten detektiert werden. Die Aktivierung der Leukozyten mit CCL2 oder PMA reduzierte geringfügig, jedoch nicht signifikant die Expression von CD44 auf diesen Leukozyten myeloiden Ursprungs.

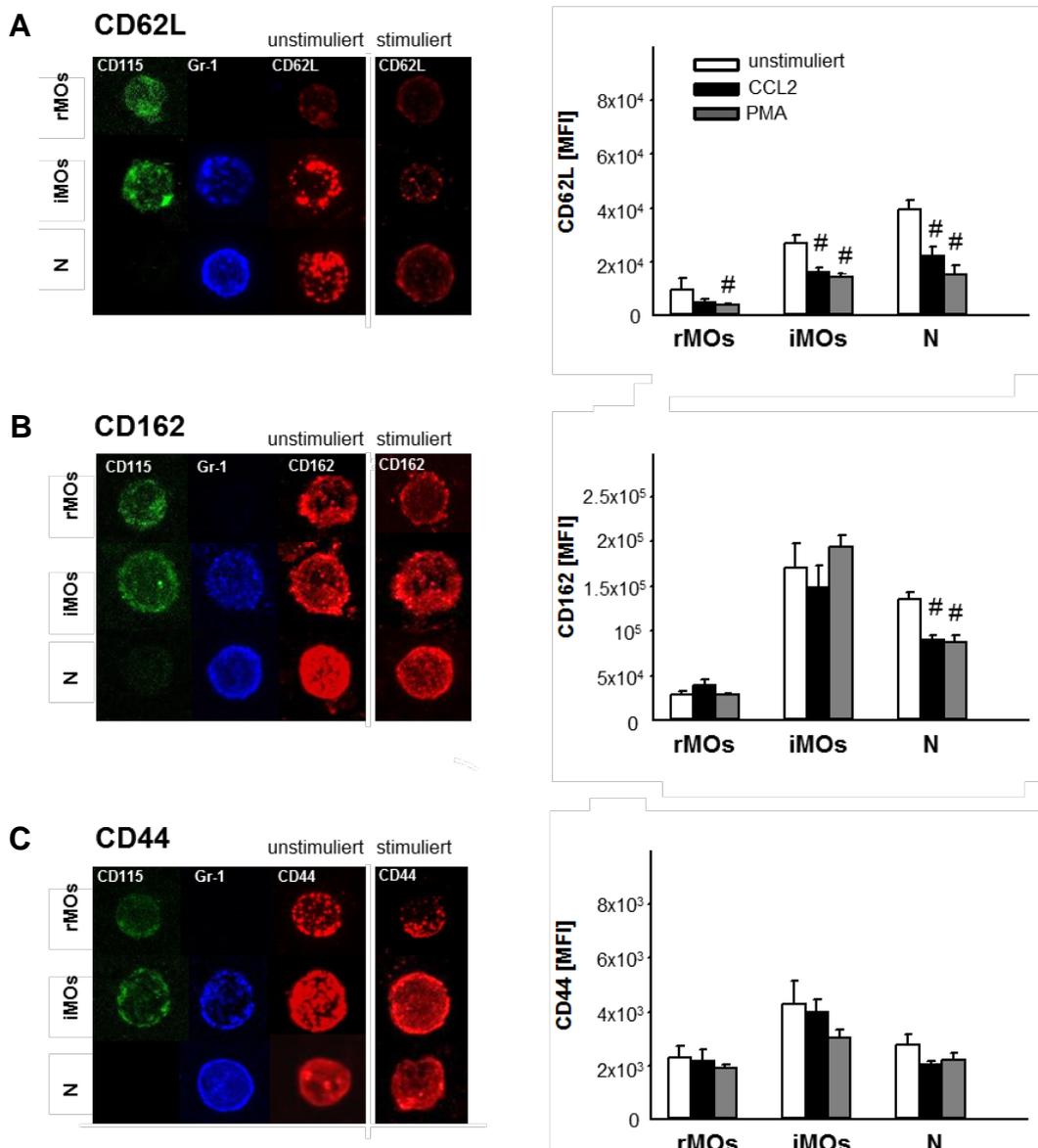


Abb. 4.1: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von L-Selektin/CD62L, PSGL-1/CD162 und CD44 auf der Oberfläche von aus dem Vollblut isolierten murinen Leukozyten vor und nach Stimulation mit CCL2 (**A, B, C**, linke Spalte). Die Graphen zeigen durchflusszytometrisch ermittelte Werte für die Expression dieser Moleküle unter unstimulierten bzw. CCL2- oder PMA-stimulierten Bedingungen (**A, B, C**, rechte Spalte; MW ± SEM bei n=7 pro Gruppe; # p < 0,05, vs. unstimuliert).

4.1.2 Expressionsanalyse von P-Selektin/CD62P, E-Selektin/ CD62E, PSGL-1/CD162 und CD44 in der Mikrovaskulatur

Mit Hilfe von Konfokalmikroskopie und qRT-PCR wurden die Expressionsprofile von P-Selektin/CD62P, E-Selektin/CD62E sowie den Selektinliganden PSGL-1/CD162 und CD44 im entzündeten und nicht-entzündeten Gewebe ermittelt.

Auf Proteinebene wurde die Konfokalmikroskopie für die qualitative und quantitative Analyse der Expression von P-Selektin/CD62P, E-Selektin/CD62E, PSGL-1/CD162 und CD44 in postkapillären Venolen des *M. cremaster* eingesetzt (vgl. Abb. 4.2, 4.3A). Durch Doppelfärbung des *M. cremaster* mit dem jeweils zu untersuchenden Oberflächenmolekül und PECAM-1/CD31 als Marker für Endothelzellen wurde die Lokalisation der Selektine bzw. deren Liganden relativ zu den Endothelzellverbindungen bestimmt. Unter unstimulierten Bedingungen war P-Selektin/CD62P nur leicht auf dem Endothel von postkapillären Venolen im *M. cremaster* exprimiert. Nach sechsständiger Stimulation mit CCL2 hingegen wurde P-Selektin/CD62P stärker und diffus verteilt über das Endothel präsentiert (vgl. Abb. 4.2). E-Selektin/CD62E wurde auf der Endothelzelloberfläche von Mikrogefäßen des unstimulierten *M. cremaster* kaum exprimiert. Nach Stimulation mit CCL2 stieg die Präsentation von E-Selektin/CD62E jedoch stark an, wobei dieses Protein ausschließlich mit den Endothelzellkontakten kolokalisierte (vgl. Abb. 4.2). Der Selektinligand PSGL-1/CD162 konnte sowohl unter unstimulierten als auch unter CCL2-stimulierten Bedingungen nur geringfügig im Mikrogefäßsystem des *M. cremaster* nachgewiesen werden und war diffus über das Endothel der postkapillären Venolen verteilt (vgl. Abb. 4.2). Gleichmaßen wurde der Selektinligand CD44 nur minimal auf Endothelzellen von unstimulierten Mikrogefäßen des *M. cremaster* präsentiert. Nach Stimulation mit CCL2 wurde die Expression dieses Proteins kaum verstärkt und kolokalisierte nur wenig mit Endothelzellverbindungen der postkapillären Venolen (vgl. Abb. 4.2).

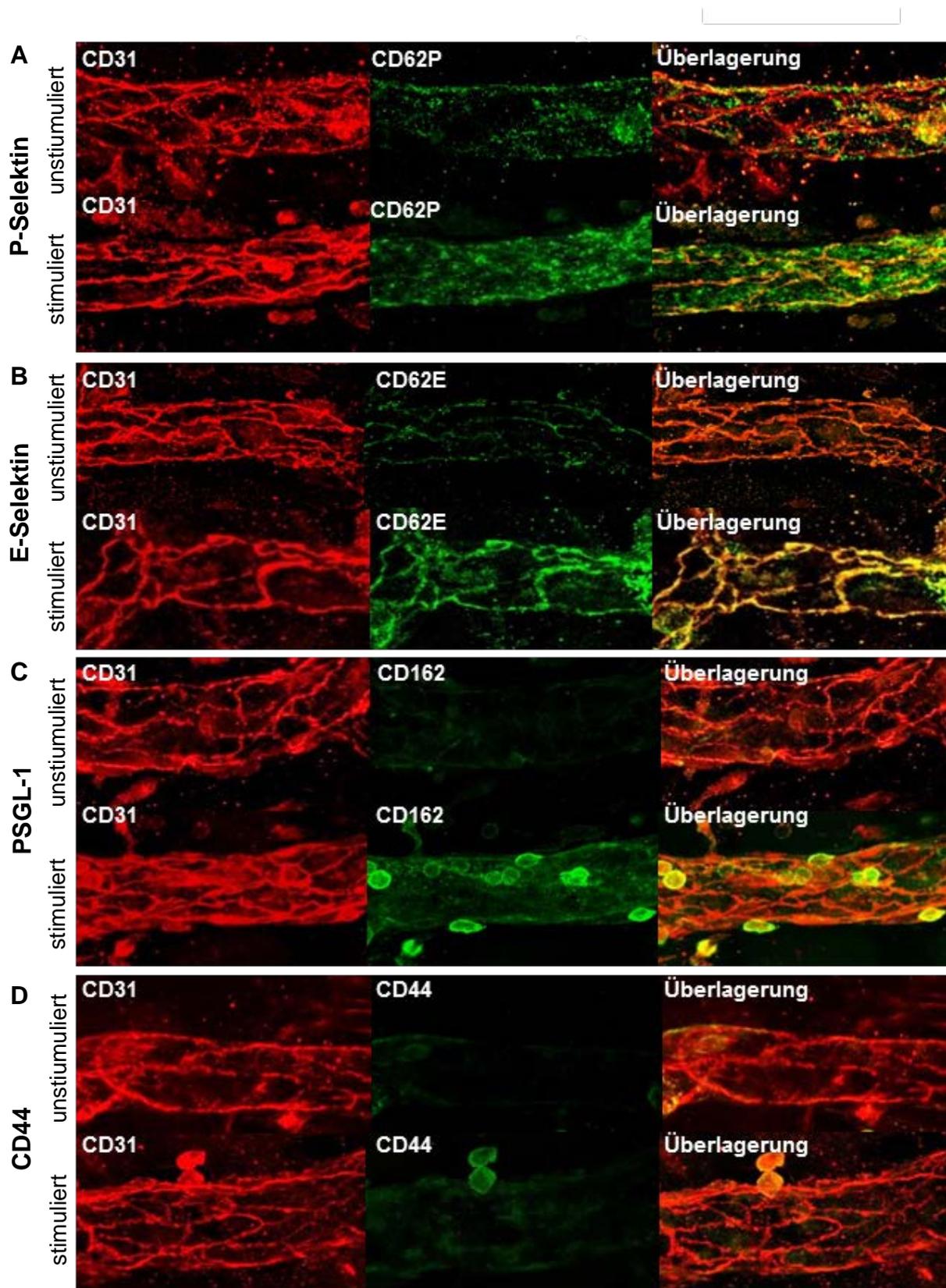


Abb. 4.2: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von PECAM-1/CD31 und P-Selektin/CD62P, E-Selektin/CD62E, PSGL-1/CD162 oder CD44 in Mikrogefäßen des *M. cremaster* vor und nach Stimulation mit CCL2.

Die Analyse der Fluoreszenzintensitäten von E-Selektin/CD62E und P-Selektin/CD62P sowie der Selektinliganden PSGL-1/CD162 und CD44 in Mikrogefäßen des *M. cremaster* zeigte, dass die Expression von E-Selektin/CD62E nach sechsständiger Stimulation mit CCL2 stark anstieg, während die Expression von P-Selektin/CD62P weniger und die der Selektinliganden PSGL-1/CD162 und CD44 kaum zunahm (vgl. **Abb. 4.3A**).

Auf mRNA-Ebene wurde die Expression von P-Selektin/CD62P und E-Selektin/CD62E sowie der Selektinliganden PSGL-1/CD162 und CD44 im *M. cremaster* mittels der qRT-PCR untersucht (vgl. **Abb. 4.3B**). Die relative Expression von E-Selektin/CD62E im Kremastergewebe verstärkte sich deutlich mit der Dauer der CCL2-Stimulation und erreichte ihr Maximum nach vierständiger Stimulationszeit. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die relative Expression von P-Selektin/CD62P, PSGL-1/CD162 und CD44 nur leicht.

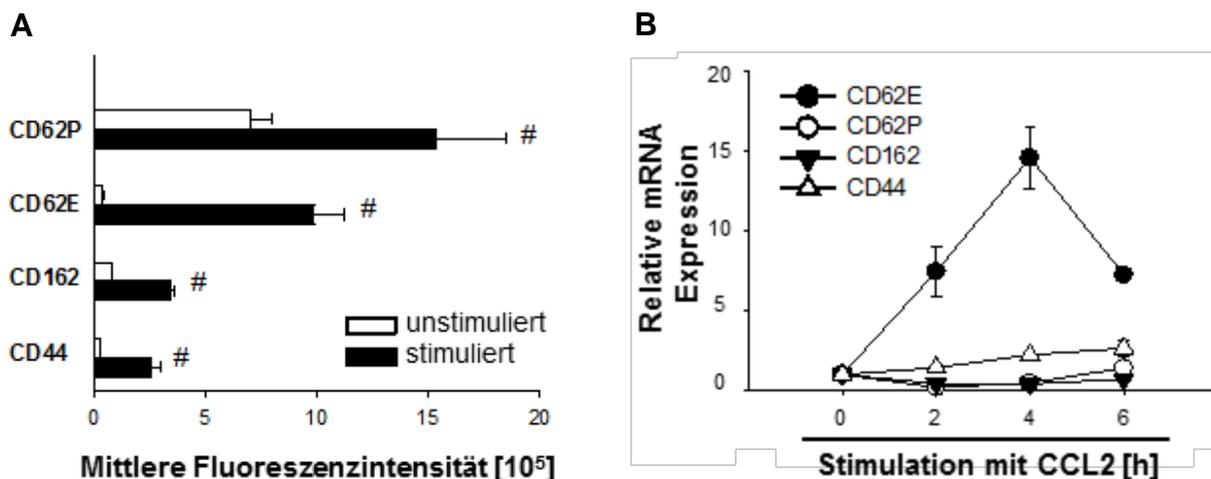


Abb. 4.3: Analyse der Fluoreszenzintensitäten von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P, PSGL-1/CD162 und CD44 in postkapillären Venolen des Kremastermuskels vor und nach CCL2-Stimulation (**A**; MW \pm SEM bei n=3 pro Gruppe; # p < 0,05, vs. unstimuliert). Quantifizierung des mRNA-Gehaltes von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P, PSGL-1/CD162 und CD44 im Kremastermuskel nach CCL2-Stimulation (**B**; MW \pm SEM bei n=4 pro Gruppe).

4.1.3 Einfluss von Selektinen sowie den Selektinliganden PSGL-1/CD162 und CD44 für die CCL2-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten

Im Peritonitismodell wurde nach sechsständiger intraperitonealer Stimulation mit dem CC-motif-Chemokin CCL2 quantitativ untersucht, welche Leukozytensubpopulationen in die inflammatorische Peritonealhöhle einwanderten. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (vgl. **Abb. 4.4**) konnten die Leukozyten myeloiden Ursprungs in der Peritoneallavage anhand ihrer Expression von CD45 und CD11b identifiziert werden und anschließend zwischen neutrophilen Granulozyten (Gr-1⁺CD115⁻), inflammatorischen Monozyten (Gr-1⁺CD115⁺) und residenten Monozyten (Gr-1⁻CD115⁺) unterschieden werden. Während es nach Stimulation mit CCL2 zu einem starken Anstieg der Akkumulation von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten nach Stimulation mit CCL2 in der Peritonealhöhle kam, blieb die Anzahl residenter Monozyten konstant auf niedrigem Niveau (vgl. **Abb. 4.5A, B, C**).

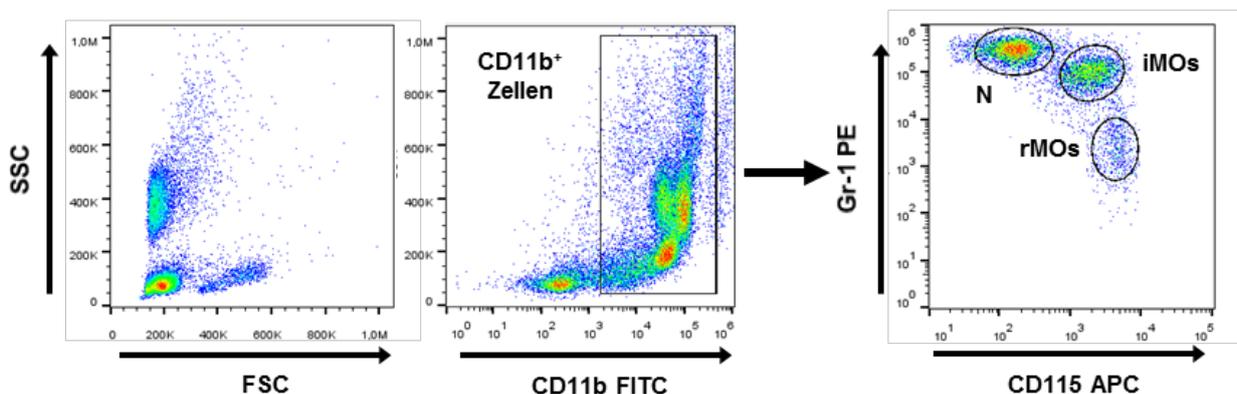


Abb. 4.4: Repräsentative Durchflusszytometrie-Diagramme, welche die Differenzierung von unterschiedlichen in die Peritonealhöhle eingewanderten Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs zeigen.

Anschließend wurde der Einfluss von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P und L-Selektin/CD62L auf die CCL2-induzierte Extravasation der unterschiedlichen Leukozyten-

populationen myeloiden Ursprungs analysiert (vgl. **Abb. 4.5A, B, C**): Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten in die entzündete Peritonealhöhle wurde durch Blockade von P-Selektin/CD62P und, in geringerem Maß, durch Blockade von L-Selektin/CD62L inhibiert. Die Blockade von E-Selektin/CD62E führte im Vergleich zu Isotyp-Kontrollantikörper-behandelten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Extravasation von inflammatorischen Monozyten, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Migration von neutrophilen Granulozyten. Keine der beschriebenen Interventionen veränderte die Anzahl der residenten Monozyten in der Peritonealhöhle.

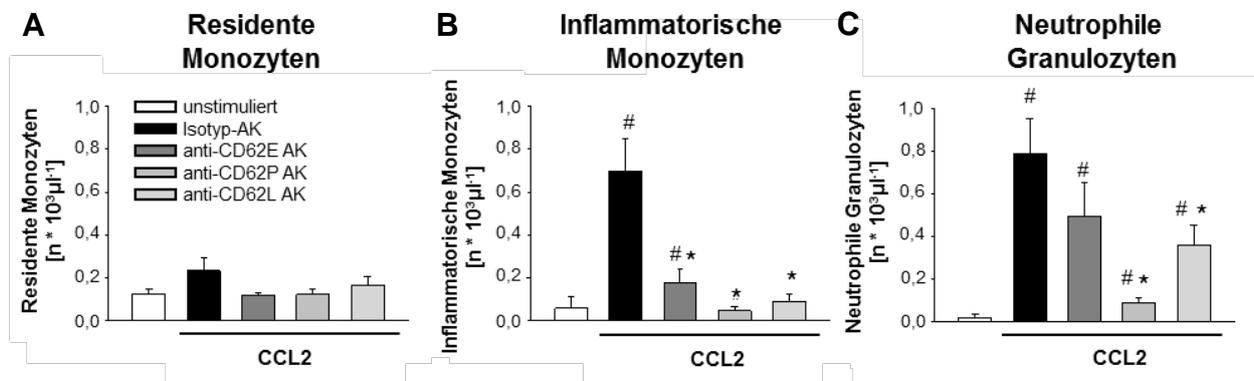


Abb. 4.5: Quantifizierung der in die Peritonealhöhle eingewanderten residenten Monozyten (A), inflammatorischen Monozyten (B) und neutrophilen Granulozyten (C) nach Blockade von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P und L-Selektin/CD62L und i. p. Stimulation mit CCL2 (MW ± SEM bei n=7 pro Gruppe; # p < 0,05, vs. unstimuliert; * p < 0,05, vs. Isotyp-Antikörper).

In darauffolgenden Experimenten wurde die Funktion der Selektinliganden PSGL-1/CD162 und CD44 für die Extravasation von Leukozyten myeloiden Ursprungs in die CCL2-stimulierte Peritonealhöhle analysiert (vgl. **Abb. 4.6A, B, C**): Beide gegen die untersuchten Selektinliganden gerichteten, blockierenden Antikörper verringerten im Vergleich zu Isotyp-Antikörper-behandelten Tieren die Anzahl an rekrutierten neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten signifikant.

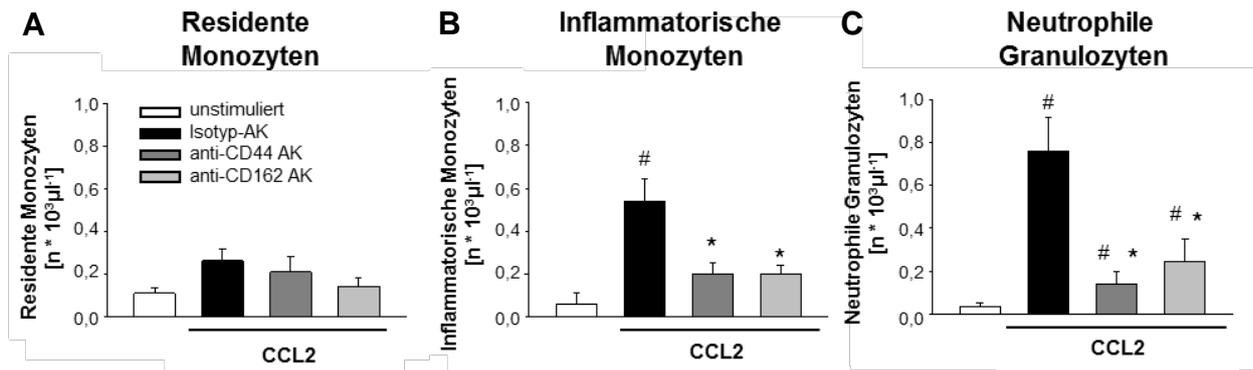


Abb. 4.6: Quantifizierung der in die Peritonealhöhle eingewanderten residenten Monozyten (A), inflammatorischen Monozyten (B) und neutrophilen Granulozyten (C) nach Blockade von PSGL-1/CD162 und CD44 unter CCL2-stimulierten Bedingungen (MW \pm SEM bei n=7 pro Gruppe; # $p < 0,05$, vs. unstimuliert; * $p < 0,05$, vs. Isotyp-Antikörper).

Zusätzlich wurde in Mäusen, in welchen neutrophile Granulozyten bzw. Thrombozyten depletiert wurden, der Einfluss dieser Zellpopulationen auf die CCL2-induzierte Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs untersucht (vgl. Abb. 4.7A, B, C). Dabei konnte festgestellt werden, dass neutrophile Granulozyten unabhängig von Thrombozyten und dass inflammatorische Monozyten unabhängig von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten in die entzündete Peritonealhöhle migrieren.

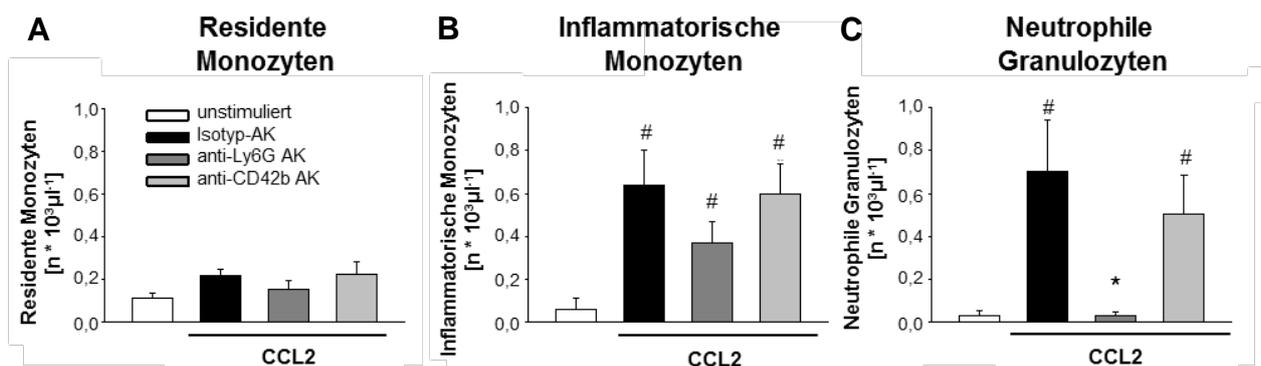


Abb. 4.7: Quantifizierung der in die Peritonealhöhle eingewanderten residenten Monozyten (A), inflammatorischen Monozyten (B) und neutrophilen Granulozyten (C) nach Depletion von neutrophilen Granulozyten oder Thrombozyten unter CCL2-stimulierten Bedingungen (MW \pm SEM bei n=7 pro Gruppe; # $p < 0,05$, vs. unstimuliert; * $p < 0,05$, vs. Isotyp-Antikörper).

4.1.4 Dynamik der Rekrutierung einzelner Leukozyten-subpopulationen myeloiden Ursprungs im Kremastermodell

Die einzelnen Schritte der Extravasation von Leukozyten myeloiden Ursprungs wurden im Kremastermodell in $CX_3CR-1^{GFP/+}$ -Mäusen untersucht, in welchen die Interaktionen von neutrophilen Granulozyten sowie residenten und inflammatorischen Monozyten mit Endothelzellen von postkapillären Venolen *in vivo* beobachtet werden konnten. Mithilfe eines monoklonalen, PE-markierten anti-CD11b Antikörpers wurden zunächst alle Leukozyten myeloiden Ursprungs markiert, welche einen Anteil von über 98 % an allen rollenden und fest adhärenen Leukozyten ausmachten (vgl. **Abb. 4.8B**).

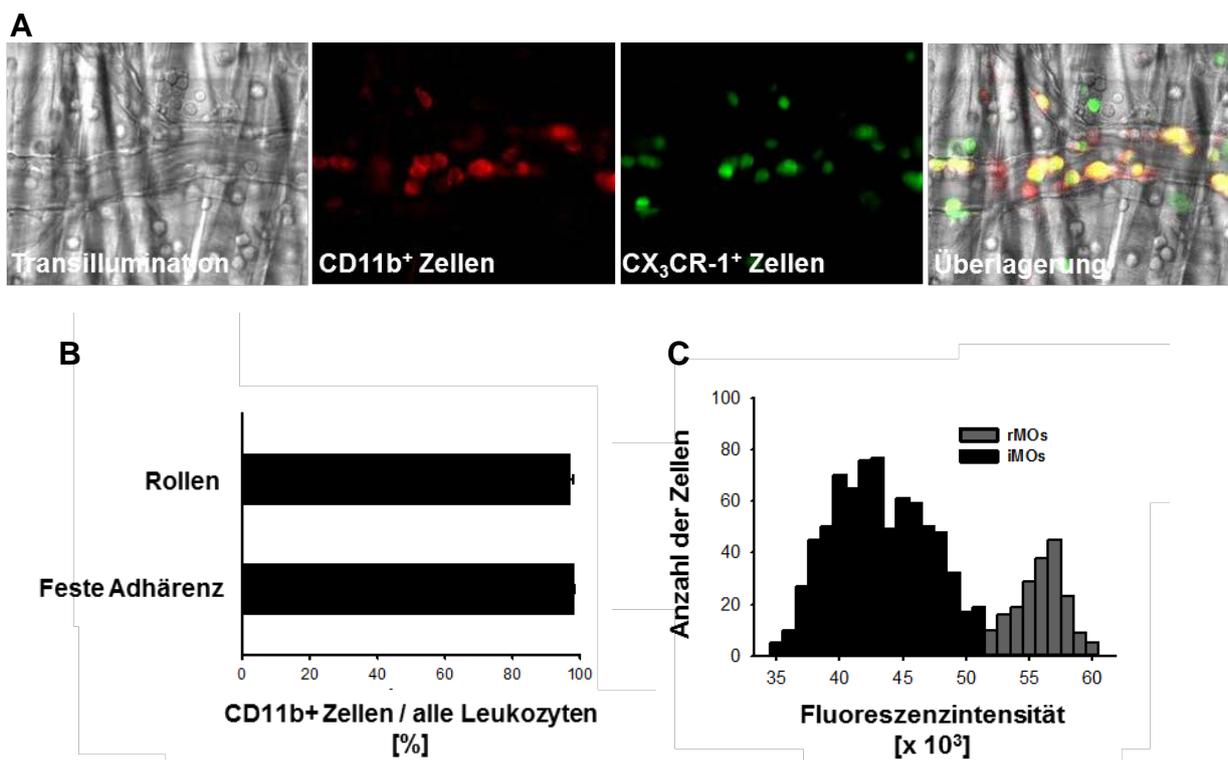


Abb. 4.8: Repräsentative *In-vivo*-Mikroskopie-Aufnahmen einer postkapillären Venole im CCL2-stimulierten Kremastermuskel von $CX_3CR-1^{GFP/+}$ -Mäusen zur Veranschaulichung der Rekrutierung von unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs (**A**; Transillumination: Visualisierung aller Leukozyten; CD11b⁺: Leukozyten myeloiden Ursprungs; CX₃CR-1^{GFP/+}: Monozyten). Quantifizierung des Anteils von rollenden und fest adhärenen CD11b⁺ Zellen an allen Leukozyten (**B**; MW ± SEM bei n=3 pro Gruppe). Messung der Fluoreszenzintensitäten von Zellen in $CX_3CR-1^{GFP/+}$ -Mäusen zur Unterscheidung von residenten (GFP^{high}) und inflammatorischen (GFP^{low}) Monozyten (**C**; MW ± SEM bei n=3 pro Gruppe).

Durch die Kombination von Transilluminationsmikroskopie, mit welcher alle Leukozyten visualisiert werden konnten, und Fluoreszenzmikroskopie, mit welcher die GFP-positiven Monozyten detektiert werden konnten, wurden die einzelnen Leukozytenpopulationen in CX₃CR-1^{GFP/+}-Mäusen unterschieden (**vgl. Abb. 4.8A**). Anhand ihres unterschiedlich starken Fluoreszenzsignals für GFP konnten zudem inflammatorische Monozyten, welche eine niedrige Fluoreszenzintensität aufweisen, und residente Monozyten, welche eine hohe Fluoreszenzintensität aufweisen, getrennt analysiert werden (**vgl. Abb. 4.8C**). Dementsprechend wurden neutrophile Granulozyten durch GFP^{neg} Zellen repräsentiert, inflammatorische Monozyten durch GFP^{low} Zellen und residente Monozyten durch GFP^{high} Zellen.

Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierungskaskade intravaskuläres Rollen (**vgl. Abb. 4.9A**), feste Adhärenz (**vgl. Abb. 4.9B**) und Crawling (**vgl. Abb. 4.9C**) sowie Transmigration (**vgl. Abb. 4.9D**) im Zeitverlauf bis 360 Minuten nach intraskrotaler Injektion von CCL2 untersucht. Im unstimulierten Tier wurden einige wenige mit dem mikrovaskulären Endothel interagierende residente Monozyten identifiziert, während kaum rollende, fest adhärenzte, crawlende oder transmigrierte neutrophile Granulozyten und inflammatorische Monozyten beobachtet wurden. Bereits 60 Minuten nach Stimulation mit CCL2 konnte ein starker Anstieg in der Anzahl rollender, fest adhärenzter, crawlender und transmigrierter neutrophiler Granulozyten festgestellt werden, was sich bei längeren Stimulationszeiten weiter verstärkte. Im Gegensatz dazu war die Reaktion der inflammatorischen Monozyten auf den Stimulus um ca. 2 Stunden verzögert und erreichte das Maximum etwa 360 Minuten nach intraskrotaler Injektion von CCL2. Die einzelnen Rekrutierungsparameter zeigten für die residenten Monozyten keine Unterschiede zwischen den unterschiedlich langen Stimulationszeiten. Um die einzelnen Schritte der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten aus postkapillären Venolen in entzündetes Gewebe zu untersuchen, wurde für die folgenden Experimente im Kremastermodell eine Stimulationszeit von 360 Minuten gewählt.

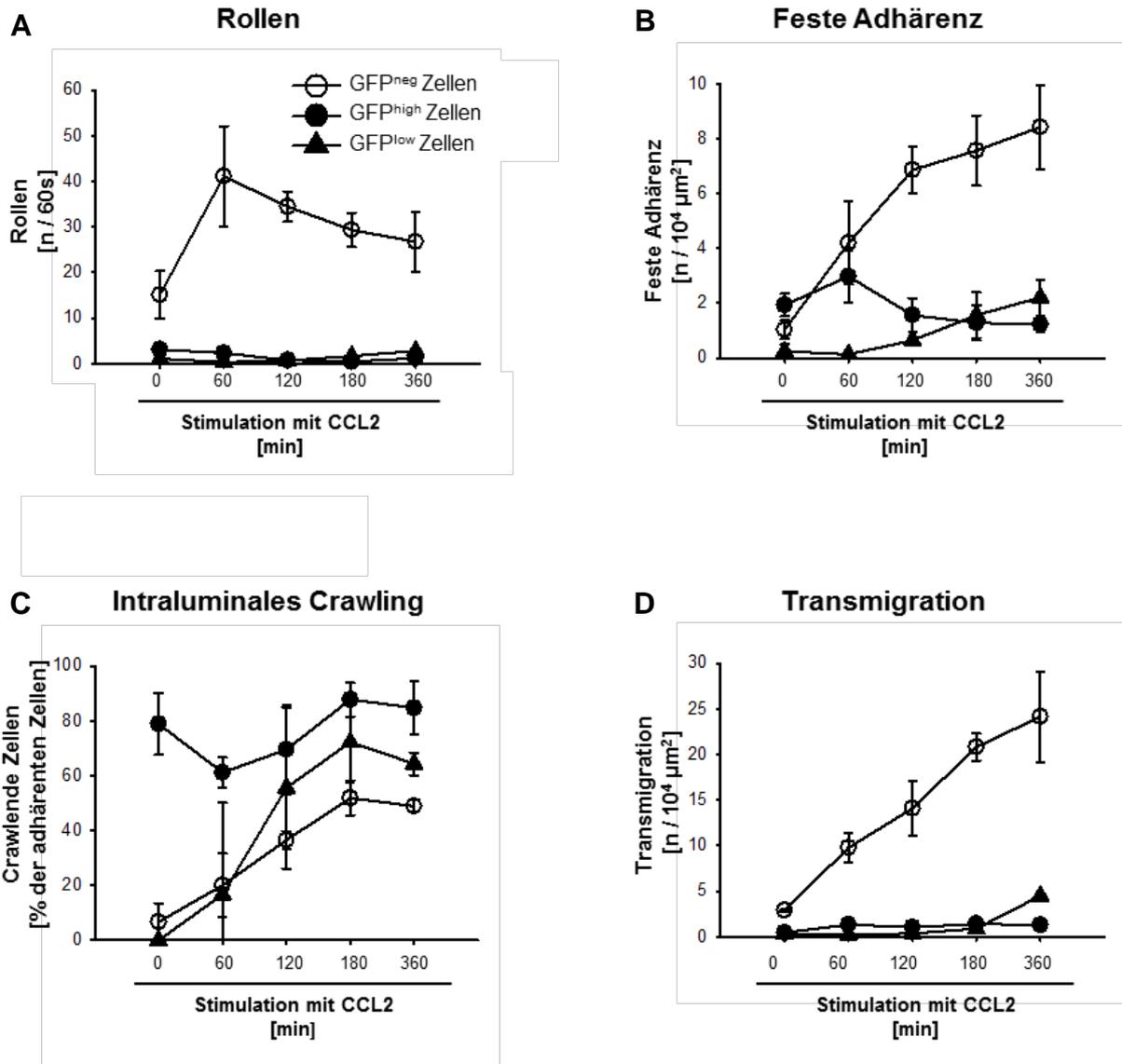


Abb. 4.9: Quantifizierung von intravaskulärem Rollen, fester Adhärenz und Crawling sowie der Transmigration von residenten/inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten in postkapillären Venolen nach unterschiedlich langen Stimulationszeiten mit CCL2 (MW ± SEM bei n=3 pro Gruppe).

4.1.5 Interaktionen von Leukozyten myeloiden Ursprungs mit Endothelzellen

Anschließend wurde die Lokalisation der Interaktionen der einzelnen myeloiden Leukozytenpopulationen mit dem Gefäßendothel postkapillärer Venolen des Kremaster-

muskels von CX₃CR-1^{GFP/+}-Mäusen analysiert (vgl. **Abb. 4.10A**). Über 90 % der residenten und inflammatorischen Monozyten rollten nach Stimulation mit CCL2 entlang der PECAM-1/CD31-positiven Endothelzellverbindungen, welche mit Hilfe eines fluoreszierenden Antikörpers markiert wurden. Neutrophile Granulozyten dagegen rollten beliebig auf der luminalen Oberfläche des Gefäßendothels und nur zu ca. 35 % entlang der Endothelzellkontakte (vgl. **Abb. 4.10B**).

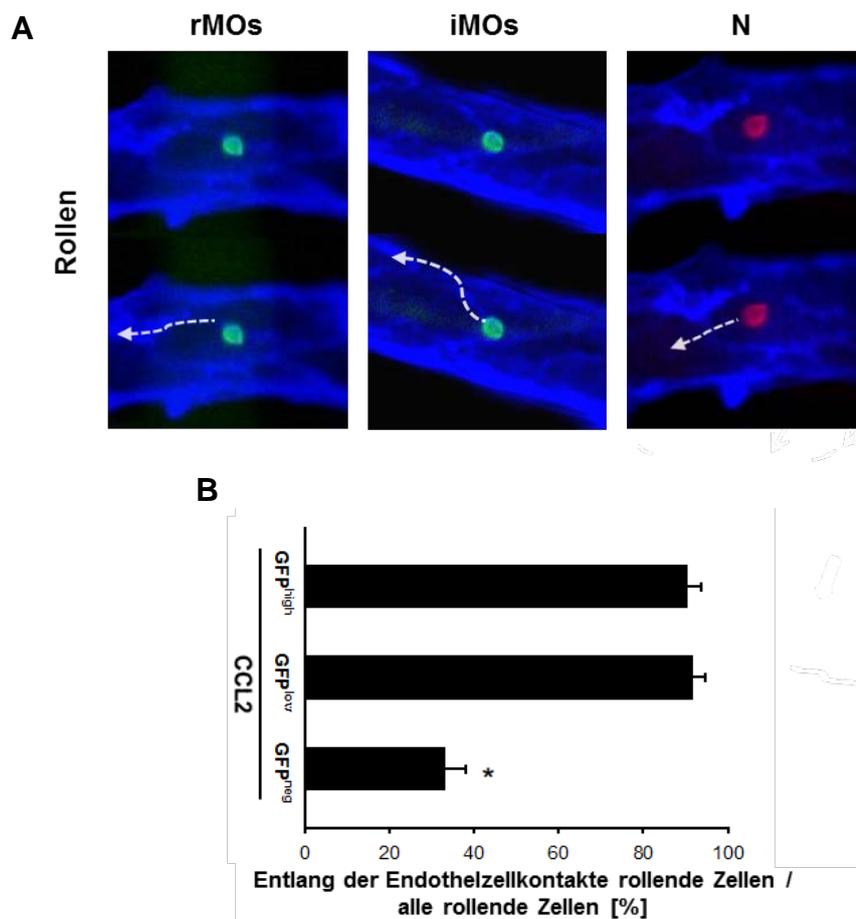


Abb. 4.10: Repräsentative *In-vivo*-Mikroskopie-Aufnahmen des Rollverhaltens von residenten/inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten nach CCL2-Stimulation (**A**; grün: GFP⁺ Monozyten; rot: PE-markierte Ly6G⁺ Leukozyten; blau: CD31/PECAM-1⁺ Endothelzellverbindungen; weiße Pfeile: Weg der rollenden Leukozyten). Quantifizierung der Lokalisation von intravaskulärem Rollen der residenten/inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten in postkapillären Venolen (**B**; MW ± SEM bei n=3 pro Gruppe; * p < 0,05, vs. GFP^{low} Zellen).

Die Lokalisation der festen Adhärenz von neutrophilen Granulozyten bzw. residenten und inflammatorischen Monozyten dagegen unterschied sich nur wenig (vgl. **Abb. 4.11A**): Der

Großteil dieser Leukozyten adhärierte nach sechsständiger Stimulation mit CCL2 an Endothelzellverbindungen, wobei Monozyten häufiger an trizellulären als an bizellulären Endothelzellkontakten detektiert werden konnten (vgl. **Abb. 4.11B**).

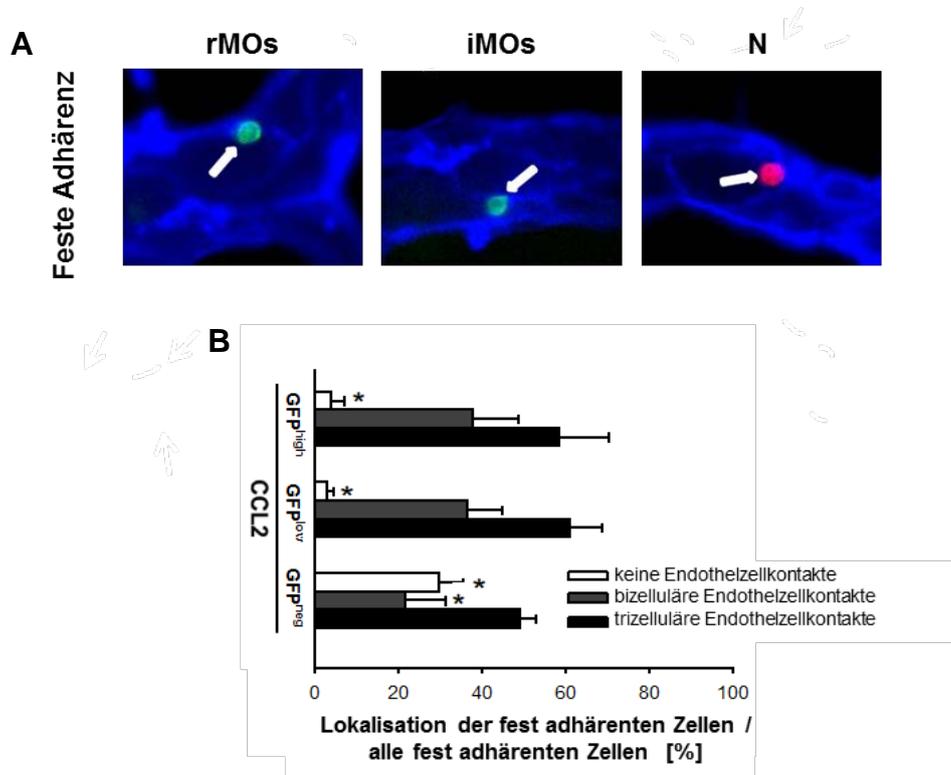


Abb. 4.11: Repräsentative *In-vivo*-Mikroskopie-Aufnahmen der Adhäsionsorte von residenten/inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten am mikrovaskulären Gefäßendothel nach CCL2-Stimulation (**A**; grün: GFP⁺ Monozyten; rot: PE-markierte Ly6G⁺ Leukozyten; blau: CD31/PECAM-1⁺ Endothelzellverbindungen; weiß: Ort der festen Adhärenz). Quantifizierung der Lokalisation der festen Adhärenz von residenten/inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten in postkapillären Venolen (**B**; MW ± SEM bei n=3 pro Gruppe; * p < 0,05, vs. trizelluläre Endothelzellkontakte).

Ein ähnliches Verhalten von Monozyten und neutrophilen Granulozyten konnte auch hinsichtlich ihres intraluminalen Crawlingweges am postkapillären Gefäßendothel unter CCL2-stimulierten Bedingungen festgestellt werden (vgl. **Abb. 4.12A, B**).

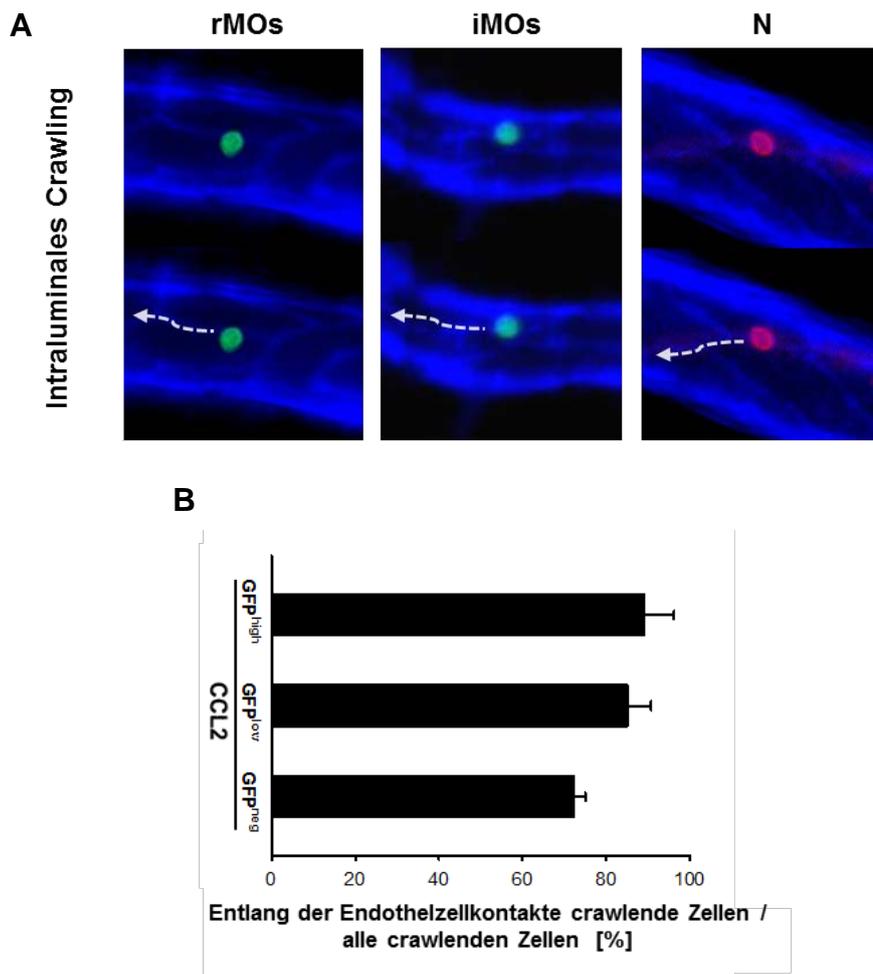


Abb. 4.12: Repräsentative *In-vivo*-Mikroskopie-Aufnahmen des Crawlingverhaltens von residenten/inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten nach CCL2-Stimulation (**A**; grün: GFP⁺ Monozyten; rot: PE-markierte Ly6G⁺ Leukozyten; blau: CD31/PECAM-1⁺ Endothelzellverbindungen; weiße Pfeile: Wege der crawlenden Leukozyten). Quantifizierung der Lokalisation des intraluminalen Crawlings von residenten/inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten in postkapillären Venolen (**B**; MW ± SEM bei n=3 pro Gruppe).

4.1.6 Einfluss von Selektinen auf die einzelnen Schritte der Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs

In den folgenden *In-vivo*-Experimenten wurde am Kremastermodell in CX₃CR-1^{GFP/+}-Mäusen untersucht, wie Selektine die Interaktionen von Leukozyten myeloiden Ursprungs mit dem Gefäßendothel postkapillärer Venolen beeinflussen. Sechs Stunden nach intraskrotaler

Applikation von CCL2 wurden Baseline-Aufnahmen von postkapillären Venolen durchgeführt und anschließend Antikörper gegen die zu untersuchenden Moleküle intraarteriell appliziert. Um direkte Effekte der Moleküle zu analysieren, wurden die Aufnahmen derselben Gefäße nach 5 Minuten wiederholt. Das Verhalten der crawlenden Leukozyten wurde mit einer darauffolgenden Zeitraffer-Aufnahme über 30 Minuten hinweg (siehe Kapitel 4.1.8 und 4.1.9) beobachtet und schließlich wurden dieselben postkapillären Venolen 45 Minuten nach Applikation der blockierenden Antikörper ein drittes Mal aufgenommen (vgl. **Abb. 4.13**).

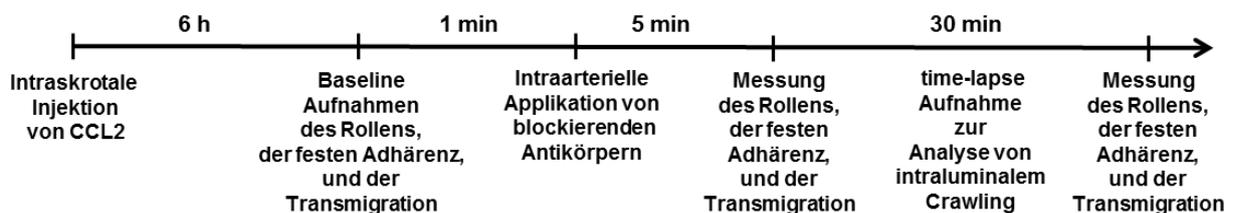


Abb. 4.13: Darstellung des zeitlichen Ablaufs der In-vivo-Experimente am *M. cremaster* von $CX_3CR-1^{GFP/+}$ -Mäusen.

Zunächst wurde der Einfluss von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P und L-Selektin/CD62L auf das Rollverhalten und die feste Adhärenz von neutrophilen Granulozyten sowie von inflammatorischen Monozyten untersucht. Während nach Blockade von L-Selektin/CD62L das Rollen von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten signifikant reduziert war, verhinderte die Blockade von P-Selektin/CD62P das Rollen beider myeloider Leukozytenpopulation vollständig. Im Gegensatz dazu verursachte die Applikation eines anti-CD62E Antiköpers keine signifikante Änderung der Anzahl rollender Leukozyten (vgl. **Abb. 4.14A, B**).

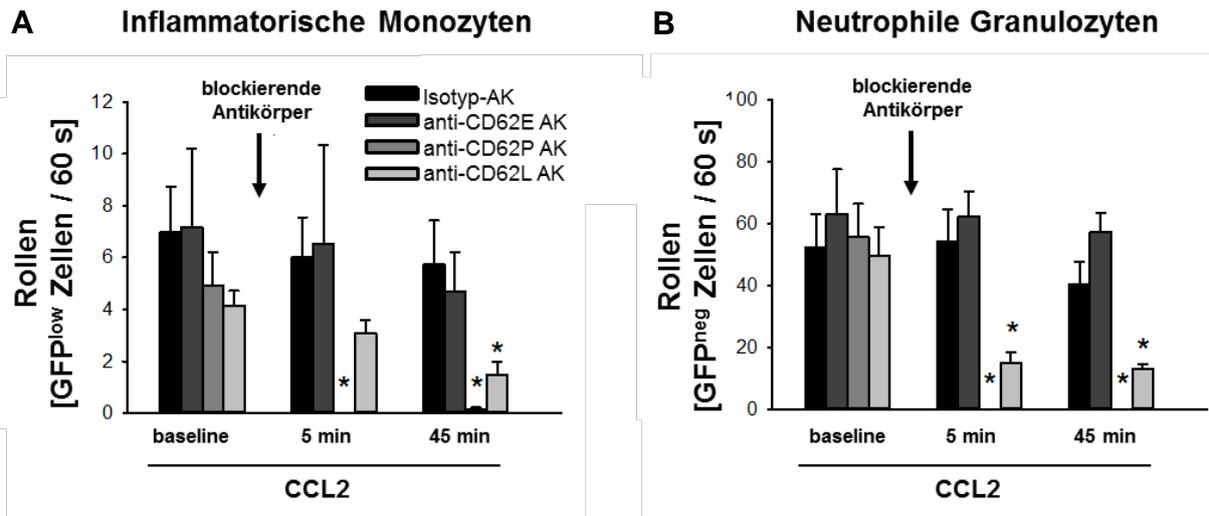


Abb. 4.14: Quantifizierung des Rollens von inflammatorischen Monozyten (**A**) und neutrophilen Granulozyten (**B**) nach Blockade von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P oder L-Selektin/CD62L in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW \pm SEM bei n=5 pro Gruppe; * $p < 0,05$, vs. Isotyp-Antikörper).

Der Vergleich der Rollgeschwindigkeiten von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten unter CCL2-stimulierten Bedingungen zeigte, dass sich inflammatorische Monozyten etwas langsamer bewegten und nach Blockade von E-Selektin/CD62E signifikant schneller rollten (vgl. **Abb. 4.15A**). Dagegen beeinflusste E-Selektin/CD62E die Rollgeschwindigkeit von neutrophilen Granulozyten nicht (vgl. **Abb. 4.15B**). Außerdem hatte die Inhibition von L-Selektin/CD62L keinen Effekt auf die Geschwindigkeit dieser rollenden Leukozyten myeloiden Ursprungs.

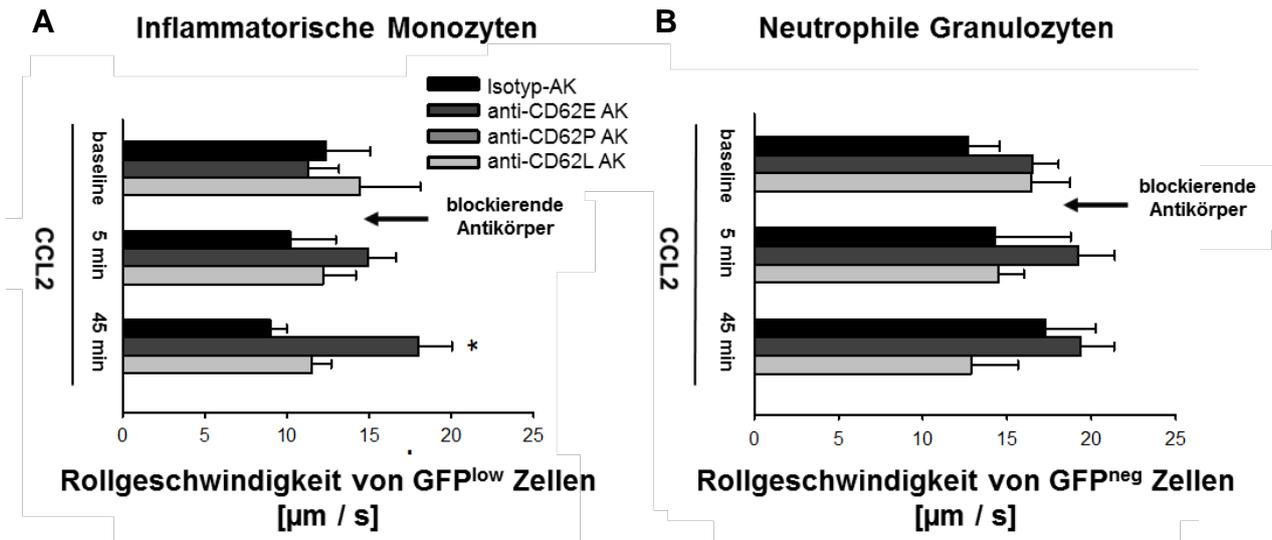


Abb. 4.15: Analyse der Rollgeschwindigkeiten von inflammatorischen Monozyten (A) und neutrophilen Granulozyten (B) nach Blockade von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P oder L-Selektin/CD62L in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW \pm SEM bei n=5 pro Gruppe; * $p < 0,05$, vs. Isotyp-Antikörper).

Die feste Adhärenz von inflammatorischen Monozyten wurde durch keines der drei Selektine beeinflusst (vgl. Abb. 4.16A). Die Anzahl fest adhärenter neutrophiler Granulozyten wurde weder durch Blockade von E-Selektin/CD62E noch durch Inhibition von L-Selektin/CD62L verändert, jedoch verringerte sich die feste Adhärenz dieser Leukozytensubpopulation 45 Minuten nach Blockade von P-Selektin/CD62P signifikant (vgl. Abb. 4.16B).

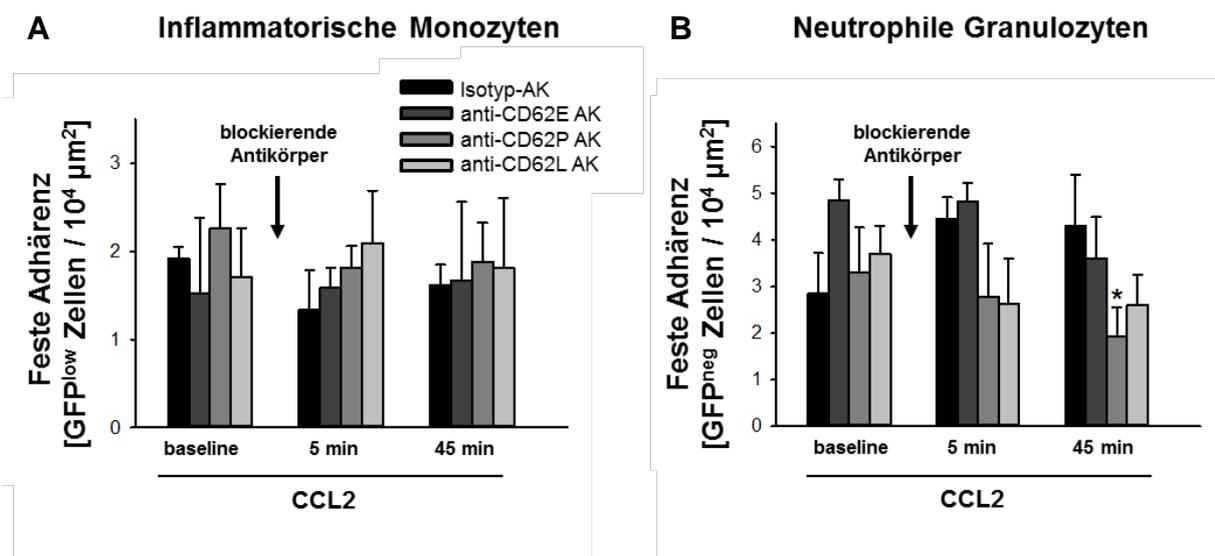


Abb. 4.16: Quantifizierung der festen Adhärenz von inflammatorischen Monozyten (A) und neutrophilen Granulozyten (B) nach Blockade von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P oder L-Selektin/CD62L in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW \pm SEM bei n=5 pro Gruppe; * $p < 0,05$, vs. Isotyp-Antikörper).

4.1.7 Einfluss der Selektinliganden PSGL-1/CD162 und CD44 auf die einzelnen Schritte der Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs

Analog zu den Experimenten mit Selektinblockade (siehe Kapitel 4.1.6) wurde der Einfluss der Selektinliganden PSGL-1/CD162 und CD44 auf die intravaskulären Schritte der Leukozytenrekrutierung nach Stimulation mit CCL2 untersucht. Die Anzahl rollender inflammatorischer Monozyten sowie neutrophiler Granulozyten war nach Blockade von PSGL-1/CD162 oder CD44, verglichen mit der Applikation eines Isotyp-Kontrollantikörpers, signifikant reduziert (vgl. Abb. 4.17A, B).

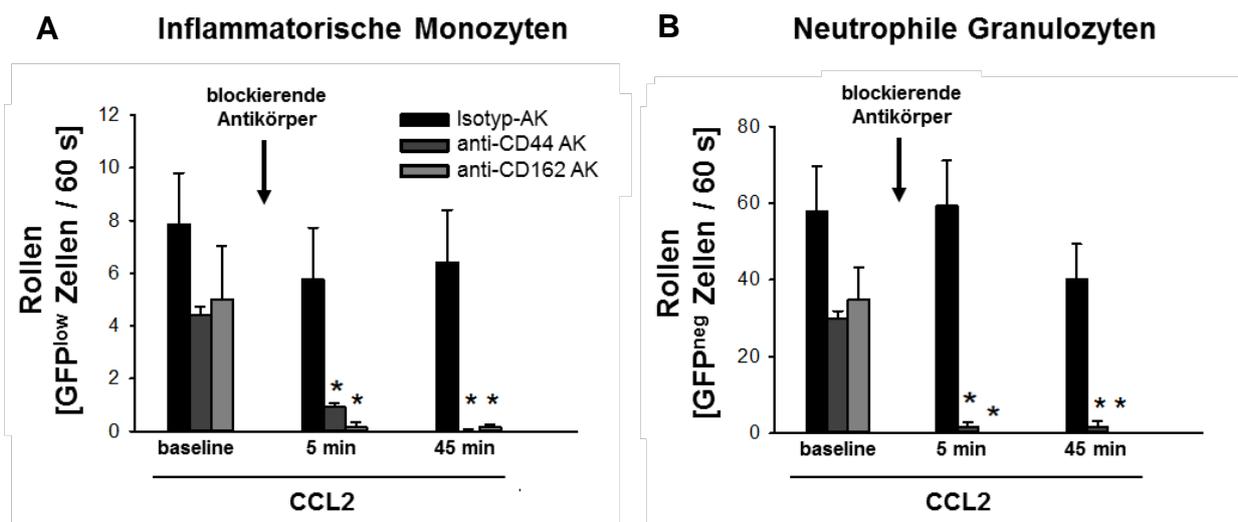


Abb. 4.17: Quantifizierung des Rollens von inflammatorischen Monozyten (A) und neutrophilen Granulozyten (B) nach Blockade von CD44 oder PSGL-1/CD162 in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW ± SEM bei n=4 pro Gruppe; * p < 0,05, vs. Isotyp-Antikörper).

Die Rollgeschwindigkeiten von inflammatorischen Monozyten waren signifikant erhöht, nachdem Interaktionen mit den Selektinliganden PSGL-1/CD162 oder CD44 inhibiert wurden (vgl. Abb. 4.18A). Im Gegensatz dazu wurde die Geschwindigkeit der rollenden neutrophilen Granulozyten durch Blockade von Selektinliganden nicht verändert (vgl. Abb. 4.18B).

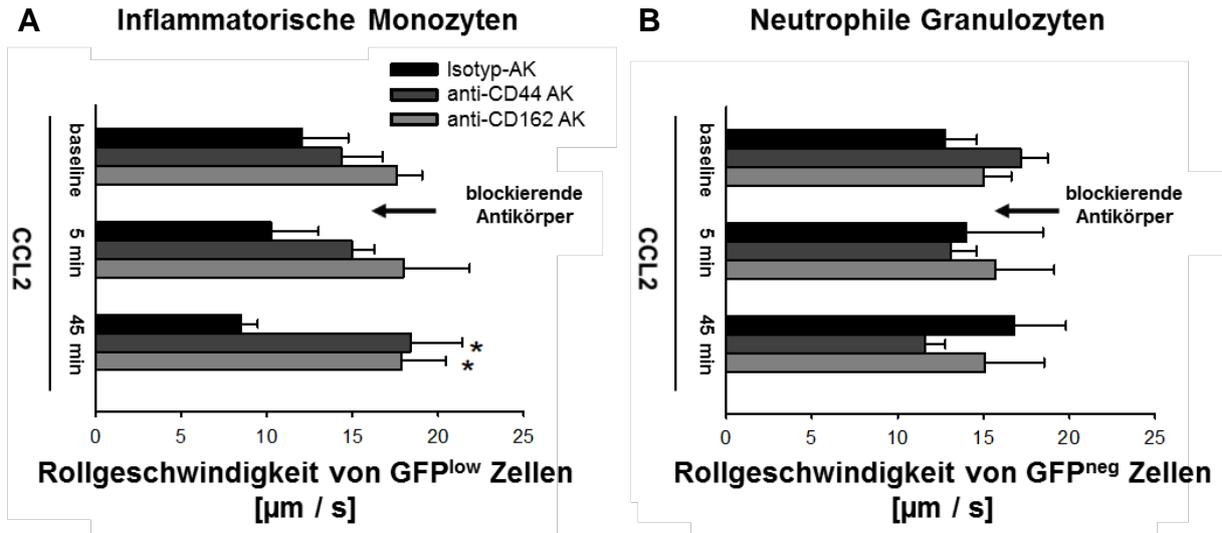


Abb. 4.18: Analyse der Rollgeschwindigkeiten von inflammatorischen Monozyten (A) und neutrophilen Granulozyten (B) nach Blockade von CD44 oder PSGL-1/CD162 in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW \pm SEM bei $n=4$ pro Gruppe; * $p < 0,05$, vs. Isotyp-Antikörper).

Die Anzahl fest adhärenter inflammatorischer Monozyten und neutrophiler Granulozyten wurde unter CCL2-stimulierten Bedingungen durch Blockade der Selektininteraktionspartner PSGL-1/CD162 oder CD44 nicht beeinflusst (vgl. Abb. 4.19A, B).

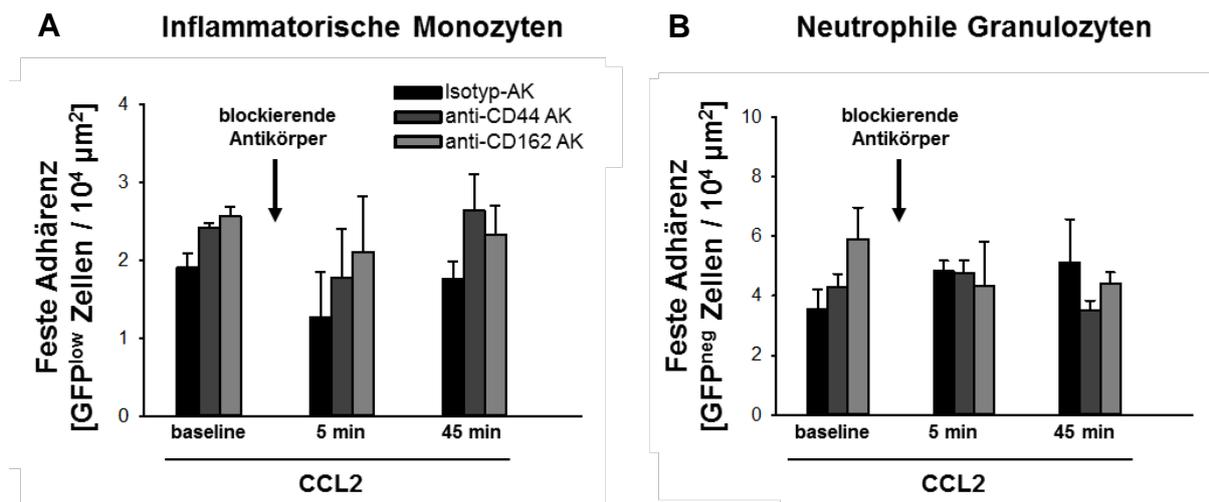


Abb. 4.19: Quantifizierung der festen Adhärenz von inflammatorischen Monozyten (A) und neutrophilen Granulozyten (B) nach Blockade von CD44 oder PSGL-1/CD162 in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW \pm SEM bei $n=4$ pro Gruppe; * $p < 0,05$, vs. Isotyp-Antikörper).

4.1.8 Einfluss von Selektinen auf das intravaskuläre Crawlingverhalten von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten

Am Kremastermuskel von CX₃CR-1^{GFP/+}-Mäusen wurde das intraluminale Crawlingverhalten von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten nach Stimulation mit CCL2 weiter charakterisiert (vgl. **Abb. 4.20**). Dabei wurde der Einfluss von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P und L-Selektin/CD62L auf den Anteil crawlender Zellen an fest adhärenen Zellen, auf die Direktionalität des Crawlings und auf die Crawlinggeschwindigkeit untersucht:

Während sich der Anteil in postkapillären Venolen crawlender inflammatorischer Monozyten nach Blockade von L-Selektin/CD62L signifikant reduzierte, hatte die Blockade von E-Selektin/CD62E oder P-Selektin/CD62P keinen Einfluss auf den Anteil crawlender inflammatorischer Monozyten. Im Vergleich dazu, führte ein deutlich kleinerer Anteil am Gefäßendothel fest adhärenter neutrophiler Granulozyten intraluminale Crawlingbewegungen aus, welcher durch Blockade von Selektinen nicht weiter beeinflusst wurde (vgl. **Abb. 4.20B**).

P-Selektin/CD62P dagegen regulierte die Direktionalität von crawlenden inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten, welche grundsätzlich stärker gerichtete Bewegungen ausführten als Monozyten. E-Selektin/CD62E und L-Selektin/CD62L hatten keine Funktion für die Kontrolle der Direktionalität des Crawlings dieser Leukozytensubpopulationen (vgl. **Abb. 4.20C**).

In der Geschwindigkeit der Crawlingbewegungen unterschieden sich inflammatorische Monozyten und neutrophile Granulozyten kaum. Zudem ließen sich durch die Blockade von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P oder L-Selektin/CD62L keine Effekte auf die Crawlinggeschwindigkeit beobachten (vgl. **Abb. 4.20D**).

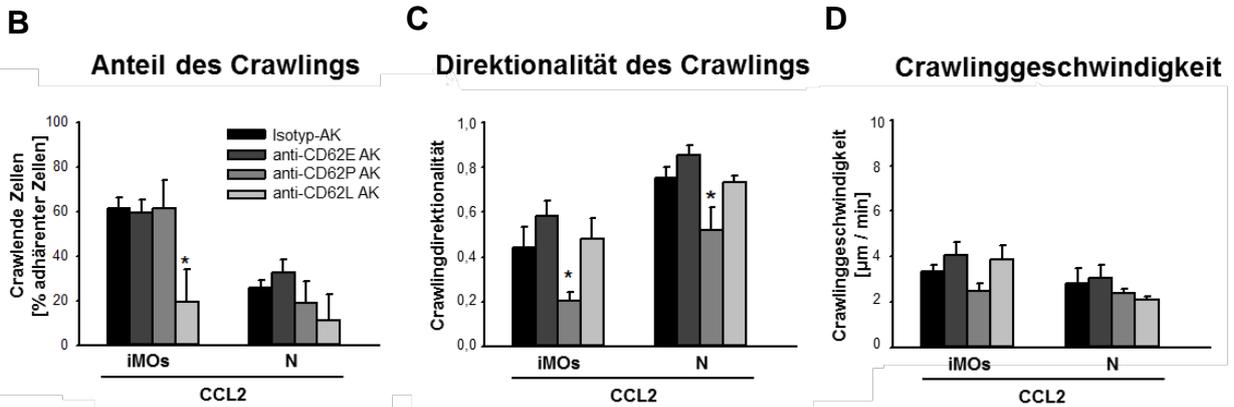
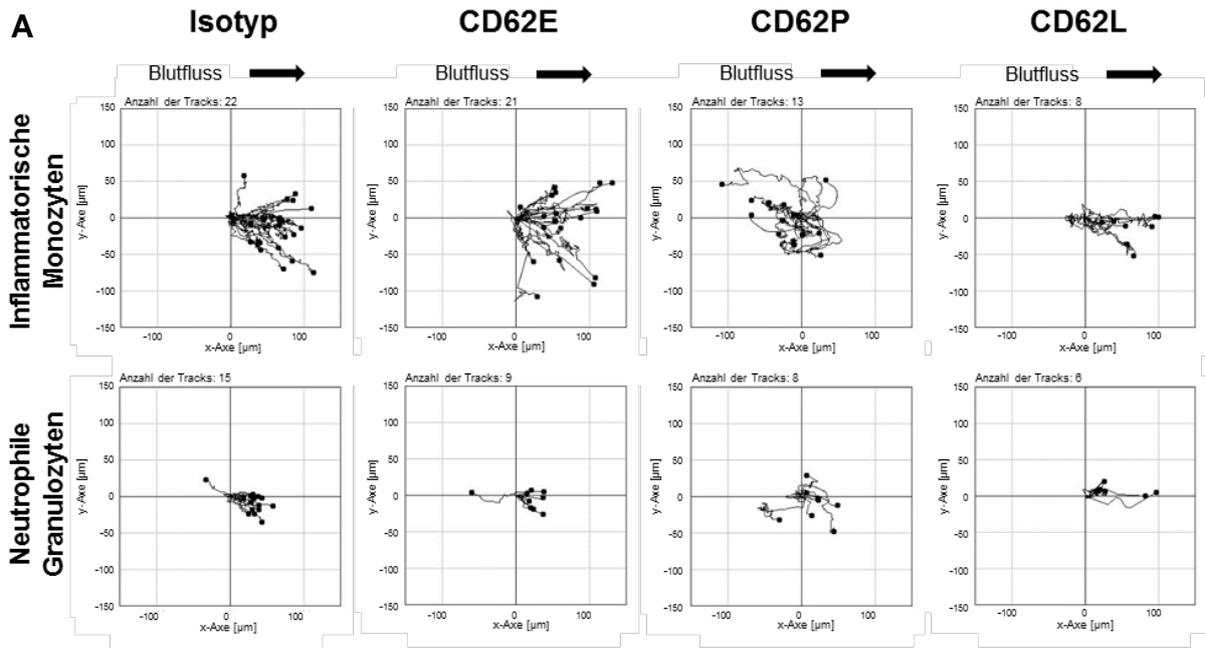


Abb. 4.20: Repräsentative Diagramme zur Visualisierung der Crawlingwege von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten (A). Quantifizierung des Anteils crawlender Leukozyten an adherenten Leukozyten (B), der Crawlingdirektionalität (C) und der Crawlinggeschwindigkeit (D) nach Blockade von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P oder L-Selektin/CD62L in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW \pm SEM bei $n=4$ pro Gruppe; * $p < 0,05$, vs. Isotyp-Antikörper).

4.1.9 Einfluss von Selektinliganden auf das intravaskuläre Crawlingverhalten von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten

Mit Hilfe von *In-vivo*-Mikroskopie wurde die Bedeutung von PSGL-1/CD162 und CD44 für das intraluminale Crawling von Leukozyten myeloiden Ursprungs in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* analog zu Kapitel 4.1.8 studiert (**vgl. Abb. 4.21**).

Während die Inhibition von PSGL-1/CD162 den Anteil crawlender inflammatorischer Monozyten bzw. neutrophiler Granulozyten an fest adhärenen Zellen kaum veränderte, führte die Blockade von CD44 zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl crawlender Leukozyten myeloiden Ursprungs (**vgl. Abb. 4.21B**).

Hinsichtlich der Direktionalität des Crawlings von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten in entzündeten Venolen ließen sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen feststellen (**vgl. Abb. 4.21C**).

Die Crawlinggeschwindigkeit von inflammatorischen Monozyten hingegen war nach Blockade von PSGL-1/CD162 oder CD44 signifikant verringert. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich für die Crawlinggeschwindigkeit von neutrophilen Granulozyten nach Inhibition von PSGL-1/CD162 (**vgl. Abb. 4.21D**).

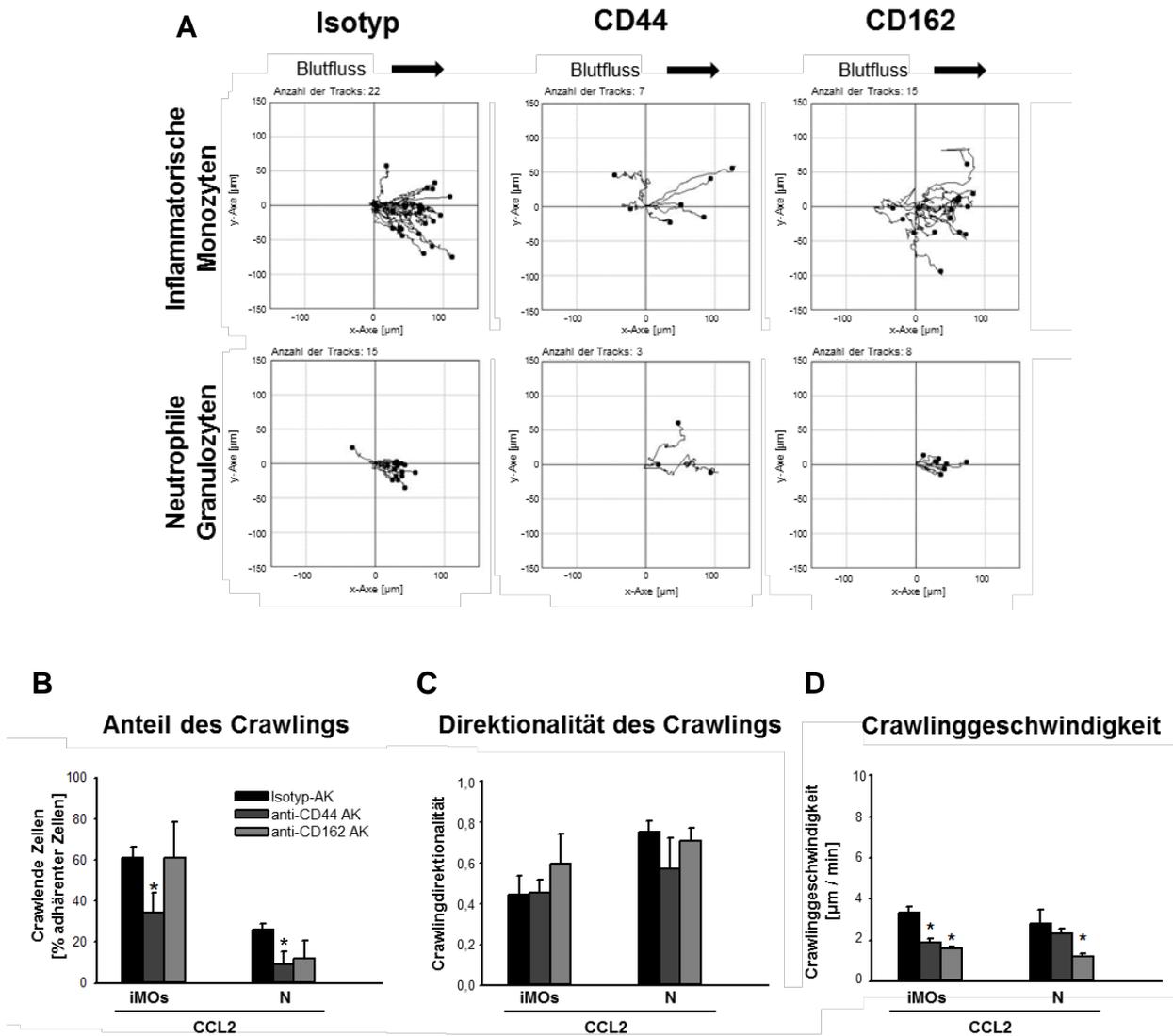


Abb. 4.21: Repräsentative Diagramme zur Visualisierung der Crawlingwege von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten (A). Quantifizierung des Anteils crawlender Leukozyten an adhärenenten Leukozyten (B), der Crawlingdirektionalität (C) und der Crawlinggeschwindigkeit (D) nach Blockade von CD44 oder PSGL-1/CD162 in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW ± SEM bei n=4 pro Gruppe; * p < 0,05, vs. Isotyp-Antikörper).

4.1.10 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Bedeutung von Selektinen

Zusammenfassend werden die Ergebnisse aus den Experimenten zur Analyse des Einflusses von Selektinen und Selektinliganden auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie inflammatorischen Monozyten tabellarisch dargestellt (vgl. **Abb. 4.22**).

	E-Selektin/ CD62E		P-Selektin/ CD62P		L-Selektin/ CD62L		PSGL-1/ CD162		CD44	
	N	iMOs	N	iMOs	N	iMOs	N	iMOs	N	iMOs
Expression	-	-	-	-	+	+	+	++	+	++
Rollen	-	-	++	++	+	+	+	+	+	+
Roll- geschwindigkeit	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Feste Adhärenz	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Anteil des Crawlings	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Crawling- direktionalität	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Crawling- geschwindigkeit	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

Abb. 4.22: Tabellarische Zusammenfassung der Experimente zur Analyse des Einflusses von E-Selektin/CD62E, P-Selektin/CD62P, L-Selektin/CD62L, PSGL-1/CD162 und CD44 auf die einzelnen Schritte der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten (- kein/e Effekt/Expression; + geringe/r bis moderate/r Effekt/Expression; ++ moderate/r bis starke/r Effekt/Expression).

4.1.11 Systemische Leukozytenzahlen und mikrohämodynamische

Parameter

Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsgruppen zu gewährleisten, wurden folgende mikrohämodynamische Parameter sowie die systemische Leukozytenzahl bestimmt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen hinsichtlich des inneren Gefäßdurchmessers, der mittleren Blutfließgeschwindigkeit, der Scherrate sowie der systemischen Leukozytenzahlen festgestellt werden.

Stimulus	Behandlung	Innerer Gefäß-durchmesser [μm]	Mittlere Fließ-geschwindigkeit [mm / s]	Scherrate [1 / s]	Systemische Leukozytenzahlen [* 10^3 / μl]
CCL2	Isotyp-AK	32,6 \pm 1,0	1,1 \pm 0,1	1138,8 \pm 146,6	2,7 \pm 0,6
CCL2	anti-CD62E	33,9 \pm 1,2	1,2 \pm 0,1	1357,9 \pm 138,8	1,4 \pm 0,1
CCL2	anti-CD62P	33,9 \pm 0,7	1,1 \pm 0,1	1308,9 \pm 155,9	2,3 \pm 0,2
CCL2	anti-CD62L	33,1 \pm 0,6	1,3 \pm 0,2	1364,2 \pm 147,7	1,4 \pm 0,5
CCL2	anti-CD162	33,3 \pm 1,5	0,9 \pm 0,1	1108,8 \pm 49,7	2,3 \pm 1,3
CCL2	anti-CD44	34,0 \pm 0,7	1,1 \pm 0,2	1172,5 \pm 289,2	2,3 \pm 0,9

4.2 Untersuchungen zur Bedeutung von Integrinen für die Extravasation von Leukozyten myeloiden Ursprungs

4.2.1 Expressionsanalyse von LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d auf der Oberfläche von Leukozyten myeloiden Ursprungs

Analog zu den Untersuchungen zur Expression von Selektinen wurden zunächst die Expressionsprofile der Integrine LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d auf der Oberfläche von Leukozyten myeloiden Ursprungs mit Hilfe von konfokalmikroskopischen und durchflusszytometrischen Methoden analysiert. Dabei wurde gezeigt, dass das β 2-Integrin LFA-1/CD11a stärker auf der Oberfläche von unstimulierten inflammatorischen Monozyten als auf unstimulierten residenten Monozyten oder neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (**vgl. Abb. 4.23A**). Nach Aktivierung mit CCL2 oder PMA war die Oberflächenexpression dieses Moleküls auf inflammatorischen Monozyten signifikant reduziert. Ebenso war die Expression von LFA-1/CD11a auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit PMA signifikant verringert. Das β 2-Integrin Mac-1/CD11b war von unstimulierten Leukozyten myeloiden Ursprungs nur schwach präsentiert (**vgl. Abb. 4.23B**). Nach Aktivierung der Zellen mit PMA wurde die Expression dieses Moleküls auf neutrophilen Granulozyten, residenten und inflammatorischen Monozyten jedoch signifikant erhöht. Im Vergleich der drei untersuchten Integrine zeigte das β 1-Integrin VLA-4/CD49d die höchste Expression auf der Oberfläche von inflammatorischen Monozyten, welche nach Stimulation mit PMA signifikant erhöht wurde (**vgl. Abb. 4.23C**). Dieses Integrin wurde von residenten Monozyten weitaus geringer präsentiert und konnte auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten kaum detektiert werden.

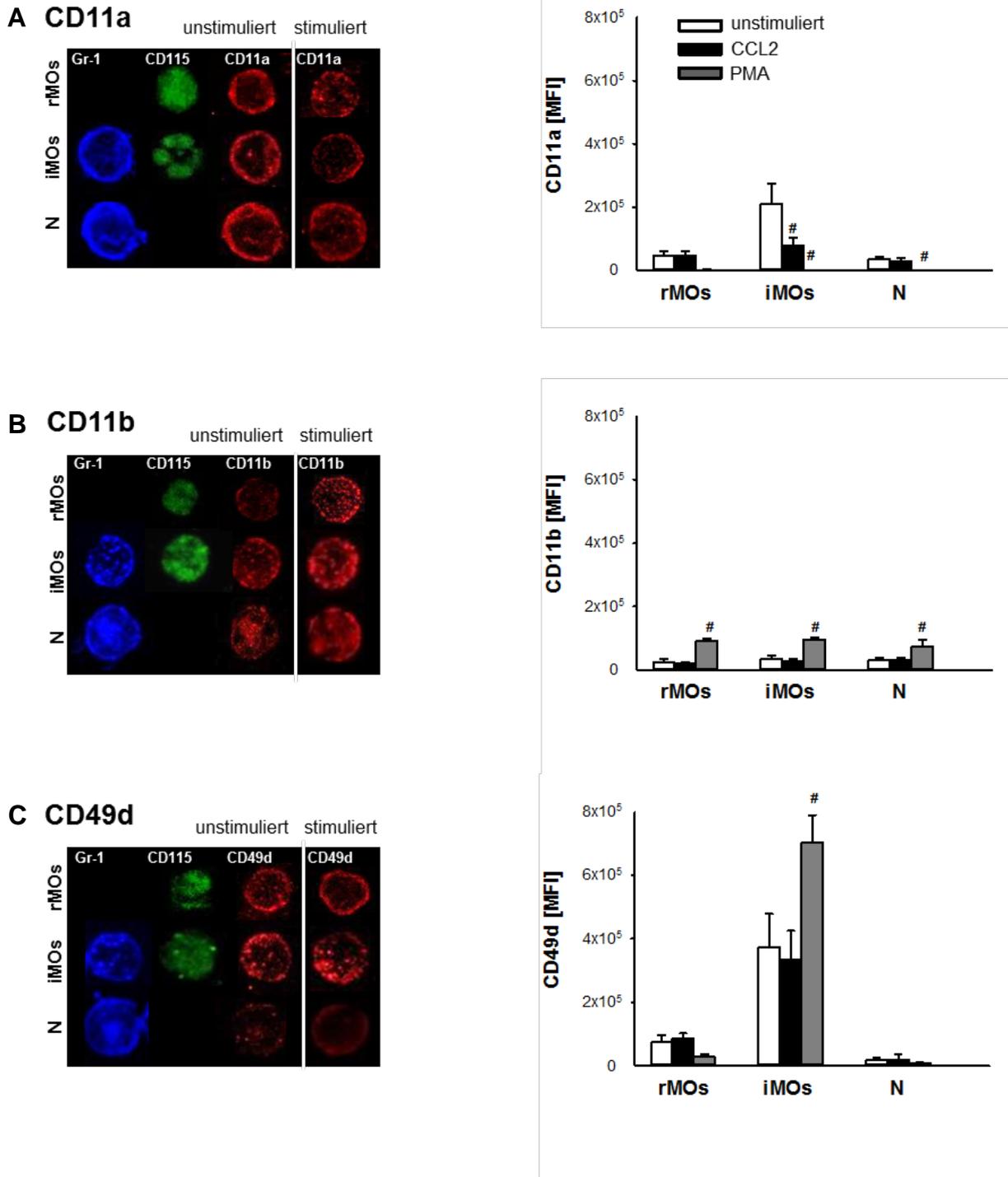


Abb. 4.23: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von LFA-1/CD11a (A), Mac-1/CD11b (B) und VLA-4/CD49d (C) auf der Oberfläche von aus dem Vollblut isolierten murinen Leukozyten vor und nach Stimulation mit CCL2 (linke Spalte). Die Graphen zeigen durchflusszytometrisch ermittelte Werte für die Expression dieser Moleküle unter unstimulierten bzw. CCL2- oder PMA-stimulierten Bedingungen (A, B, C, rechte Spalte; MW ± SEM bei n=7 pro Gruppe; # p < 0,05, vs. unstimuliert).

4.2.2 Expressionsanalyse von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A in der Mikrovaskulatur

Die Expressionsprofile der Immunglobuline ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A wurden in der entzündeten und nicht-entzündeten Mikrovaskulatur des *M. cremaster* analysiert. Zunächst wurde die Expression der Proteine in der Mikrovaskulatur auf mRNA-Ebene untersucht (vgl. **Abb. 4.24A**): Während sich der mRNA-Gehalt von ICAM-2/CD102, PECAM-1/CD31 und JAM-A im gesamten Kremastermuskel nach Stimulation mit CCL2 nicht veränderte, stieg der mRNA-Gehalt von VCAM-1/CD106 oder ICAM-1/CD54 mit der Dauer der CCL2-Stimulation an. Dabei wurde die maximale Expression von ICAM-1/CD54 bereits nach 4 Stunden, die maximale Expression von VCAM-1/CD106 dagegen erst nach 6 Stunden erreicht.

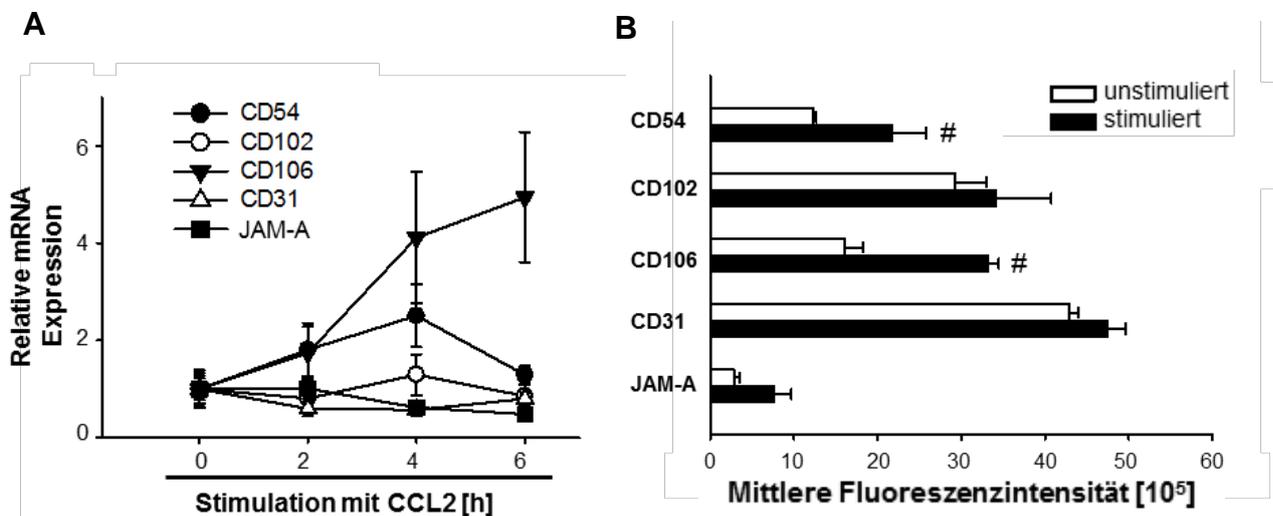


Abb. 4.24: Quantifizierung des mRNA-Gehaltes von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A im Kremastermuskel nach CCL2-Stimulation (**A**; MW \pm SEM bei n=4 pro Gruppe). Analyse der Fluoreszenzintensitäten von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A in postkapillären Venolen des Kremastermuskels vor und nach CCL2-Stimulation (**B**; MW \pm SEM bei n=4 pro Gruppe; # p < 0,05, vs. unstimuliert).

Mit Hilfe der Konfokalmikroskopie wurden diese Erkenntnisse anschließend auf Proteinebene untersucht und durch Messung der Fluoreszenzintensitäten quantifiziert (**vgl. Abb. 4.24B, 25**). Unter unstimulierten Bedingungen waren die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, PECAM-1/CD31 und JAM-A auf Endothelzellen der postkapillären Venolen des *M. cremaster* vorhanden, während VCAM-1/CD106 kaum detektiert werden konnte. Nach sechsständiger Stimulation mit CCL2 wurden die Mitglieder Immunglobulin-Superfamilie ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 stärker in postkapillären Venolen der Mikrovaskulatur exprimiert. Die Stimulation mit CCL2 hatte dagegen keinen Einfluss auf die Expression von ICAM-2/CD102, PECAM-1/CD31 und JAM-A auf dem Endothel der postkapillären Venolen des *M. cremaster*. Bezüglich der Lokalisation von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106 und JAM-A zu Endothelzellverbindungen, welche durch Anfärbung von PECAM-1/CD31 visualisiert wurden, konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Alle untersuchten Moleküle waren diffus über das Endothel der postkapillären Venolen verteilt.

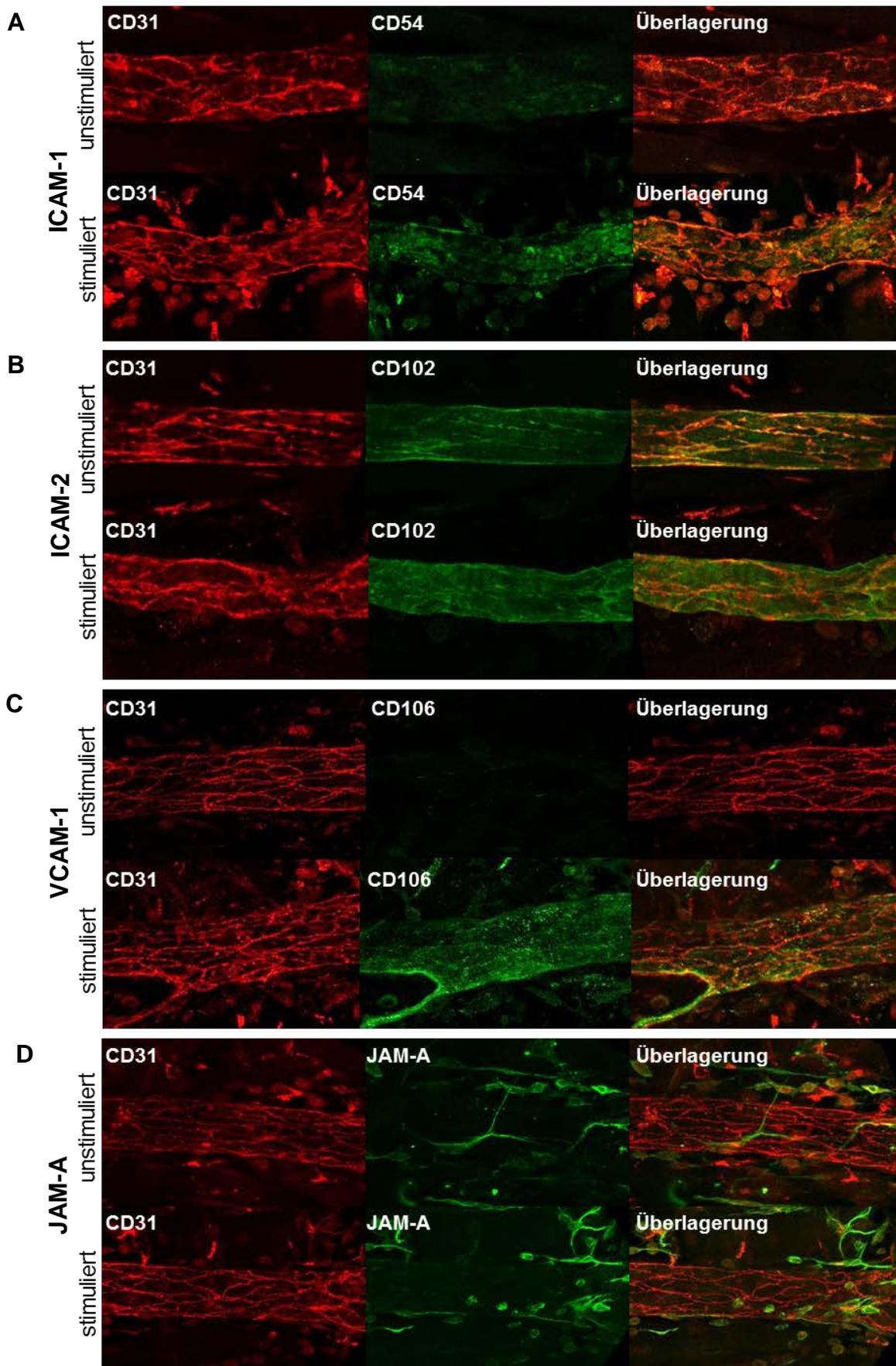


Abb. 4.25: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A in Mikrogefäßen des *M. cremaster* vor und nach Stimulation mit CCL2 (A, B, C, D).

4.2.3 Einfluss von β 1- und β 2-Integrinen und Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie auf die CCL2-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten

Im Peritonitismodell wurden die Effekte der Integrine LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d (vgl. Abb. 4.26A, B, C) sowie von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A (vgl. Abb. 4.27A, B, C) auf die CCL2-induzierte Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten untersucht. Während alle drei untersuchten Integrine die Extravasation von neutrophilen Granulozyten in die entzündete Peritonealhöhle beeinflussten, führten nur die Blockade von Mac-1/CD11b oder, in stärkerem Maß, von VLA-4/CD49d zu einer signifikanten Reduktion der ausgewanderten inflammatorischen Monozyten.

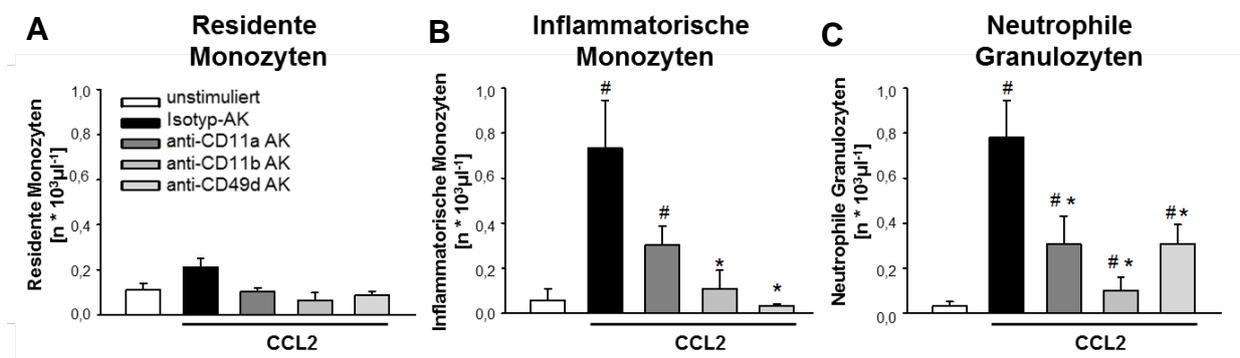


Abb. 4.26: Quantifizierung der in die Peritonealhöhle eingewanderten residenten Monozyten (A), inflammatorischen Monozyten (B) und neutrophilen Granulozyten (C) nach Blockade von LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d nach Stimulation mit CCL2 (MW \pm SEM bei n=7 pro Gruppe; # p < 0,05, vs. PBS; * p < 0,05, vs. unstimuliert).

Deutlich weniger Einfluss auf die CCL2-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten hatten ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A. Im Gegensatz dazu verringerte sich die Anzahl an inflammatorischen Monozyten, welche in die stimulierte Peritonealhöhle einwanderten, nach Blockade von ICAM-1/CD54 oder VCAM-1/CD106 signifikant.

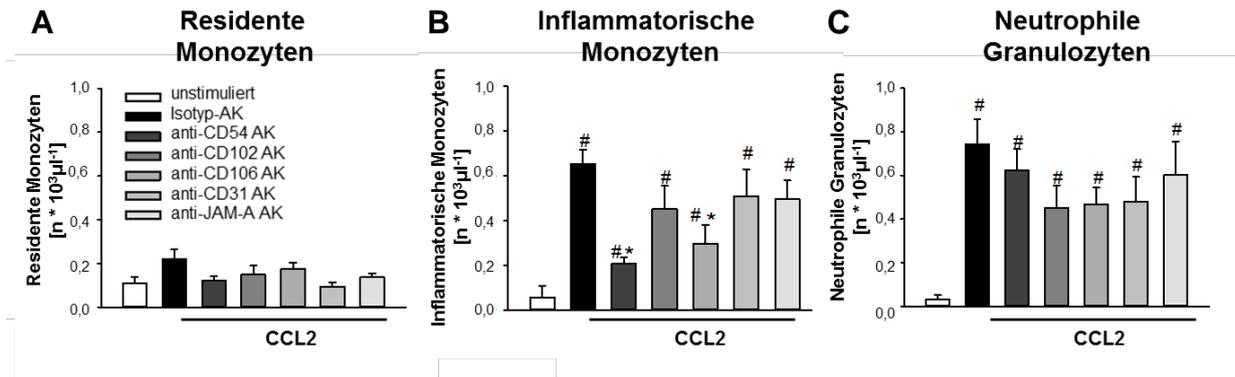


Abb. 4.27: Quantifizierung der in die Peritonealhöhle eingewanderten residenten Monozyten (A), inflammatorischen Monozyten (B) und neutrophilen Granulozyten (C) nach Blockade von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A unter CCL2-stimulierten Bedingungen (MW \pm SEM bei n=7 pro Gruppe; # p < 0,05, vs. PBS; * p < 0,05, vs. unstimuliert).

4.2.4 Einfluss von LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d auf die einzelnen Schritte der Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs

Wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben, wurde die *In-vivo*-Mikroskopie in CX₃CR-1^{GFP/+}-Mäusen verwendet, um die einzelnen Schritte der Extravasation von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten in das entzündete Gewebe des *M. cremaster* zu analysieren. Dabei wurden die Experimente nach dem Protokoll aus Kapitel 4.1.6 (vgl. **Abb. 4.13**) durchgeführt, welches sich für die Untersuchung der direkten Effekte der untersuchten Moleküle unter CCL2-stimulierten Bedingungen eignete.

Zunächst wurde der Einfluss der Integrine LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d auf das Rollen, die Rollgeschwindigkeit, die feste Adhärenz sowie die Transmigration von inflammatorischen Monozyten untersucht (vgl. **Abb. 4.28A, B, C, D**): Die Blockade des β 1-Integrins VLA-4/CD49d führte zu einer Reduktion des Rollens von inflammatorischen Monozyten, beschleunigte deren Rollgeschwindigkeit und verringerte die Anzahl an fest adhärennten inflammatorischen Monozyten signifikant. Das β 2-Integrin Mac-1/CD11b

regulierte nur das Rollen dieser Leukozytensubpopulation, während das $\beta 2$ -Integrin LFA-1/CD11a die einzelnen Schritte der Extravasation von inflammatorischen Monozyten nicht beeinflusste. Durch Blockade der untersuchten $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Integrine wurde die Transmigration von inflammatorischen Monozyten nicht verändert.

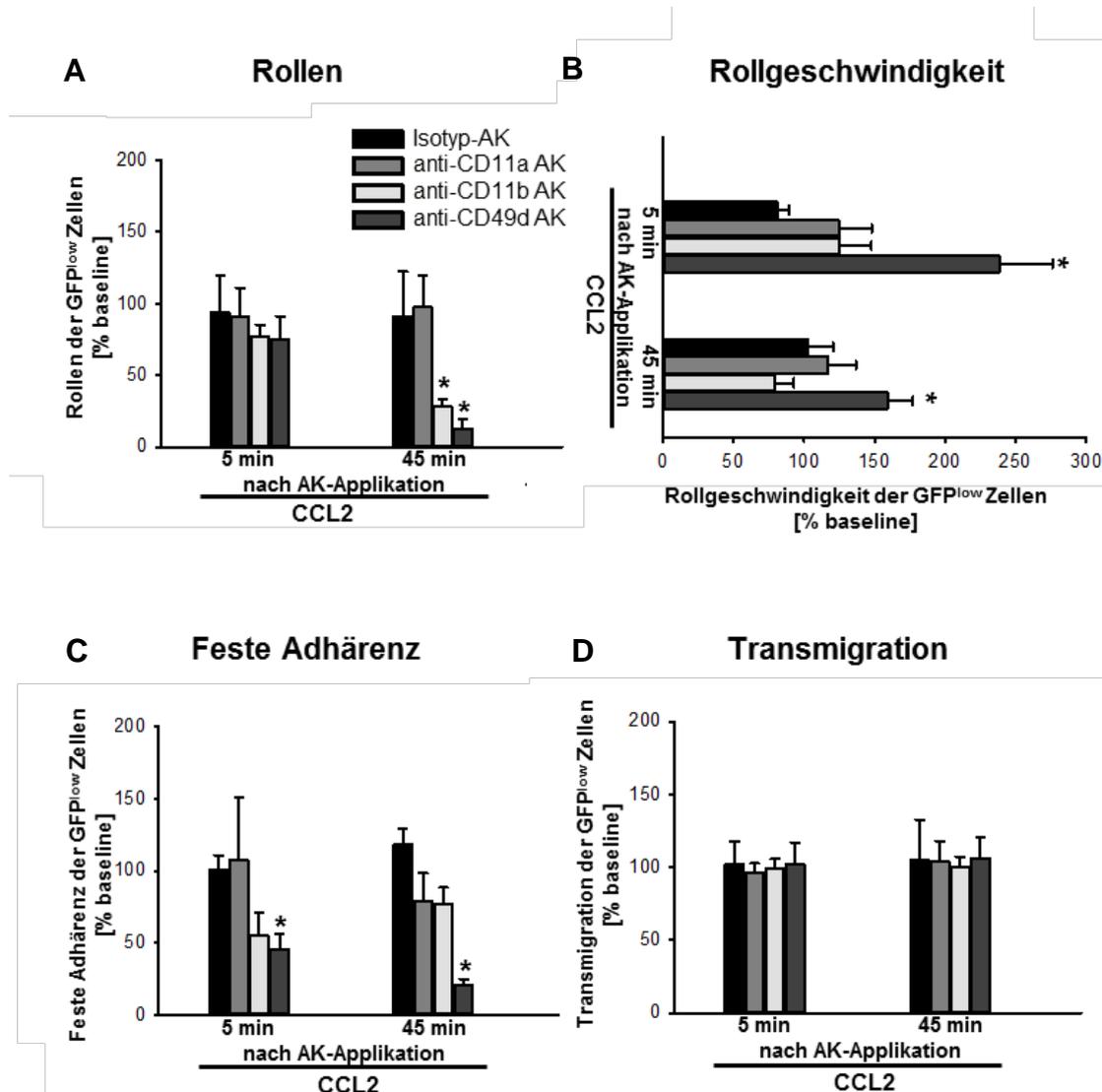


Abb. 4.28: Analyse des Rollens (A), der Rollgeschwindigkeit (B), der festen Adhärenz (C) und der Transmigration (D) von inflammatorischen Monozyten nach Blockade von LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW \pm SEM bei n=4 pro Gruppe; * $p < 0,05$, vs. Isotyp-Antikörper).

Im Anschluss wurden die einzelnen Schritte der Extravasation von neutrophilen Granulozyten analysiert (vgl. Abb. 4.29A, B, C, D): Die Integrine LFA-1/CD11a, Mac-

1/CD11b und VLA-4/CD49d hatten weder Einfluss auf das Rollen noch auf die Rollgeschwindigkeit von neutrophilen Granulozyten. Jedoch wurde die feste Adhärenz von neutrophilen Granulozyten durch Blockade der β 2-Integrine LFA-1/CD11a oder Mac-1/CD11b signifikant reduziert. Keines der untersuchten Integrine beeinflusste die Transmigration von neutrophilen Granulozyten direkt.

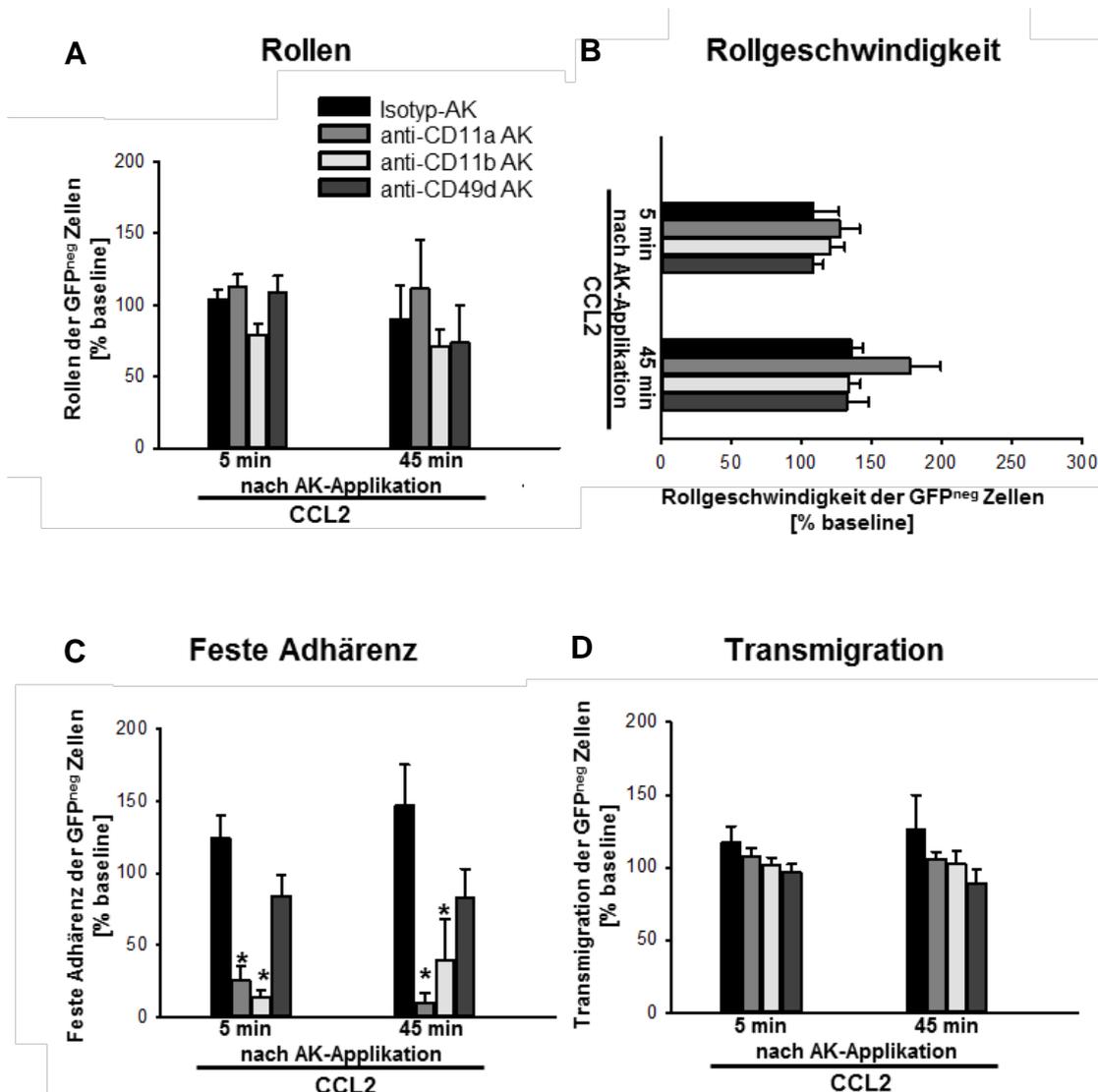


Abb. 4.29: Analyse des Rollens (A), der Rollgeschwindigkeit (B), der festen Adhärenz (C) und der Transmigration (D) von neutrophilen Granulozyten nach Blockade von LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW \pm SEM bei n=4 pro Gruppe; * p < 0,05, vs. Isotyp-Antikörper).

4.2.5 Einfluss von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A auf die einzelnen Schritte der Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs

Analog zu Kapitel 4.2.4 wurden ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A bezüglich ihrer Funktion für die einzelnen Schritte der Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten untersucht.

Im ersten Schritt wurde der Einfluss der Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie auf das Rollen, die Rollgeschwindigkeit, die feste Adhärenz sowie die Transmigration von inflammatorischen Monozyten analysiert (**vgl. Abb. 4.30A, B, C, D**): Während ICAM-1/CD54 das Rollen von inflammatorischen Monozyten regulierte, kontrollierte VCAM-1/CD106 die Rollgeschwindigkeit dieser Leukozytensubpopulation. Außerdem wurde die feste Adhärenz der inflammatorischen Monozyten direkt nach Blockade von VCAM-1/CD106 signifikant verringert; die Blockade von ICAM-1/CD54 dagegen führte erst nach 45 Minuten zu einer Reduktion der festen Adhärenz. Keines der untersuchten Moleküle beeinflusste die Transmigration von inflammatorischen Monozyten direkt.

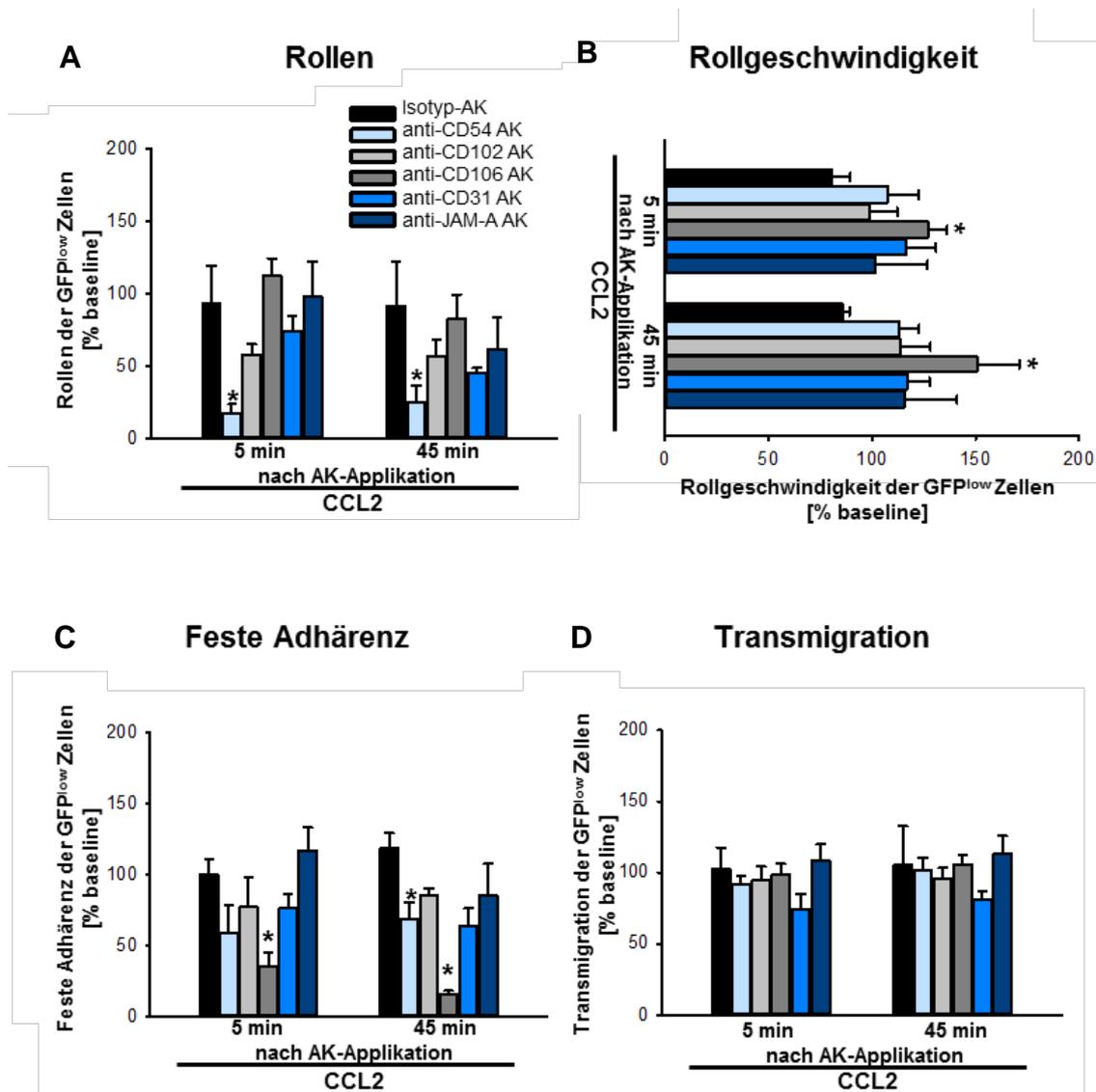


Abb. 4.30: Analyse des Rollens (A), der Rollgeschwindigkeit (B), der festen Adhärenz (C) und der Transmigration (D) von inflammatorischen Monozyten nach Blockade von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW \pm SEM bei $n=5$ pro Gruppe; * $p < 0,05$, vs. Isotyp-Antikörper).

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Immunglobuline auf die einzelnen Schritte der Extravasation von neutrophilen Granulozyten untersucht (vgl. Abb. 4.31A, B, C, D): Die Blockade von ICAM-1/CD54 verringerte das Rollen der neutrophilen Granulozyten unter CCL2-stimulierten Bedingungen. Die Rollgeschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten allerdings wurde durch Blockade der Immunglobuline nicht verändert. Im Gegensatz dazu waren ICAM-1/CD54 und PECAM-1/CD31 für die direkte Regulation der festen Adhärenz

dieser Immunzellen verantwortlich. Des Weiteren wurde die Transmigration der neutrophilen Granulozyten direkt nach Blockade von ICAM-1/CD54 signifikant reduziert

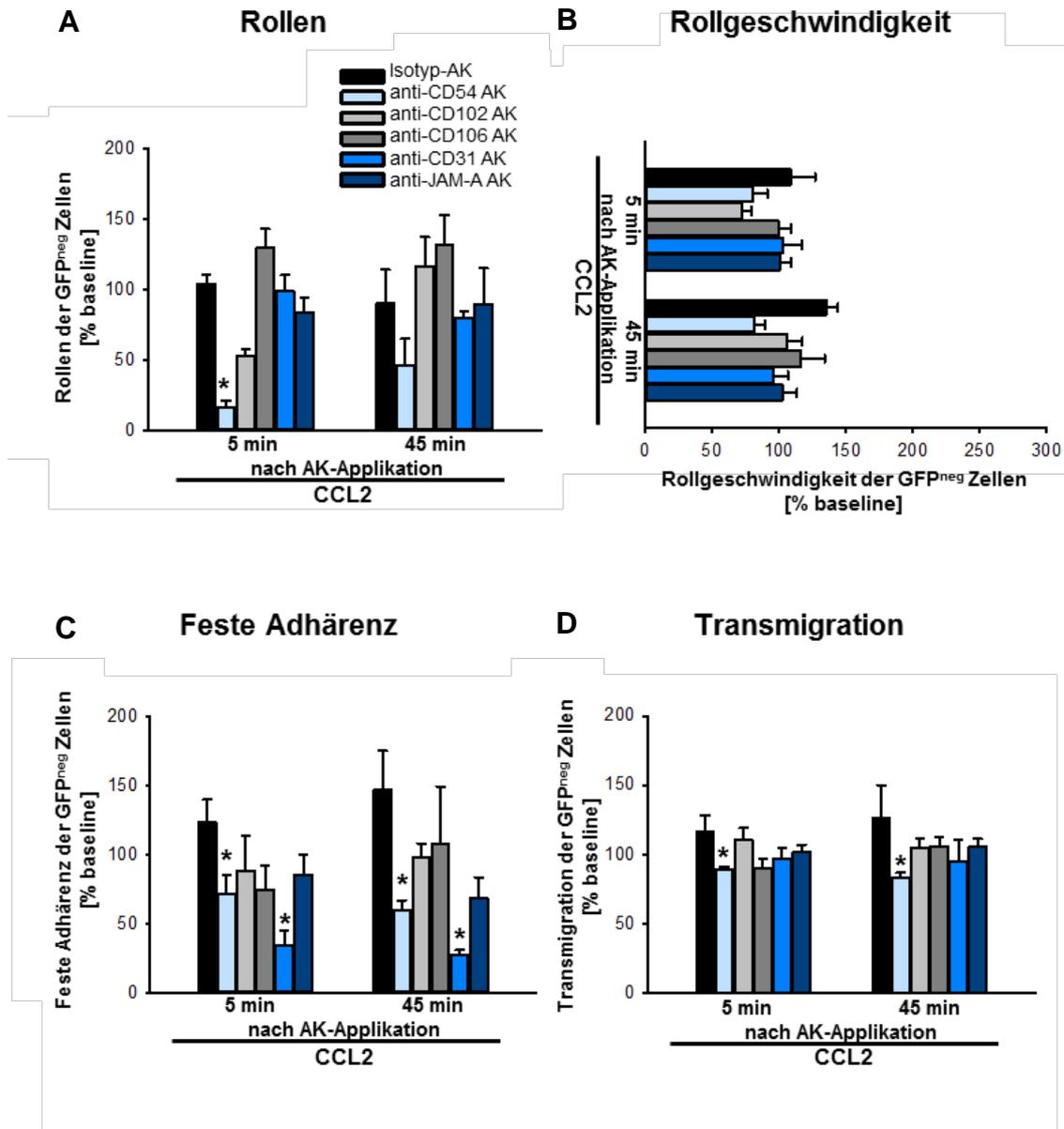


Abb. 4.31: Analyse des Rollens (A), der Rollgeschwindigkeit (B), der festen Adhärenz (C) und der Transmigration (D) von neutrophilen Granulozyten nach Blockade von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW ± SEM bei n=5 pro Gruppe; * p < 0,05, vs. Isotyp-Antikörper).

4.2.6 Einfluss von LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d auf das intravaskuläre Crawlingverhalten von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten

Das intraluminale Crawlingverhalten von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten wurde in postkapillären Venolen des *M. cremaster* nach Stimulation mit CCL2 charakterisiert. Mit Hilfe von *In-vivo*-Mikroskopie wurde der Einfluss von LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d auf den Anteil crawlender Zellen an fest adhären Zellen, auf die Direktionalität des Crawlings und auf die Crawlinggeschwindigkeit untersucht (**vgl. Abb. 4.32**).

Der Anteil der intraluminal crawlenden inflammatorischen Monozyten verringerte sich nach Blockade von VLA-4/CD49d signifikant. Während die untersuchten Integrine keinen Einfluss auf die Direktionalität der Crawlingbewegung der inflammatorischen Monozyten hatten, wurde deren Crawlinggeschwindigkeit durch das β 1-Integrin LFA-1/CD11a reguliert (**vgl. Abb. 4.32B, C, D**).

Im Gegensatz dazu, wurde der Anteil crawlender neutrophiler Granulozyten durch Mac-1/CD11b kontrolliert. Die Direktionalität der Crawlingbewegung der neutrophilen Granulozyten war unabhängig von den untersuchten β 1- und β 2-Integrinen. Die Geschwindigkeit der Crawlingbewegungen der neutrophilen Granulozyten wurde, wie die der inflammatorischen Monozyten, nach Blockade von LFA-1/CD11a signifikant reduziert (**vgl. Abb. 4.32B, C, D**).

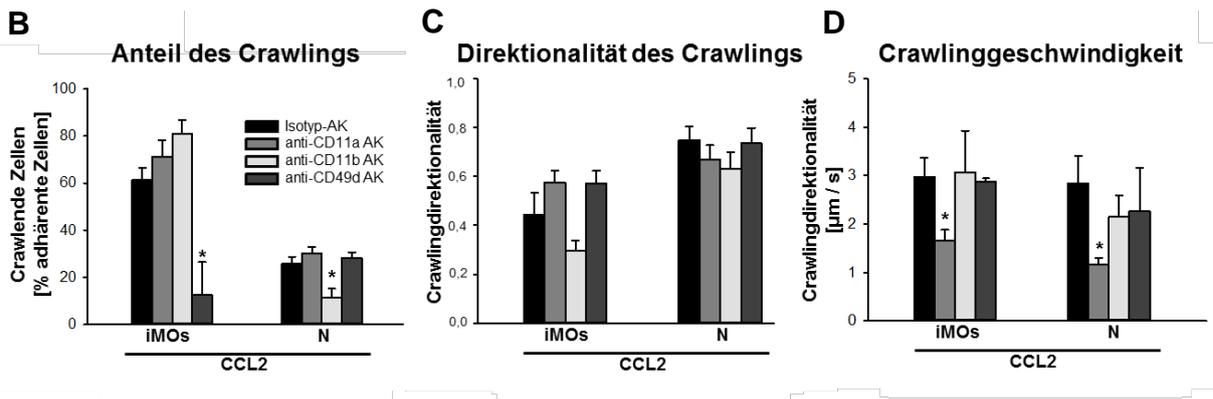
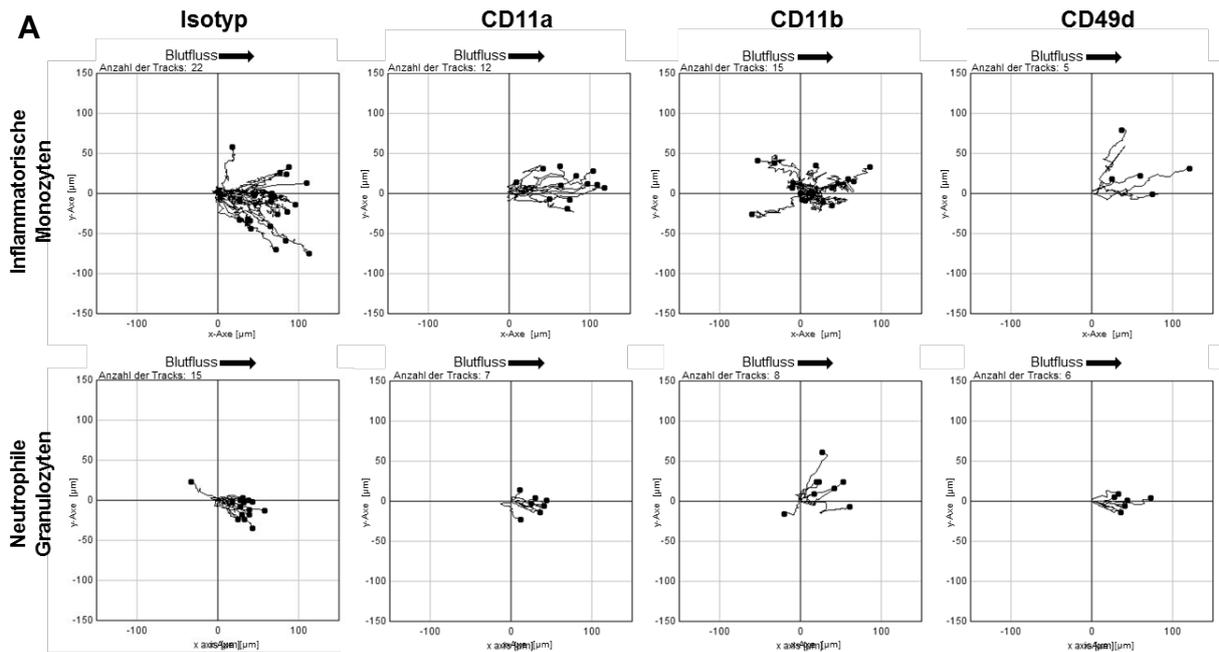


Abb. 4.32: Repräsentative Diagramme zur Visualisierung der Crawlingwege von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten (A). Quantifizierung des Anteils crawlender Leukozyten an adhärenente Leukozyten (B), der Crawlingdirektionalität (C) und der Crawlinggeschwindigkeit (D) nach Blockade von LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW ± SEM bei n=4 pro Gruppe; * p < 0,05, vs. Isotyp-Antikörper).

4.2.7 Einfluss von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A auf das intravaskuläre Crawlingverhalten von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten

Analog zu Kapitel 4.2.6 wurde das Crawling von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten unter stimulierten Bedingungen beobachtet und der Einfluss der Immunglobuline ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A analysiert (vgl. **Abb. 4.33A**).

Durch Blockade von VCAM-1/CD106 wurde der Anteil an crawlenden inflammatorischen Monozyten signifikant reduziert, während die untersuchten Immunglobuline deren Crawlingdirektionalität nicht beeinflussten. Die Geschwindigkeit der Crawlingbewegungen von inflammatorischen Monozyten dagegen wurde durch ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 kontrolliert (vgl. **Abb. 4.33B, C, D**).

Die untersuchten Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie dagegen hatten weder Einfluss auf den Anteil der intraluminal crawlenden neutrophilen Granulozyten noch auf die Direktionalität der Crawlingbewegungen dieser Immunzellen. Lediglich die Blockade von ICAM-1/CD54 führte zu einer signifikanten Reduktion der Crawlingbewegungen der neutrophilen Granulozyten in CCL2-stimulierten Gefäßen (vgl. **Abb. 4.33B, C, D**).

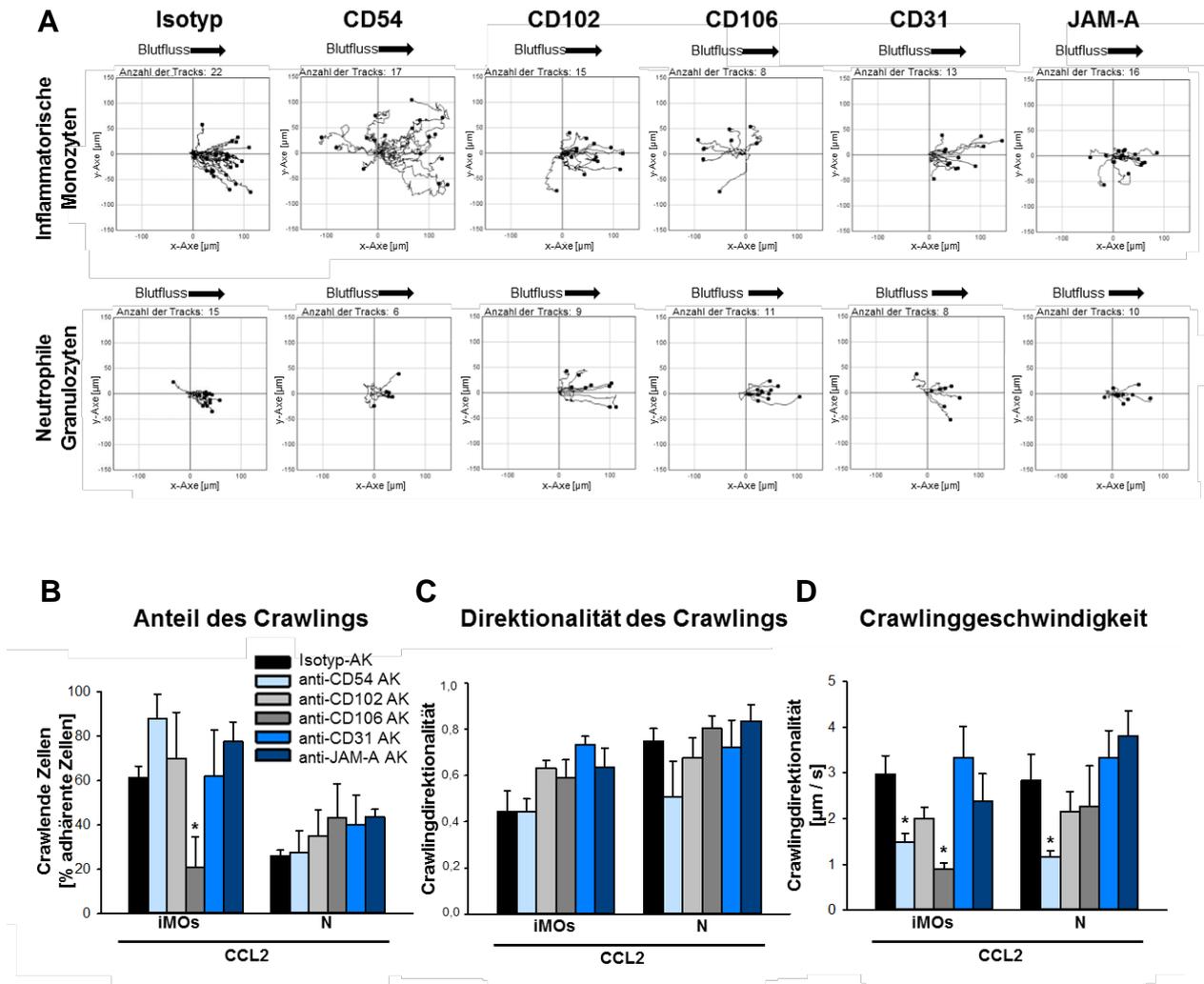


Abb. 4.33: Repräsentative Diagramme zur Visualisierung der Crawlingwege von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten (A). Quantifizierung des Anteils crawlender Leukozyten an adherenten Leukozyten (B), der Crawlingdirektionalität (C) und der Crawlinggeschwindigkeit (D) nach Blockade von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A in postkapillären CCL2-stimulierten Venolen des *M. cremaster* (MW \pm SEM bei $n=4$ pro Gruppe; * $p < 0,05$, vs. Isotyp-Antikörper).

4.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Bedeutung von Integrinen

Zusammenfassend werden die Ergebnisse aus den Experimenten zur Analyse des Einflusses von Integrinen und Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie inflammatorischen Monozyten tabellarisch dargestellt (vgl. **Abb. 4.34**).

	LFA-1/ CD11a		Mac-1/ CD11b		VLA-4/ CD49d		ICAM-1/ CD54		ICAM-2/ CD102		VCAM-1/ CD106		PECAM-1/ CD31		JAM-A	
	N	iMOs	N	iMOs	N	iMOs	N	iMOs	N	iMOs	N	iMOs	N	iMOs	N	iMOs
Expression	+	+	+	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rollen	-	-	-	+	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Roll- geschwindigkeit	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Feste Adhärenz	+	-	+	-	-	++	+	+	-	-	-	++	++	-	-	-
Anteil des Crawlings	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Crawling- direktionalität	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crawling- geschwindigkeit	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Abb. 4.34: Tabellarische Zusammenfassung der Experimente zur Analyse des Einflusses von LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d sowie von ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A auf die einzelnen Schritte der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten (- kein/e Effekt/Expression; + geringe/r bis moderate/r Effekt/Expression; ++ moderate/r bis starke/r Effekt/Expression).

4.2.9 Systemische Leukozytenzahlen und mikrohämodynamische Parameter

Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsgruppen zu gewährleisten, wurden folgende mikrohämodynamische Parameter sowie die systemische Leukozytenzahl bestimmt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen hinsichtlich des inneren Gefäßdurchmessers, der mittleren Blutfließgeschwindigkeit, der Scherrate sowie der systemischen Leukozytenzahlen festgestellt werden.

Stimulus	Behandlung	Innerer Gefäß-	Mittlere Fließ-	Scherrate	Systemische
		durchmesser	geschwindigkeit	[1 / s]	Leukozytenzahlen
		[μm]	[mm / s]		[$\cdot 10^3 / \mu\text{l}$]
CCL2	Isotyp-AK	36,6 \pm 1,6	1,1 \pm 0,1	1138,8 \pm 146,6	2,3 \pm 0,8
CCL2	anti-CD11a	33,1 \pm 1,4	1,0 \pm 0,1	1173,9 \pm 65,9	4,3 \pm 1,1
CCL2	anti-CD11b	33,7 \pm 1,5	1,0 \pm 0,0	1214,5 \pm 78,8	5,3 \pm 1,3
CCL2	anti-CD49d	31,4 \pm 0,6	0,8 \pm 0,1	1000,4 \pm 114,2	1,4 \pm 0,1
CCL2	anti-CD54	31,8 \pm 1,2	1,0 \pm 0,1	1217,1 \pm 34,8	3,6 \pm 0,4
CCL2	anti-CD102	30,8 \pm 0,5	0,8 \pm 0,0	997,5 \pm 39,8	4,9 \pm 1,2
CCL2	anti-CD106	32,9 \pm 0,9	0,8 \pm 0,0	959,6 \pm 68,5	5,1 \pm 0,5
CCL2	anti-CD31	31,4 \pm 0,9	0,8 \pm 0,1	1034,8 \pm 102,1	4,3 \pm 1,3
CCL2	anti-JAM-A	31,0 \pm 0,4	0,9 \pm 0,1	1082,7 \pm 93,9	2,9 \pm 0,4

5. Diskussion

5.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

Im Rahmen inflammatorischer Ereignisse wandern Leukozyten aus Gefäßen der Mikrozirkulation in das perivaskuläre Gewebe aus, um an den Ort der Entzündung oder Infektion zu gelangen. Dabei folgen Leukozyten der klassischen Rekrutierungskaskade^{99, 100, 101}, welche in den letzten Jahrzehnten im Detail aufgeschlüsselt wurde. Weitestgehend unbekannt dagegen sind die initialen Mechanismen, welche der Extravasation von einzelnen Leukozytensubpopulationen zu Grunde liegen.

Im akuten Entzündungsgeschehen werden zunächst Leukozyten des angeborenen Immunsystems, darunter neutrophile Granulozyten und inflammatorische Monozyten, zum Ort der Gewebeschädigung oder Infektion rekrutiert^{1, 2}. Diese Leukozytensubpopulationen, welche morphologisch unterschieden werden können, besitzen vielfältige Funktionen. Die Hauptaufgabe von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten besteht in der Phagozytose von Pathogenen und apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen. Unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. beim Ischämie-Reperfusionsschaden, tragen neutrophile Granulozyten durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen, Proteasen und proinflammatorischen Zytokinen jedoch auch maßgeblich zur Gewebeschädigung bei, während Monozyten bzw. Makrophagen in diesem Zusammenhang der Resolution von Entzündungen zu dienen scheinen^{15, 16, 17, 18, 19, 29, 30, 31, 156}. Da inflammatorische Monozyten im zeitlichen Verlauf der akuten Entzündungsreaktion verzögert zu neutrophilen Granulozyten in das perivaskuläre Gewebe auswandern, sind diese Leukozytensubpopulationen in unterschiedliche Phasen der akuten Entzündungsreaktion involviert^{157, 158} (vgl. **Abb. 5.1**). Während prolongierte oder chronische Entzündungszustände (wie Atherosklerose), von der Einwanderung von Monozyten

dominiert werden ^{159, 160}, sind neutrophile Granulozyten insbesondere an der akuten inflammatorischen Antwort (wie bei einer Sepsis) beteiligt ¹⁶¹. Dennoch spielen inflammatorische Monozyten auch in akuten Phasen von entzündlichen Erkrankungen, z. B. beim Herzinfarkt, eine zentrale Rolle ¹⁶². Um die unterschiedlichen Eigenschaften einzelner Leukozytensubpopulationen in der Zukunft therapeutisch nutzen bzw. gezielt inhibieren zu können, ist es wichtig, das Migrationsverhalten dieser Immunzellen im akuten Entzündungsgeschehen genau zu kennen.

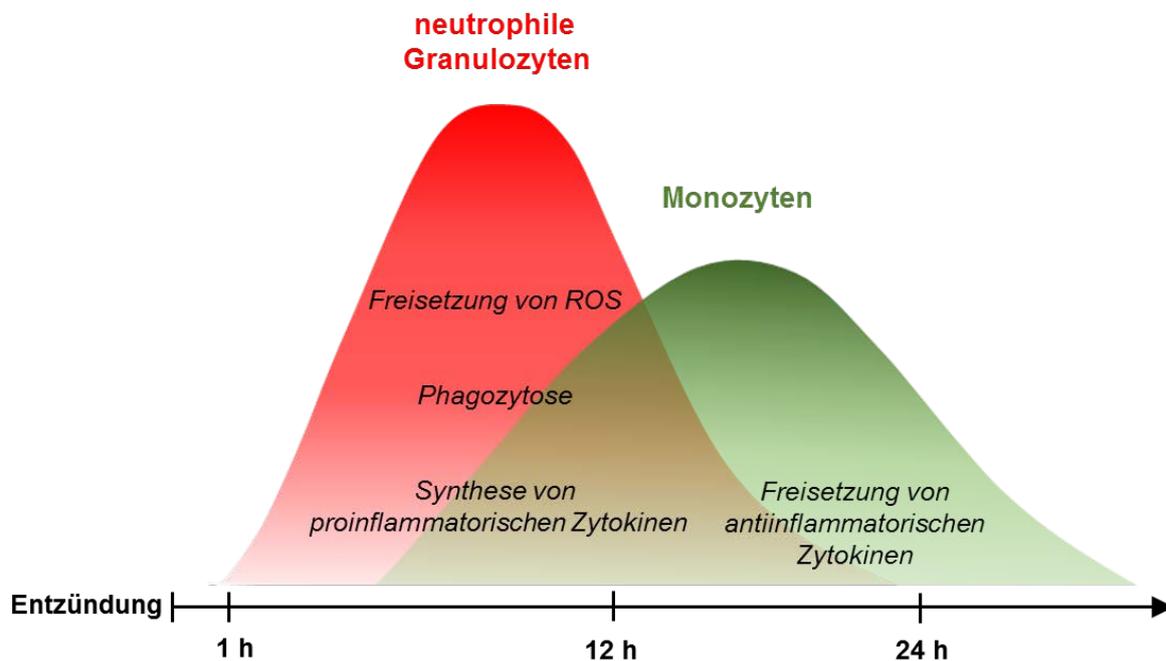


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge der Extravasation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in der akuten Entzündungsantwort (modifiziert nach ¹⁵⁶).

Die Rekrutierung von Leukozyten wird durch Chemokine vermittelt. In *In-vitro*-Studien wurde zunächst gezeigt, dass bestimmte Klassen von Chemokinen ^{53, 62} spezifisch die Migration einzelner Leukozytensubpopulationen regulieren ^{162, 163, 164, 165, 166}: Demnach wird die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten unter akut inflammatorischen Bedingungen vor allem durch zwei Klassen von Chemokinen kontrolliert, den CXC-motif-Chemokinen und den CC-motif-Chemokinen. Während Moleküle aus der Klasse der CXC-motif-Chemokine, wie z. B. ihre prominentesten Vertreter CXCL8 oder CXCL1, für die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten verantwortlich gemacht wurden, waren CC-motif-

Chemokine, darunter CCL2 oder CCL7, bekannt für ihre chemotaktische Wirkung auf Monozyten⁶². Im Gegensatz dazu weisen neuere *In-vivo*-Studien darauf hin, dass CC-motif-Chemokine, wie CCL2 oder CCL3, die Auswanderung von Monozyten und zugleich neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe vermitteln^{163, 164, 165}. Die Mechanismen, welche der Rekrutierung von unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen zu Grunde liegen, sind bislang jedoch kaum verstanden.

Thrombozyten sind kernlose Zellfragmente, welche aus Megakaryozyten im Knochenmark abgegeben werden und im nicht-aktivierten Zustand im Blut zirkulieren. Ihre Hauptaufgabe besitzen diese Zellen in der Hämostase^{167, 168}. Da sie mit zahlreichen, in ihren Granula oder Lysosomen gespeicherten Adhäsionsmolekülen, Enzymen und chemotaktisch wirkenden Molekülen ausgestattet sind, können sie die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs auf unterschiedliche Weise beeinflussen: So wurde gezeigt, dass Thrombozyten nach Aktivierung einerseits mit von Endothelzellen exprimierten Molekülen, wie CD40, Fibrinogen, Fibronectin, P-Selektin/CD62P, von-Willebrand-Faktor (vWF) oder GPIIb/IIIa interagieren können. Andererseits binden sie an leukozytäre Oberflächenmoleküle, wie CD40, Mac-1/CD11b, ICAM-1/CD54, LFA-1/CD11a, PSGL-1/CD162 oder L-Selektin/CD62L, wodurch Leukozyten über Thrombozyten an das Gefäßendothel gebunden werden¹⁶⁷ (vgl. **Abb. 5.2**).

Endothelzellen		Thrombozyten		neutrophile Granulozyten
CD40	↔	CD40L	↔	CD40
Fibrinogen, Fibronectin	↔	GPIIb/IIIa	↔	Mac-1
P-Selektin, vWF	↔	GPIIb	↔	Mac-1, ICAM-1
		ICAM-2	↔	LFA-1
GPIIb ?	↔	P-Selektin	↔	PSGL-1, L-Selektin

Abb. 5.2: Tabellarische Darstellung der Interaktionsmöglichkeiten von aktivierten Thrombozyten mit Endothelzellen bzw. von aktivierten Thrombozyten mit neutrophilen Granulozyten (modifiziert nach¹⁶⁷).

Darüber hinaus sezernieren aktivierte Thrombozyten Chemokine (wie CCL3 oder CXCL1), Zytokine (wie Interleukin-1-beta (IL-1 β)), Wachstumsfaktoren (wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder *transforming growth factor beta* (TGF- β)), und Faktoren der Blutgerinnung und Fibrinolyse ¹⁶⁷. Damit haben Thrombozyten prinzipiell die Fähigkeit, verschiedenste Vorgänge im akuten Entzündungsgeschehen zu regulieren und die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs zu fördern. So wurde in einigen Krankheitsmodellen, wie beispielsweise in Studien zur Sepsis, zur atopischen Dermatitis und Psoriasis, zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder kardiovaskulären Erkrankungen, die Rolle von Thrombozyten als Verstärker der Entzündungsreaktion beschrieben ^{169, 170, 171}.

Neben vielfältigen Interaktionen von Leukozyten mit aktivierten Thrombozyten kommunizieren unterschiedliche Leukozytensubpopulationen auch untereinander ¹⁷²: Während ihrer Transmigration in extravaskuläres Gewebe können neutrophile Granulozyten verschiedene Moleküle, darunter Azurocidin und Proteinase-3, aus ihren sekretorischen Vesikeln freisetzen. Diese proinflammatorisch wirkenden Proteine sind dazu in der Lage, Endothelzellen zu aktivieren und die Permeabilität des Gefäßendothels zu modulieren ^{173, 174, 175}. Zudem lösen die aus neutrophilen Granulozyten sezernierten Moleküle eine verstärkte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, wie VCAM-1/CD106 und ICAM-1/CD54 aus, was zu vermehrter Adhäsion von inflammatorischen Monozyten führt und schließlich deren Transmigration in das Gewebe fördert ¹⁷⁶. Darüber hinaus kann die Aktivierung von Endothelzellen die Produktion und Sekretion von Chemokinen, wie CCL2, fördern ¹⁷⁷. Zusätzlich wurden weitere Moleküle, wie LL-37, Cathepsin G oder HNP1-3, identifiziert, welche aus primären oder sekundären Granula der neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden ¹⁷⁷. Kommt es im Gewebe zur sog. „Netosis“ der neutrophilen Granulozyten, können die sezernierten Substanzen in den Netzen aus DNA-Molekülen festgehalten werden und bilden dadurch einen chemotaktischen Gradienten für inflammatorische Monozyten ^{26, 27, 172}. Auch bereits apoptotische neutrophile Granulozyten setzen Botenstoffe, darunter Lysophosphatidylcholin (LPC) frei, welche unter anderem Monozyten anziehen ¹⁷⁸. Durch

diese Vorgänge begünstigen sowohl aktivierte Thrombozyten als auch neutrophile Granulozyten die Rekrutierung unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs in das entzündete Gewebe.

Die Mechanismen allerdings, welche die einzelnen Schritte des Extravasationsprozesses von neutrophilen Granulozyten und Monozyten regulieren, wurden bisher unzureichend aufgeschlüsselt. Nach wie vor ungeklärt ist, welche Adhäsions- und Signalmoleküle in diesem Zusammenhang funktionell relevant sind.

5.2 Material und Methoden

Die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs aus postkapillären Venolen in entzündetes Gewebe stellt einen komplexen Prozess dar, welcher auf Interaktionen unterschiedlicher Zellen beruht und sich aus einer Vielzahl von Einzelvorgängen zusammensetzt^{99, 100, 101}. Deshalb wurde dieses Ereignis im Gesamtorganismus eines Versuchstieres analysiert. Die Expression einzelner Proteine auf Einzelzellebene wurde *in vitro* untersucht. Aufgrund der Stabilität der erzielbaren Versuchsergebnisse und der starken Übereinstimmung mit dem humanen Immunsystem wurden die Experimente mit C57BL/6N-Mäusen durchgeführt. Während sich die prozentuale Zusammensetzung von im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten im humanen und murinen System zwar unterscheidet, ist die Funktion der einzelnen Leukozytensubpopulationen zwischen Maus und Mensch vergleichbar. Die murinen residenten und inflammatorischen Monozyten stimmen in ihren Funktionen und in den exprimierten Oberflächenmolekülen größtenteils mit dem humanen System überein. Allerdings ist zu anmerken, dass die im menschlichen Blut zirkulierende Population der intermediären Monozyten in der Maus (bisher) nicht identifiziert wurde²⁹.

In unseren Untersuchungen wurden neben C57BL/6N-Mäusen auch CX₃CR-1^{GFP/+}-Mäuse eingesetzt, in welchen unterschiedliche Monozytensubpopulationen anhand ihrer Fluoreszenzintensität und Morphologie klar von neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen oder Makrophagen im Kremastermuskel differenziert werden können. Durch den Einsatz von heterozygoten CX₃CR-1^{GFP/+}-Tieren konnte die Funktion des Chemokinrezeptors CX₃CR-1, welcher die Rekrutierung von Monozyten potentiell beeinflussen kann, zumindest partiell erhalten bleiben¹⁷⁹. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Infiltration von arteriosklerotischen Gefäßen mit Monozyten im transgenen Mausstamm geringer ausgeprägt ist als im WT-Tier¹⁸⁰. Interessanterweise konnten wir in Vorexperimenten im Peritonitis- und Kremastermodell jedoch zeigen, dass sich C57BL/6N-Mäuse und CX₃CR-1^{GFP/+}-Mäuse nach Stimulation mit CCL2 bezüglich der Rekrutierung von Leukozyten in das entzündete Gewebe nicht unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Diese Versuchstiere eignen sich daher für die Analyse des Migrationsverhaltens von unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen in den von uns verwendeten Entzündungsmodellen.

Als Grundlage für unsere funktionellen Untersuchungen zur Bedeutung von Selektinen, Integrinen und deren Hauptinteraktionspartnern für die Extravasation von Leukozyten myeloiden Ursprungs wurden zunächst Expressionsanalysen dieser Proteine auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowie auf Endothelzellen im Mikrogefäßsystem durchgeführt. Die Expressionsprofile wurden dabei unter unstimulierten, CCL2-stimulierten und PMA-stimulierten Bedingungen, welche als Positivkontrolle diente, differenziell untersucht. Die Lokalisation von Selektinen, Integrinen und deren Liganden auf Leukozyten myeloiden Ursprungs bzw. relativ zu Endothelzellverbindungen von postkapillären Venolen wurde mit Hilfe der Konfokalmikroskopie visualisiert. Die Konfokalmikroskopie ermöglicht es, einzelne Zellen bzw. Gewebe dreidimensional und in hoher Auflösung darzustellen. Durch Messung der Fluoreszenzintensitäten der konfokalmikroskopischen Aufnahmen sowie durch Verwendung von Durchflusszytometrie und qRT-PCR konnten zudem quantitative Aussagen über die Expression einzelner Moleküle sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene getroffen werden.

Um die für die Extravasation von unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen relevanten Moleküle zu identifizieren, wurde das Peritonitismodell gewählt. In diesem Modell können neutrophile Granulozyten sowie inflammatorische und residente Monozyten mit Hilfe von durchflusszytometrischen Messungen in der Peritoneallavage genauestens unterschieden und quantifiziert werden. Der Peritonitisassay diente hierbei als „Screening-Assay“, in welchem nach Antikörperblockade einzelner Moleküle die Extravasation von Leukozyten myeloiden Ursprungs analysiert wurde. Da die Blockade der einzelnen Adhäsions- und Signalmoleküle in diesem Modell bereits vor Stimulation mit CCL2 durchgeführt werden muss, können indirekte Effekte der untersuchten Proteine auf die Rekrutierung einzelner Leukozytensubpopulationen nicht ausgeschlossen werden: Einerseits könnten neutrophile Granulozyten sekundär inflammatorische Monozyten rekrutieren^{158,172}, andererseits könnten Monozyten bzw. Makrophagen Moleküle, wie CXCL8, sezernieren, welche chemotaktische Wirkungen auf neutrophile Granulozyten ausüben^{181, 182}. Wenn die Blockade eines untersuchten Moleküls nur die Rekrutierung einer Zellpopulation reguliert, jedoch sekundär auch Einfluss auf die Migration einer anderen Zellpopulation hat, könnten Versuchsergebnisse in diesem Modell fälschlicherweise als positiv gewertet werden. Daher geben diese Experimente lediglich erste, allgemeine Hinweise auf die Funktion von Selektinen, Integrinen und deren Liganden im Rekrutierungsprozess von Leukozyten in entzündetes Gewebe.

Um die einzelnen Schritte der Extravasation von unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs im Detail zu analysieren, wurden *In-vivo*-Mikroskopie-Versuche am Kremastermuskel von CX₃CR-1^{GFP/+}-Mäusen durchgeführt. Mit Hilfe der RLOT-Technik können einzelne Zellen, Gefäße und extravaskuläres Gewebe ohne Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen abgebildet werden. Hierbei durchdringt Licht aus dem nah-infraroten Bereich, welches von Hämoglobin oder Myoglobin in nur geringem Maße absorbiert wird und kaum phototoxische Effekte hervorruft, den Kremastermuskel. Anschließend wird das Licht von einem darunter befindlichen, schrägen Spiegel reflektiert und durchquert das Untersuchungsobjekt erneut. Die Interferenz der unterschiedlich stark

gebrochenen Lichtstrahlen führt zu kontrastreichen, dreidimensional wirkenden Bildern¹⁵⁵. Durch die Kombination von RLOT- und Fluoreszenzmikroskopie können zusätzlich unterschiedliche Leukozytensubpopulationen (neutrophile Granulozyten, residente und inflammatorische Monozyten) sowie andere Strukturen, wie Endothelzellverbindungen in postkapillären Venolen des *M. cremaster*, visualisiert werden. Darüber hinaus können die einzelnen Schritte des Extravasationsprozesses dieser Immunzellen in Echtzeit beobachtet und schließlich quantitativ ausgewertet werden. Des Weiteren kann in diesem Modell mittels intraskrotaler Stimulation ein lokales Entzündungsereignis ausgelöst werden. Dieses Entzündungsgeschehen kann auf inflammatorische Vorgänge in verschiedenen Organen übertragen werden, wobei gewebespezifische Merkmale, wie z. B. die gewebespezifische Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren oder das Vorhandensein bestimmter Zelltypen, bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten¹⁸³.

Für sämtliche Untersuchungen wurde das CC-motif-Chemokin CCL2 als inflammatorischer Stimulus verwendet. Zum einen wurde dieses chemotaktische Zytokin aufgrund seiner hohen Prävalenz bei einer Vielzahl akuter und chronischer Entzündungserkrankungen, wie beispielsweise bei viralen/bakteriellen Infektionen oder Atherosklerose, eingesetzt^{89, 90, 91, 92, 93, 94}. Zum anderen erwies sich CCL2 als idealer Stimulus, die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten gleichzeitig zu untersuchen^{163, 164, 184, 185}. In Vorversuchen hatten wir bereits gezeigt, dass CCL2 im Gegensatz zu anderen klassischen Entzündungsmediatoren, wie TNF, CXCL1 oder IL-1 β , deutlich größere Mengen an inflammatorischen Monozyten, daneben jedoch nahezu gleich viele neutrophile Granulozyten rekrutiert (Daten nicht gezeigt).

Nach lokaler Applikation im Kremastermuskel löst das Chemokin CCL2 unterschiedliche Effekte aus, welche in der Rekrutierung von Phagozyten resultieren. Frühere Studien in CCR2-defizienten Tieren, in welchen ein Defekt der Monozytenrekrutierung in entzündetes Gewebe gezeigt wurde^{186, 187}, weisen auf einen CCR2-abhängigen Mechanismus hin, wobei folgende Möglichkeiten denkbar sind: Über die Bindung an den Chemokinrezeptor CCR2 auf Mastzellen im Gewebe können sekundär inflammatorische Stimuli freigesetzt werden,

welche anschließend neutrophile Granulozyten und Monozyten aus dem Blut oder dem umliegenden Gewebe rekrutieren^{5, 6, 7, 8}. Außerdem kann CCL2 über den DARC-Rezeptor vom Gewebe auf die luminale Seite der Gefäße von postkapillären Venolen transportiert werden, wo es an GAGs gebunden auf dem Endothel präsentiert wird und mit rollenden neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten, welche CCR2 exprimieren, interagieren kann^{80, 82}. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass das mittels DARC in das Gefäßlumen transportierte CCL2 über den Blutkreislauf ins Knochenmark gelangt und dort zu einer vermehrten CCR2-abhängigen Reifung sowie zur Freisetzung von inflammatorischen Monozyten führt^{82, 188}. Die Tatsache, dass sich in unseren Experimenten die systemische Leukozytenzahl nach Stimulation mit CCL2 nicht signifikant änderte und die Stimulation mit diesem Chemokin *in vitro* zu einer veränderten Oberflächenexpression von Selektinen bzw. deren Liganden auf neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten führte, spricht jedoch für direkte Interaktionen des auf dem Gefäßendothel präsentierten Chemokins mit CCR2 auf Leukozyten.

Auf den Einsatz von genetisch veränderten Mäusen wurde bewusst verzichtet: Da sich die Rekrutierung von unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen gegenseitig beeinflussen kann, können bei diesen Tieren mit *A-priori*-Blockade des zu untersuchenden Moleküls keine differenziellen Aussagen über die Mechanismen der Extravasation von einzelnen Leukozytensubpopulationen getroffen werden^{158, 172, 181, 182, 183, 189, 190, 191}.

In bisher publizierten *In-vivo*-Studien wurde bereits gezeigt, dass 6 Stunden nach Beginn eines akuten Entzündungsereignisses bereits unterschiedliche Zellpopulationen an der Entzündungsantwort beteiligt sind und die Resolution der Entzündung zu diesem Zeitpunkt noch nicht eingeleitet wurde^{157, 158}. Diesen Zusammenhang konnten wir in unserem Modell verifizieren. So konnten wir nachweisen, dass die ersten neutrophilen Granulozyten bereits nach 1 Stunde, die inflammatorischen Monozyten dagegen erst nach 6 Stunden Stimulationszeit in entzündetes Gewebe eingewandert sind. Residente Monozyten dagegen, welche bekanntermaßen in Mikrogefäßen patrouillieren und keinen Rezeptor für CCL2

besitzen, wurden – diese Zelleigenschaften bestätigend – in unseren Experimenten nicht in das entzündete Gewebe rekrutiert^{29, 30, 31}.

Die verwendeten Methoden boten somit die Möglichkeit, den Extravasationsprozess von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten zeitgleich zu studieren und dabei die zu Grunde liegenden Mechanismen im Detail aufzuschlüsseln.

5.3 Bedeutung von Selektinen für die Extravasation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten

Selektine stellen eine Familie von drei nah verwandten Kohlehydrat-bindenden Proteinen dar, welche für den ersten Kontakt der im Blut zirkulierenden Leukozyten mit der entzündeten Gefäßendothel und für die daraus resultierende Aktivierung dieser Immunzellen verantwortlich gemacht werden¹¹⁶. Diese funktionellen Eigenschaften von Selektinen lassen darauf schließen, dass diese Proteine zusammen mit ihren Interaktionspartnern den ersten Schritt der subtypspezifischen Leukozytenrekrutierung unter akuten inflammatorischen Bedingungen entscheidend beeinflussen.

In einer ersten Versuchsreihe charakterisierten wir die Oberflächenexpression von Selektinen und ihren Hauptinteraktionspartnern auf verschiedenen Leukozytenpopulationen myeloiden Ursprungs sowie auf Endothelzellen postkapillärer Venolen. Dabei konnten wir zeigen, dass das leukozytäre und konstitutiv exprimierte Protein L-Selektin/CD62L stärker von neutrophilen Granulozyten als von residenten oder inflammatorischen Monozyten präsentiert wird. Nach Stimulation mit CCL2 oder PMA war die Expression von L-Selektin/CD62L auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten signifikant reduziert, was als „shedding“ bezeichnet wird und den aktivierten Zustand dieser Immunzellen widerspiegelt^{117, 118, 119}. Im Gegensatz dazu wurde die Expression von L-Selektin/CD62L auf residenten Monozyten lediglich durch

Stimulation mit PMA verringert, während CCL2 diese Monozytensubpopulation, welche negativ für den CCR2-Rezeptor ist, nicht aktiviert. Die Moleküle CD44, welches mit endotheliale E-Selektin/CD62E interagiert¹⁹², und PSGL-1/CD162, welches vor allem als Ligand von P-Selektin/CD62P dient¹⁹³, konnten wir in größerem Maß auf der Oberfläche von inflammatorischen Monozyten als auf residenten Monozyten oder neutrophilen Granulozyten nachweisen. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien konnte E-Selektin/CD62E in der unstimulierten Mikrovaskulatur nur in geringem Maß nachgewiesen werden und wurde erst nach mehrstündiger Aktivierung mit CCL2 verstärkt exprimiert, was auf die *De-novo*-Synthese dieses Proteins hinweist¹⁹⁴. P-Selektin/CD62P dagegen, welches bekanntermaßen präformiert in sog. Weibel-Palade-Körperchen vorliegt und nach Aktivierung von Endothelzellen an deren Oberfläche transportiert wird, wurde direkt nach der chirurgischen Präparation auf dem mikrovaskulären Endothel des *M. cremaster* präsentiert^{195, 196}. Interessanterweise war die Expression von E-Selektin/CD62E ausschließlich an Endothelzellverbindungen in postkapillären Venolen lokalisiert, während die nur schwach exprimierten Selektinliganden CD44 und PSGL-1/CD162 (welche als Interaktionspartner für leukozytäres L-Selektin/CD62L dienen¹¹⁶) sowie das stark exprimierte P-Selektin/CD62P diffus über die gesamte Fläche des aktivierten Gefäßendothels verteilt waren.

In einem nächsten Schritt wurde die funktionelle Relevanz dieser unterschiedlichen Expressionsprofile von Selektinen und deren Liganden für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten analysiert. Mit Hilfe des Peritonitisassays konnten wir zeigen, dass das an die Endothelzelloberfläche translozierte P-Selektin/CD62P und - in geringerem Maße - das konstitutiv auf Leukozyten exprimierte L-Selektin/CD62L zusammen mit ihren Hauptinteraktionspartnern PSGL-1/CD162 und CD44 die Migration von neutrophilen Granulozyten an den Ort des Entzündungsgeschehens initiieren. Im Gegensatz dazu löst die *De-novo*-Synthese von E-Selektin/CD62E auf Endothelzellen die verzögert auftretende zweite Welle der Extravasation von inflammatorischen Monozyten aus. Diese selektive Funktion von E-Selektin/CD62E für die Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten wird zudem von dem höheren Expressionsniveau des E-Selektinliganden CD44 auf der

Oberfläche von inflammatorischen Monozyten im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten unterstützt. Außerdem beweisen unsere Versuchsergebnisse, dass die frühe Extravasation von neutrophilen Granulozyten oder inflammatorischen Monozyten unabhängig von Thrombozyten stattfindet. Die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs in die CCL2-stimulierte Peritonealhöhle beruht deshalb auf endotheliale, jedoch nicht thrombozytärem P-Selektin/CD62P. Die neutrophilen Granulozyten oder inflammatorischen Monozyten binden nicht sekundär an Thrombozyten, welche über verschiedene Moleküle, wie GPIIb/IIIa oder GPIIb/IIIa, am Endothel adhären können, sondern interagieren direkt mit den Endothelzellen über die Bindung von leukozytärem PSGL-1/CD162 an endotheliales P-Selektin/CD62P¹⁹⁶. In oben genannten Studien wurde nachgewiesen, dass transmigrierte neutrophile Granulozyten die Auswanderung von inflammatorischen Monozyten bei prolongierten oder chronischen Entzündungszuständen fördern¹⁵⁸. Unsere Ergebnisse im Peritonitismodell deuten jedoch darauf hin, dass sich neutrophile Granulozyten bei akuter Entzündung nicht an der Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten beteiligen. Dies weist auf eine spezifische, von Selektinen und ihren Interaktionspartnern PSGL-1/CD162 und CD44 gesteuerte Extravasation unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs hin.

In weiteren *In-vivo*-Experimenten verfolgten wir die Extravasationswege der unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs genauer: Dabei konnten wir die Stellen im Gefäß identifizieren, an denen die neutrophilen Granulozyten bzw. inflammatorischen Monozyten zum ersten Mal mit den aktivierten Endothelzellen interagieren. In Übereinstimmung mit unseren vorherigen Versuchsergebnissen konnten wir zeigen, dass inflammatorische Monozyten nahezu ausschließlich entlang der Endothelzellverbindungen in postkapillären Venolen, den Orten mit hoher E-Selektin-Expression, rollten. Im Vergleich dazu waren die ersten Interaktionsorte von neutrophilen Granulozyten mit den entzündeten Endothelzellen der postkapillären Venolen weniger genau definiert, was auch mit dem diffusen Expressionsmuster von P-Selektin/CD62P, PSGL-1/CD162 und CD44 auf

Endothelzellen von Mikrogefäßen übereinstimmt. Interessanterweise waren die feste Adhärenz sowie die Crawlingwege von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten vornehmlich an Endothelzellverbindungen von postkapillären Venolen lokalisiert, woraus sich unter inflammatorischen Bedingungen gemeinsame Transmigrationsrouten für die unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen über den parazellulären Weg ableiten lassen. Während neutrophile Granulozyten und inflammatorische Monozyten unterschiedliche Wege für das Rollen in der entzündeten Mikrovaskulatur benutzen, werden diese Immunzellen schließlich zu Endothelzellverbindungen, den Ort der Transmigration, geleitet. Koordiniert werden diese individuellen Extravasationswege von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten durch die räumliche Expression von Selektinen in entzündeten postkapillären Venolen. Diese Tatsache könnte entscheidend zur effizienten Extravasation von unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs beitragen.

Um die Mechanismen der Selektin-vermittelten Extravasation von verschiedenen Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs in entzündetes Gewebe genauer aufzuschlüsseln, wurden die einzelnen Schritte der Extravasation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten analysiert. Dabei wurden Selektin-blockierende Antikörper nicht vor Beginn des Entzündungsgeschehens, sondern unter inflammatorischen Bedingungen appliziert und direkt im Anschluss wurden die *in-vivo*-mikroskopischen Untersuchungen im entzündeten Gewebe durchgeführt. Dieser experimentelle Ansatz hatte den Vorteil, dass die Versuchsergebnisse aus den Experimenten mit Selektinblockade nicht durch kumulative Effekte verfälscht wurden und die Interaktionen von Selektinen mit ihren Liganden genauestens studiert werden konnten. Somit wurde die für das Rollen von sowohl neutrophilen Granulozyten als auch inflammatorischen Monozyten maßgebliche Funktion von P-Selektin/CD62P und – in geringerem Ausmaß – von L-Selektin/CD62L zusammen mit ihren Interaktionspartnern PSGL-1/CD162 und CD44 identifiziert. E-Selektin/CD62E dagegen war ausschließlich für das langsame Rollen von inflammatorischen Monozyten,

welches als Voraussetzung für die nachfolgende feste Adhärenz und Transmigration gilt, verantwortlich. Aus *In-vitro*- oder *Ex-vivo*-Studien ist bereits bekannt, dass L-Selektin/CD62L^{197, 198, 199, 200}, E-Selektin/CD62E^{201, 202, 203} oder P-Selektin/CD62P^{201, 204, 205} in Zusammenspiel mit deren Ligand PSGL-1/CD162^{198, 201, 206} temporäre Interaktionen von neutrophilen Granulozyten oder Monozyten mit aktivierten Endothelzellen auslösen. Unsere Daten spiegeln diese Erkenntnisse wider und geben weiteren Aufschluss über die *In-vivo*-Situation, welche bisher nach *A-priori*-Blockade von L-Selektin/CD62L^{207, 208, 210, 211}, P-Selektin/CD62P^{207, 211, 212, 216, 218} oder E-Selektin/CD62E^{207, 213, 216, 218} sowie deren Interaktionspartnern PSGL-1/CD162^{209, 214, 217, 218} oder CD44^{215, 218} untersucht wurde.

Zusätzlich zu ihren Eigenschaften als Adhäsionsmoleküle dienen Selektine und ihre Liganden PSGL-1/CD162 und CD44¹¹⁶ auch als Moleküle, welche intrazelluläre Signalwege in rollenden Leukozyten auslösen und dadurch zu Konformationsänderungen von auf der Oberfläche exprimierten Integrinen führen. Unter diesem Gesichtspunkt konnten wir zeigen, dass P-Selektin/CD62P, jedoch nicht L-Selektin/CD62L, E-Selektin/CD62E, PSGL-1/CD162 oder CD44, die feste Adhärenz von neutrophilen Granulozyten fördert. Dieser Schritt in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten beruht bekannterweise auf der Bindung von leukozytären β 2-Integrinen in ihrer aktivierten Konformation an endotheliale Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, wie z.B. ICAM-1/CD54^{99, 219, 220, 221, 222}. Da die Reduktion der intravaskulären Adhärenz von neutrophilen Granulozyten etwas verzögert nach Blockade von P-Selektin/CD62P auftrat, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt nicht nur die Folge der durch P-Selektin/CD62P-Blockade reduzierten Anzahl an rollenden neutrophilen Granulozyten ist. Außerdem beeinflusste P-Selektin/CD62P deutlich die Direktionalität des intraluminalen Crawlings von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten, welches durch weitaus weniger statische Interaktionen von β 2-Integrinen mit Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie auf dem inflammatorischen Endothel zustande kommt^{99, 219, 220, 221, 222}. Dieses Versuchsergebnis lässt sich zum einen dadurch erklären, dass aus den Interaktionen von endothelialelem P-Selektin/CD62P mit

seinen Liganden auf den rollenden Leukozyten zwar die „extended“, jedoch nicht die Konformation mit der höchsten Bindungsaffinität des leukozytären β 2-Integrins LFA-1/CD11a¹¹⁶ resultiert. Zum anderen könnten Thrombozyten am Prozess des intravaskulären Crawlings von Leukozyten beteiligt sein, indem sie über P-Selektin/CD62P mit leukozytärem PSGL-1/CD162 interagieren. Über die Präsentation von CCL2 auf der Oberfläche von Thrombozyten kann ein chemotaktischer Gradient aufrecht erhalten und so die Direktionalität des Crawlings von Leukozyten reguliert werden^{223, 224, 225}. Des Weiteren kontrollierte L-Selektin/CD62L zusammen mit seinem Bindungspartner CD44 den Anteil der crawlenden inflammatorischen Monozyten. Die Selektinliganden CD44 und PSGL-1/CD162 beteiligten sich zudem an der Regulation der Crawlinggeschwindigkeit von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass L-Selektin/CD62L, PSGL-1/CD162 und CD44 als Signalmoleküle Konformationsänderungen von Integrinen verursachen und so die intravaskulären Crawlingbewegungen hin zu den Transmigrationsstellen von Leukozyten fördern^{217, 226, 227}, was unsere Erkenntnisse zum Crawlingverhalten unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen bestätigt.

Zusammenfassend zeigen unsere Beobachtungen, dass die komplexe, orts- und zeitabhängige Expression von Selektinen die sequentielle Auswanderung von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten in der akuten Entzündungsphase reguliert.

5.4 Bedeutung von Integrinen für die Extravasation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten

In weiteren Untersuchungen wurde die Funktion von Integrinen für die subtypspezifische Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs charakterisiert. Integrine sind aus zwei Untereinheiten bestehende Oberflächenmoleküle, wobei vor allem Vertreter der β 1- und β 2-

Integrine auf Leukozyten myeloiden Ursprungs exprimiert sind. Diese Integrine interagieren mit Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie auf Endothelzellen und beteiligen sich dadurch an der Extravasation von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten^{99, 100, 101, 134, 135, 136}.

Zunächst wurden die Expressionsprofile von Integrinen und deren Hauptinteraktionspartner auf Leukozyten myeloiden Ursprungs bzw. im Mikrogefäßsystem analysiert. Das β 2-Integrin Mac-1/CD11b, welches als klassischer Aktivierungsmarker auf Leukozyten myeloiden Ursprungs bekannt ist, wurde nach Stimulation mit PMA, jedoch nicht CCL2, vermehrt exprimiert²²⁸. Interessanterweise war zeitgleich die Expression des β 2-Integrins LFA-1/CD11a auf Leukozyten myeloiden Ursprungs nach Stimulation reduziert, was dessen vorherrschende Funktion unter unstimulierten Bedingungen, wie z. B. für patrouillierende Monozyten^{29, 30, 31} oder für das Crawling von Monozyten in unstimulierten Gefäßen¹⁴⁴, begründen könnte. Ebenso bekannt aus *In-vitro*-Studien ist die Expression von VLA-4/CD49d auf der Oberfläche von Monozyten^{229, 230}, wobei aus unseren Untersuchungen auf neue subtypspezifische Unterschiede für Monozyten geschlossen werden kann: Während inflammatorische Monozyten eine starke Expression von VLA-4/CD49d aufweisen, kann das β 1-Integrin nur schwach auf residenten Monozyten detektiert werden. Die Hauptinteraktionspartner der Integrine ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A waren über das gesamte Endothel der aktivierten postkapillären Venolen, jedoch etwas verstärkt an den Endothelzellverbindungen exprimiert. Obwohl die Transmigration von Leukozyten myeloiden Ursprungs überwiegend an Endothelzellverbindungen stattfand, waren diese Oberflächenmoleküle gleichmäßig auf der Oberfläche von Endothelzellen postkapillärer Venolen des *M. cremaster* verteilt. Die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie ICAM-2/CD102 und PECAM-1/CD31 waren konstitutiv in den postkapillären Venolen exprimiert, während die Expression von ICAM-1/CD54, welches bekanntermaßen nach Stimulation mit TNF verstärkt von postkapillären Venolen des *M. cremaster* exprimiert wird²³¹, und VCAM-1/CD106, welches unter inflammatorischen

Bedingungen *de novo* synthetisiert wird ²³², nach Applikation von CCL2 stark erhöht war. Dieser Anstieg von ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 kann dadurch erklärt werden, dass neutrophile Granulozyten sechs Stunden nach Stimulation bereits in das entzündete Gewebe rekrutiert worden sind und Endothelzellen durch die Sekretion von vesikulären Molekülen, wie Azurocidin und Proteinase-3, dabei aktiviert haben ^{172, 173, 174, 175}. Des Weiteren kann dieser Anstieg auch durch direkte Mechanismen erklärt werden: Endothelzellen der mikrovaskulären Gefäße, welche CCR2 exprimieren, können auch durch Stimulation mit CCL2 aktiviert werden. Im Gegensatz zu Studien, in welchen die Rolle von JAM-A bei Atherosklerose untersucht wurde, konnte dieses Adhäsionsmolekül in unstimulierten oder CCL2-stimulierten postkapillären Venolen kaum nachgewiesen werden ²³³. Erstaunlicherweise war JAM-A stark auf perivaskulären Makrophagen oder dendritischen Zellen exprimiert, weshalb sich dieses Molekül vermutlich stärker an der extravaskulären Migration von Leukozyten myeloiden Ursprungs beteiligt ²³⁴.

In den darauffolgenden Untersuchungen wurden die Funktionen der leukozytär exprimierten β 1- und β 2-Integrine sowie der endothelialen Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie aufgeschlüsselt. Als erstes wurde im Peritonitismodell gezeigt, dass inflammatorische Monozyten durch die Integrine VLA-4/CD49d und Mac-1/CD11b und deren Liganden VCAM-1/CD106 und ICAM-1/CD11b rekrutiert werden. In verschiedenen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass das Integrin VLA-4/CD49d zusammen mit seinem Interaktionspartner VCAM-1/CD106 für die Migration von Monozyten *in vitro* und *in vivo* verantwortlich ist ^{146, 229, 230}. Die Extravasation von neutrophilen Granulozyten in die entzündete Peritonealhöhle wurde von β 1- und β 2-Integrinen kontrolliert. Dabei besaß das nur schwach auf neutrophilen Granulozyten exprimierte Integrin VLA-4/CD49d die geringste Bedeutung für die Extravasation dieser Immunzellen. Die Tatsache, dass das β 1-Integrin VLA-4/CD49d kaum von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, weist auf mögliche Effekte von Monozyten hin, welche über die Freisetzung von Zytokinen sekundär neutrophile Granulozyten rekrutieren könnten ^{181, 182, 183}. Die Blockade der Mitglieder der Immunglobulin-

Superfamilie ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und JAM-A verringerten die Anzahl der in die entzündete Peritonealhöhle migrierten neutrophilen Granulozyten nur leicht. Dieses Versuchsergebnis deutet auf synergistische Effekte der endothelialen Adhäsions- und Signalmoleküle in „transmigratory cups“ hin, welche aus unterschiedlichen Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie bestehen und die Transmigration von Leukozyten ermöglichen¹⁴⁸.

Im Anschluss daran wurde die Extravasation von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten im Kremastermodell genauer aufgeschlüsselt: Während der Schritt des intravaskulären Rollens von neutrophilen Granulozyten durch Integrine und ihre Liganden nicht beeinflusst wurde, kontrollierte das β 2-Integrin Mac-1/CD11b zusammen mit seinem Liganden ICAM-1/CD54 das Rollen von inflammatorischen Monozyten in entzündeten postkapillären Venolen. In Übereinstimmung mit früheren Studien^{99, 100, 101} war die Interaktion von leukozytärem VLA-4/CD49d mit endothelialelem VCAM-1/CD106 für das langsame Rollen von inflammatorischen Monozyten verantwortlich, was auch die absolute Anzahl rollender Zellen beeinflusste. Die feste Adhärenz von inflammatorischen Monozyten wurde durch die Interaktion von VLA-4/CD49d mit VCAM-1/CD106 sowie durch die Interaktion von Mac-1/CD11b mit ICAM-1/CD54 vermittelt. Letzteres Versuchsergebnis könnte dabei jedoch auch die Folge aus der verringerten Anzahl rollender inflammatorischer Monozyten nach Blockade von Mac-1/CD11b oder ICAM-1/CD54 sein. Im Gegensatz dazu wurde die feste Adhärenz von neutrophilen Granulozyten durch Interaktionen von LFA-1/CD11a und Mac-1/CD11b sowie den Immunglobulinen ICAM-1/CD54 und PECAM-1/CD31 auf den Endothelzellen der Gefäße reguliert. Diese Erkenntnisse deuten auf funktionelle Unterschiede von β 1- und β 2-Integrinen hinsichtlich der festen Adhärenz von unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs an aktivierte Endothelzellen von Mikrogefäßen hin: Während die feste Adhärenz von inflammatorischen Monozyten durch das β 1-Integrin VLA-4/CD49d vermittelt wird, werden die β 2-Integrine LFA-1/CD11a und Mac-

1/CD11b für diesen Schritt der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich gemacht.

Die Unstimmigkeiten zwischen den Ergebnissen aus dem Peritonitismodell und dem Kremastermodell lassen sich durch die unterschiedlichen gewebespezifischen Transmigrationswege erklären: Während Leukozyten im Peritonitismodell zu einem großen Teil transzellulär transmigrieren, nutzen Immunzellen im Kremastermuskel überwiegend den parazellulären Weg ²³⁵. Im Kremastermodell beeinflusst PECAM-1/CD31, welches als einziges Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie ausschließlich an Endothelzellverbindungen lokalisiert ist, sowohl die feste Adhärenz als auch die Transmigration der neutrophilen Granulozyten stark. Diese Tatsache könnte entscheidend für die erfolgreiche parazelluläre Transmigration der neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe sein.

Danach wurden die Crawlingbewegungen der fest adhärennten inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten in entzündeten postkapillären Venolen der Mikrovaskulatur auf molekularer Ebene charakterisiert. Ebenso wie die feste Adhärenz wurde der Anteil der intraluminal crawlenden inflammatorischen Monozyten durch die Interaktion der Moleküle VLA-4/CD49d und VCAM-1/CD106 kontrolliert, welche unter CCL2-stimulierten Bedingungen auf der Oberfläche von inflammatorischen Monozyten bzw. auf dem Gefäßendothel zum Zeitpunkt der zweiten Welle der Monozytenrekrutierung stark exprimiert wurden. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien ¹⁴⁴, war vor allem das Integrin Mac-1/CD11b für den Anteil der crawlenden neutrophilen Granulozyten im entzündeten Mikrogefäßsystem verantwortlich. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass die Interaktion von P-Selektin/CD62P mit PSGL-1/CD162 die Verteilung des β 2-Integrins Mac-1/CD11b auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten kontrolliert und dadurch das Crawling dieser Immunzellen reguliert ²²⁵. Das β 2-Integrin LFA-1/CD11a, welches nach Stimulation mit CCL2 auf der Oberfläche von inflammatorischen Monozyten oder neutrophilen Granulozyten wenig exprimiert wurde, hatte keinen Einfluss auf den Anteil der crawlenden Leukozyten myeloiden Ursprungs. Allerdings war dieses Integrin für die erhöhte

Geschwindigkeit des Crawlings verantwortlich. Dies ist vermutlich auf den Anteil der zirkulierenden, nicht aktivierten Leukozyten zurückzuführen, welche in ihren Crawlingbewegungen bekanntermaßen durch das β 2-Integrin LFA-1/CD11a kontrolliert werden¹⁴⁴.

Somit konnten wir zeigen, dass vor allem das leukozytäre β 1-Integrin VLA-4/CD49d zusammen mit dem stark auf aktivierten Endothelzellen exprimierten VCAM-1/CD106 die Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten in entzündetes Gewebe reguliert. Die Extravasation von neutrophilen Granulozyten dagegen wird durch die leukozytären β 2-Integrine LFA-1/CD11a und Mac-1/CD11b zusammen mit ihren Interaktionspartnern ICAM-1/CD54 und PECAM-1/CD31 auf dem Endothel kontrolliert.

6. Zusammenfassung

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse unserer Untersuchungen darauf hin, dass die sequenzielle Extravasation von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten in der akuten Entzündungsantwort auf der komplexen orts- und zeitabhängigen Expression von Selektinen, Integrinen und deren Liganden basiert: Zunächst initiieren das an die Oberfläche von aktivierten Endothelzellen translozierte P-Selektin/CD62P und das konstitutiv auf Leukozyten exprimierte L-Selektin/CD62L zusammen mit ihren Interaktionspartnern PSGL-1/CD162 und CD44 die Migration von neutrophilen Granulozyten aus postkapillären Venolen an den Ort der Entzündung. In einem zweiten Schritt löst endotheliales E-Selektin/CD62E, welches *de novo* synthetisiert werden muss, die darauffolgende Extravasation von inflammatorischen Monozyten aus. Aufgrund des an Endothelzellverbindungen lokalisierten E-Selektins/CD62E und des diffus über das Gefäßendothel verteilten P-Selektins/CD62P vermitteln Selektine den Kontakt der Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs mit unterschiedlichen Stellen des Gefäßendothels. Dabei kontrolliert P-Selektin/CD62P zusammen mit seinen Liganden PSGL-1/CD162 und CD44 das Rollen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten am Gefäßendothel. E-Selektin/CD62E dagegen reguliert ausschließlich die Rollgeschwindigkeit von inflammatorischen Monozyten. Des Weiteren beteiligen sich Selektine und ihre Interaktionspartner PSGL-1/CD162 und CD44 am intravaskulären Crawling von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten, was die schrittweise Auswanderung dieser Immunzellen in entzündetes Gewebe weiter vorantreibt. Während sich die initialen Kontakte der inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten räumlich (und zeitlich) unterscheiden, werden die wandernden Immunzellen schließlich zu den gemeinsamen Orten der festen Adhärenz, des Crawlings und der Extravasation geleitet. Diese Schritte der Rekrutierung der Leukozyten myeloiden Ursprungs werden durch Integrine und deren Liganden kontrolliert. Hierbei dienen die leukozytär exprimierten β 2-Integrine LFA-1/CD11a

und Mac-1/CD11b zusammen mit dem endothelial exprimierten Liganden ICAM-1/CD54 und dem an Endothelzellverbindungen lokalisierten PECAM-1/CD31 der festen Adhärenz von neutrophilen Granulozyten. Während inflammatorische Monozyten bereits durch Interaktion mit E-Selektin/CD62E auf den Endothelzellverbindungen entlang rollen, werden neutrophile Granulozyten durch Interaktion mit PECAM-1/CD31 schließlich an die gleichen Orte der festen Adhärenz und Transmigration geleitet (vgl. **Abb. 6.1**). Für die Kontrolle des Rollens, der Rollgeschwindigkeit, der festen Adhärenz und des Crawlings von inflammatorischen Monozyten dagegen spielt das β 1-Integrin VLA-4/CD49d, welches nach CCL2-Stimulation stark auf deren Oberfläche präsentiert wird, zusammen mit seinem Interaktionspartner VCAM-1/CD106, welcher zum Zeitpunkt der Rekrutierung dieser Leukozytensubpopulation stark auf der Endothelzelloberfläche exprimiert wird, eine zentrale Rolle (vgl. **Abb. 6.2**).

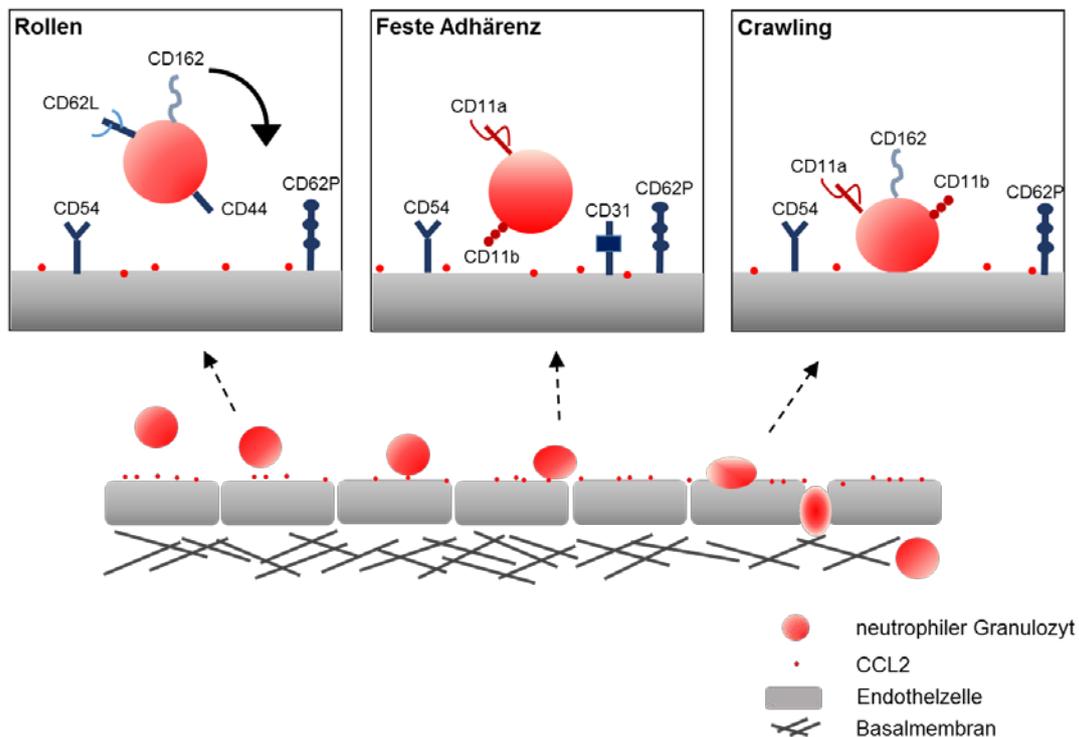


Abb. 6.1: Schematische Darstellung der intravaskulären Ereignisse während der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an den Ort der Entzündung nach Stimulation mit CCL2: Der Schritt des Rollens wird von L-Selektin/CD62L, PSGL-1/CD162 und CD44 sowie von P-Selektin/CD62P und ICAM-1/CD54 reguliert. Die feste Adhärenz wird durch die β 2-Integrine LFA-1/CD11a und Mac-1/CD11b sowie P-Selektin/CD62P, ICAM-1/CD54 und PECAM-1/CD31 vermittelt. Das Crawlingverhalten wird von PSGL-1/CD162, den β 2-Integrinen LFA-1/CD11a und Mac-1/CD11b sowie von P-Selektin/CD62P und ICAM-1/CD54 kontrolliert.

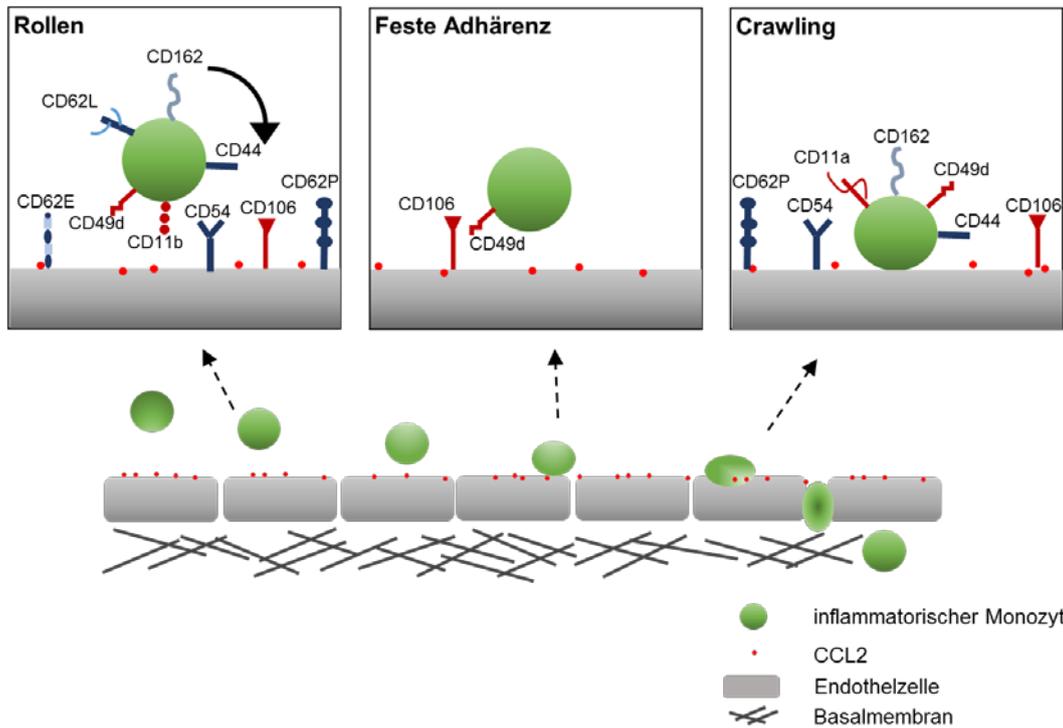


Abb. 6.2: Schematische Darstellung der intravaskulären Ereignisse während der Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten an den Ort der Entzündung nach Stimulation mit CCL2: Der Schritt des Rollens wird von L-Selektin/CD62L, PSGL-1/CD162 und CD44, den Integrinen Mac-1/CD11b und CD49d sowie von P-Selektin/CD62P, E-Selektin/CD62E, ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 reguliert. Die feste Adhärenz wird durch das β 1-Integrin VLA-4/CD49d sowie VCAM-1/CD106 vermittelt. Das Crawlingverhalten wird von PSGL-1/CD162, CD44, den Integrinen LFA-1/CD11a und VLA-4/CD49d sowie von P-Selektin/CD62P, ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 kontrolliert.

Unsere Versuchsergebnisse geben somit neue Einblicke in die Mechanismen, welche für die Extravasation unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs verantwortlich sind. Es wurden bisher unbekannte Funktionen von Selektinen bei der Leukozytenrekrutierung aufgedeckt und die Eigenschaften von Integrinen in einem komplexen Entzündungsgeschehen nun genauer charakterisiert. Diese Erkenntnisse beantworten nicht nur ungelöste Fragen in der Immunologie, sondern könnten auch für die Entwicklung neuer, gezielter Strategien zur Vorbeugung und Behandlung von inflammatorischen Krankheiten genutzt werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Murphy K: Janeway's Immunobiology, ed 8. New York, Garland Science. 2011.
2. Pulido D, Nogués MV, Boix E, Torrent M. Lipopolysaccharide neutralization by antimicrobial peptides: a gambit in the innate host defense strategy. *J Innate Immun.* 2012, 4(4):327-36.
3. http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/lectures/files/innate_immunity.html
4. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 2011, 12(11):1035-11.
5. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol.* 2005, 23:749-86.
6. Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2010, 10(6):440-52.
7. Boyce JA. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev.* 2007, 217:168-85.
8. Galli SJ, Grimbaldston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2008, 8(6):478-86.
9. Lysakova-Devine T, O'Farrelly C. Tissue-specific NK cell populations and their origin. *J Leukoc Biol.* 2014, 96(6):981-990.
10. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008, 9(5):503-10.
11. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev.* 2006, 214:56-72.
12. Di Santo JP. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol.* 2006, 24:257-86.

13. Vankayalapati R, Klucar P, Wizel B, Weis SE, Samten B, Safi H, Shams H, Barnes PF. NK cells regulate CD8+ T cell effector function in response to an intracellular pathogen. *J Immunol.* 2004, 172(1):130-7.
14. Roy S, Barnes PF, Garg A, Wu S, Cosman D, Vankayalapati R. NK cells lyse T regulatory cells that expand in response to an intracellular pathogen. *J Immunol.* 2008, 180(3):1729-36.
15. Ueda Y, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med.* 2005, 201(11):1771-80.
16. Panopoulos AD, Watowich SS. Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. *Cytokine.* 2008, 42(3):277-88.
17. Ueda Y, Cain DW, Kuraoka M, Kondo M, Kelsoe G. IL-1R type I-dependent hemopoietic stem cell proliferation is necessary for inflammatory granulopoiesis and reactive neutrophilia. *J Immunol.* 2009, 182(10):6477-84.
18. Scumpia PO, Kelly-Scumpia KM, Delano MJ, Weinstein JS, Cuenca AG, Al-Quran S, Bovio I, Akira S, Kumagai Y, Moldawer LL. Cutting edge: bacterial infection induces hematopoietic stem and progenitor cell expansion in the absence of TLR signaling. *J Immunol.* 2010, 184(5):2247-51.
19. Zhang H, Nguyen-Jackson H, Panopoulos AD, Li HS, Murray PJ, Watowich SS. STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood.* 2010, 116(14):2462-71.
20. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002, 2(10):725-34.
21. Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci.* 2008, 65(19):2964-78.

22. Mahabeleshwar GH, Kawanami D, Sharma N, Takami Y, Zhou G, Shi H, Nayak L, Jeyaraj D, Grealay R, White M, McManus R, Ryan T, Leahy P, Lin Z, Haldar SM, Atkins GB, Wong HR, Lingrel JB, Jain MK. The myeloid transcription factor KLF2 regulates the host response to polymicrobial infection and endotoxic shock. *Immunity*. 2011, 34(5):715-28.
23. Imtiyaz HZ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010, 345:105-20.
24. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC, Gabilovich DI. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*. 2009, 182(9):5693-701.
25. Medina E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *J Innate Immun*. 2009, 1(3):176-80.
26. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004, 303(5663):1532-5.
27. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010, 116(4):625-7.
28. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010, 327(5966):656-61.
29. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003, 19(1):71-82.
30. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011, 1(11):762-74.
31. Wiktor-Jedrzejczak W, Gordon S. Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol Rev*. 1996, 76(4):927-47.

32. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*. 2003, 19(1):59-70.
33. Natalya V. Serbina, Ting Jia, Tobias M. Hohl, Eric G. Pamer. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2010, 26: 421–452.
34. McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci. Lett*. 1987;79:195–200.
35. El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat. Med*. 2007;13:432–438.
36. Libby P, Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. *Semin Immunopathol*. 2013, 35(5):553-62.
37. Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood*. 2009, 114(21):4613-23.
38. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2007, 117(4):902-9.
39. Pamer EG. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol*. 2004, 4(10):812-23.
40. Scott HM, Flynn JL. Mycobacterium tuberculosis in chemokine receptor 2-deficient mice: influence of dose on disease progression. *Infect Immun*. 2002, 70(11):5946-54.
41. Robben PM, LaRegina M, Kuziel WA, Sibley LD. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med*. 2005, 201(11):1761-9.
42. Sponaas AM, Freitas do Rosario AP, Voisine C, Mastelic B, Thompson J, Koernig S, Jarra W, Renia L, Mauduit M, Potocnik AJ, Langhorne J. Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood*. 2009, 114(27):5522-31.

43. Hohl TM, Feldmesser M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot Cell*. 2007, 6(11):1953-63.
44. Salazar-Mather TP, Orange JS, Biron CA. Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *J Exp Med*. 1998, 187(1):1-14.
45. Aldridge JR Jr, Moseley CE, Boltz DA, Negovetich NJ, Reynolds C, Franks J, Brown SA, Doherty PC, Webster RG, Thomas PG. TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009, 106(13):5306-11.
46. Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber KS, Ziegler-Heitbrock HW. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol*. 2000, 67(5):699-704.
47. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010, 116(16):e74-80.
48. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais JP, D'Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 2010, 33(3):375-86.
49. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002, 168(7):3536-42.
50. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol*. 1998, 10(5):351-3.

51. Moore BB, Moore TA, Toews GB. Role of T- and B-lymphocytes in pulmonary host defences. *Eur Respir J*. 2001, 18(5):846-56.
52. Rabb H. The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: implications for the kidney. *Kidney Int*. 2002, 61(6):1935-46.
53. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:891-928.
54. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*. 1997, 15:675-705.
55. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997, 90(3):909-28.
56. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998, 338(7):436-45.
57. Clore GM, Appella E, Yamada M, Matsushima K, Gronenborn AM. Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. *Biochemistry*. 1990, 29(7):1689-96.
58. Lodi PJ, Garrett DS, Kuszewski J, Tsang ML, Weatherbee JA, Leonard WJ, Gronenborn AM, Clore GM. High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR. *Science*. 1994, 263(5154):1762-7.
59. Handel TM, Domaille PJ. Heteronuclear (¹H, ¹³C, ¹⁵N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. *Biochemistry*. 1996, 35(21):6569-84.
60. Chung CW, Cooke RM, Proudfoot AE, Wells TN. The three-dimensional solution structure of RANTES. *Biochemistry*. 1995, 34(29):9307-14.
61. Zhang Y, Rollins BJ. A dominant negative inhibitor indicates that monocyte chemoattractant protein 1 functions as a dimer. *Mol Cell Biol*. 1995, 15(9):4851-5.
62. Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2008, 48: 171-197.

63. Obasi CN, Barrett B, Brown R, Vrtis R, Barlow S, Muller D, Gern J. 11. Detection of viral and bacterial pathogens in acute respiratory infections. *J Infect.* 2014, 68(2):125-30.
64. Ajuebor MN, Flower RJ, Hannon R, Christie M, Bowers K, Verity A, Perretti M. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. *J Leukoc Biol.* 1998, 63(1):108-16.
65. LaFleur AM, Lukacs NW, Kunkel SL, Matsukawa A. Role of CC chemokine CCL6/C10 as a monocyte chemoattractant in a murine acute peritonitis. *Mediators Inflamm.* 2004, 13(5-6):349-55.
66. Döring Y, Noels H, Mandl M, Kramp B, Neideck C, Lievens D, Drechsler M, Megens RT, Tilstam PV, Langer M, Hartwig H, Theelen W, Marth JD, Sperandio M, Soehnlein O, Weber C. Deficiency of the sialyltransferase St3Gal4 reduces Ccl5-mediated myeloid cell recruitment and arrest: short communication. *Circ Res.* 2014, 114(6):976-81.
67. Reichel CA, Rehberg M, Lerchenberger M, Berberich N, Bihari P, Khandoga AG, Zahler S, Krombach F. Ccl2 and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009, 29(11):1787-93.
68. Reichel CA, Khandoga A, Anders HJ, Schlöndorff D, Luckow B, Krombach F. Chemokine receptors Ccr1, Ccr2, and Ccr5 mediate neutrophil migration to postischemic tissue. *J Leukoc Biol.* 2006, 79(1):114-22.
69. Maus UA, Waelsch K, Kuziel WA, Delbeck T, Mack M, Blackwell TS, Christman JW, Schlöndorff D, Seeger W, Lohmeyer J. Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis. *J Immunol.* 2003, 170(6):3273-8.
70. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for hostdefense and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014, 32:659-702.

71. Anders HJ, Romagnani P, Mantovani A. Pathomechanisms: homeostatic chemokines in health, tissue regeneration, and progressive diseases. *Trends Mol Med.* 2014, 20(3):154-65.
72. Scholten DJ, Canals M, Maussang D, Roumen L, Smit MJ, Wijtmans M, de Graaf C, Vischer HF, Leurs R. Pharmacological modulation of chemokine receptor function. *Br J Pharmacol.* 2012, 165(6):1617-43.
73. Kuang Y, Wu Y, Jiang H, Wu D. Selective G protein coupling by C-C chemokine receptors. *J Biol Chem.* 1996, 271(8):3975-8.
74. al-Aoukaty A, Schall TJ, Maghazachi AA. Differential coupling of CC chemokine receptors to multiple heterotrimeric G proteins in human interleukin-2-activated natural killer cells. *Blood.* 1996, 87(10):4255-60.
75. Arai H, Tsou CL, Charo IF. Chemotaxis in a lymphocyte cell line transfected with C-C chemokine receptor 2B: evidence that directed migration is mediated by betagamma dimers released by activation of G α hi-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94(26):14495-9.
76. Neptune ER, Bourne HR. Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of G α i, not by activating G α q or G α s. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94(26):14489-94.
77. Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science.* 2000, 287(5455):1049-53.
78. Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science.* 2000, 287(5455):1037-40.
79. Del Prete A, Bonecchi R, Vecchi A, Mantovani A, Sozzani S. CCRL2, a fringe member of the atypical chemoattractant receptor family. *Eur J Immunol.* 2013, 43(6):1418-22.

80. Borroni EM, Bonecchi R, Buracchi C, Savino B, Mantovani A, Locati M. Chemokine decoy receptors: new players in reproductive immunology. *Immunol Invest.* 2008, 37(5):483-97.
81. Bonecchi R, Locati M, Galliera E, Vulcano M, Sironi M, Fra AM, Gobbi M, Vecchi A, Sozzani S, Haribabu B, Van Damme J, Mantovani A. Differential recognition and scavenging of native and truncated macrophage-derived chemokine (macrophage-derived chemokine/CC chemokine ligand 22) by the D6 decoy receptor. *J Immunol.* 2004, 172(8):4972-6.
82. Pruenster M, Rot A. Throwing light on DARC. *Biochem Soc Trans.* 2006, 34(Pt 6):1005-8.
83. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009, 29(6):313-26.
84. Barna BP, Pettay J, Barnett GH, Zhou P, Iwasaki K, Estes ML. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. *J Neuroimmunol.* 1994, 50(1):101-7.
85. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990, 87(13):5134-8.
86. Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, Strieter RM. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem.* 1991, 266(15):9912-8.
87. Brown Z, Strieter RM, Neild GH, Thompson RC, Kunkel SL, Westwick J. IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. *Kidney Int.* 1992, 42(1):95-101.

88. Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett.* 1989, 244(2):487-93.
89. Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TN, Proudfoot A, Martinez-A C, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med.* 1998, 188(1):157-67.
90. Rantapää-Dahlqvist S, Boman K, Tarkowski A, Hallmans G. Up regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in anti-citrulline antibody and immunoglobulin M rheumatoid factor positive subjects precedes onset of inflammatory response and development of overt rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007, 66(1):121-3.
91. Flora G, Pu H, Lee YW, Ravikumar R, Nath A, Hennig B, Toborek M. Proinflammatory synergism of ethanol and HIV-1 Tat protein in brain tissue. *Exp Neurol.* 2005, 191(1):2-12.
92. Davies MH, Eubanks JP, Powers MR. Microglia and macrophages are increased in response to ischemia-induced retinopathy in the mouse retina. *Mol Vis.* 2006, 12:467-77.
93. Liehn EA, Piccinini AM, Koenen RR, Soehnlein O, Adage T, Fatu R, Curaj A, Popescu A, Zerneck A, Kungl AJ, Weber C. A new monocyte chemotactic protein-1/chemokine CC motif ligand-2 competitor limiting neointima formation and myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J Am Coll Cardiol.* 2010, 56(22):1847-57.
94. Wang L, Zheng W, Zhang S, Chen X, Hornung D. Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human endometrial cancer cells and the effect of treatment with tamoxifen or buserelin. *J Int Med Res.* 2006, 34(3):284-90.

95. Coulombe F, Fiola S, Akira S, Cormier Y, Gosselin J. Muramyl dipeptide induces NOD2-dependent Ly6C(high) monocyte recruitment to the lungs and protects against influenza virus infection. *PLoS One*. 2012, 7(5):e36734.
96. Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 1999, 143(1):205-11.
97. Izikson L, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, Luster AD. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med*. 2000, 192(7):1075-80.
98. Mitchem JB, DeNardo DG. Battle over CCL2 for control of the metastatic niche: neutrophils versus monocytes. *Breast Cancer Res*. 2012, 14(4):315.
99. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010, 11(5):366-78.
100. Voisin MB, Nourshargh S. Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls. *J Innate Immun*. 2013, 5(4):336-47.
101. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol*. 2010, 17(1):9-17.
102. McEver RP, Zhu C. Rolling cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2010, 26:363-96.
103. Sundd P, Pospieszalska MK, Ley K. Neutrophil rolling at high shear: flattening, catch bond behavior, tethers and slings. *Mol Immunol*. 2013, 55(1):59-69.
104. Zarbock A, Lowell CA, Ley K. Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity*. 2007, 26(6):773-83.
105. Alon R, Feigelson S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin Immunol*. 2002, 14(2):93-104.
106. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J*. 1994, 8(8):504-12.

107. Broermann A, Winderlich M, Block H, Frye M, Rossaint J, Zarbock A, Cagna G, Linnepe R, Schulte D, Nottebaum AF, Vestweber D. Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo. *J Exp Med.* 2011, 208(12):2393-401.
108. Rowe RG, Weiss SJ. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* 2008, 18(11):560-74.
109. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res.* 2005, 97(6):512-23.
110. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell.* 2011, 21(2):193-215.
111. Maier CL, Pober JS. Human placental pericytes poorly stimulate and actively regulate allogeneic CD4 T cell responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011, 31(1):183-9.
112. Stark K, Eckart A, Haidari S, Tirniceriu A, Lorenz M, von Brühl ML, Gärtner F, Khandoga AG, Legate KR, Pless R, Hepper I, Lauber K, Walzog B, Massberg S. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol.* 2013, 14(1):41-51.
113. Verbeek MM, Westphal JR, Ruiter DJ, de Waal RM. T lymphocyte adhesion to human brain pericytes is mediated via very late antigen-4/vascular cell adhesion molecule-1 interactions. *J Immunol.* 1995, 154(11):5876-84.
114. Heit B, Robbins SM, Downey CM, Guan Z, Colarusso P, Miller BJ, Jirik FR, Kubes P. PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nat Immunol.* 2008
115. Sarris M, Masson JB, Maurin D, Van der Aa LM, Boudinot P, Lortat-Jacob H, Herbomel P. Inflammatory chemokines direct and restrict leukocyte migration within live tissues as glycan-bound gradients. *Curr Biol.* 2012, 22(24):2375-82.

116. Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*. 2011, 118(26):6743-51.
117. Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Jutila MA. Neutrophil roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J Exp Med*. 1994, 180(5):1785-92.
118. Mitchell DJ, Li P, Reinhardt PH, Kubes P. Importance of L-selectin-dependent leukocyte-leukocyte interactions in human whole blood. *Blood*. 2000, 95(9):2954-9.
119. Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med*. 2005, 9(2):255-66.
120. Jutila MA, Rott L, Berg EL, Butcher EC. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1. *J Immunol*. 1989, 143(10):3318-24.
121. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science*. 1989, 245(4923):1238-41.
122. Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood*. 1995, 86(12):4417-21.
123. Xia L, Sperandio M, Yago T, McDaniel JM, Cummings RD, Pearson-White S, Ley K, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J Clin Invest*. 2002, 109(7):939-50.
124. Hirata T, Merrill-Skoloff G, Aab M, Yang J, Furie BC, Furie B. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. *J Exp Med*. 2000, 192(11):1669-76.
125. Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, Ley K. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med*. 2003, 197(10):1355-63.

126. Rivera-Nieves J, Burcin TL, Olson TS, Morris MA, McDuffie M, Cominelli F, Ley K. Critical role of endothelial P-selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis. *J Exp Med.* 2006, 203(4):907-17.
127. Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol.* 1995, 128(4):661-71.
128. Sherman L, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 1994, 6(5):726-33.
129. Sleeman JP, Kondo K, Moll J, Ponta H, Herrlich P. Variant exons v6 and v7 together expand the repertoire of glycosaminoglycans bound by CD44. *J Biol Chem.* 1997, 272(50):31837-44.
130. Yago T, Shao B, Miner JJ, Yao L, Klopocki AG, Maeda K, Coggeshall KM, McEver RP. E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin alphaLbeta2-mediated slow leukocyte rolling. *Blood.* 2010, 116(3):485-94.
131. Zarbock A, Abram CL, Hundt M, Altman A, Lowell CA, Ley K. PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling. *J Exp Med.* 2008, 205(10):2339-47.
132. Stadtmann A, Brinkhaus L, Mueller H, Rossaint J, Bolomini-Vittori M, Bergmeier W, Van Aken H, Wagner DD, Laudanna C, Ley K, Zarbock A. Rap1a activation by CalDAG-GEFI and p38 MAPK is involved in E-selectin-dependent slow leukocyte rolling. *Eur J Immunol.* 2011, 41(7):2074-85.
133. Hidalgo A, Chang J, Jang JE, Peired AJ, Chiang EY, Frenette PS. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nat Med.* 2009, 15(4):384-91.
134. Herter J, Zarbock A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *J Immunol.* 2013, 190(9):4451-7.

135. Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.* 2007, 25:619-47.
136. Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. The leukocyte integrins. *J Biol Chem.* 2000, 275(31):23409-12.
137. Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EC, Laudanna C. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity.* 2000, 13(6):759-69.
138. Bolomini-Vittori M, Montresor A, Giagulli C, Staunton D, Rossi B, Martinello M, Constantin G, Laudanna C. Regulation of conformer-specific activation of the integrin LFA-1 by a chemokine-triggered Rho signaling module. *Nat Immunol.* 2009, 10(2):185-94.
139. Zarbock A, Lowell CA, Ley K. Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity.* 2007, 26(6):773-83.
140. Green CE, Pearson DN, Camphausen RT, Staunton DE, Simon SI. Shear-dependent capping of L-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 by E-selectin signals activation of high-avidity beta2-integrin on neutrophils. *J Immunol.* 2004, 172(12):7780-90.
141. Miner JJ, Xia L, Yago T, Kappelmayer J, Liu Z, Klopocki AG, Shao B, McDaniel JM, Setiadi H, Schmidtke DW, McEver RP. Separable requirements for cytoplasmic domain of PSGL-1 in leukocyte rolling and signaling under flow. *Blood.* 2008, 112(5):2035-45.
142. Zarbock A, Abram CL, Hundt M, Altman A, Lowell CA, Ley K. PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling. *J Exp Med.* 2008, 205(10):2339-47.
143. Pavalko FM, LaRoche SM. Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin. *J Immunol.* 1993, 151(7):3795-807.

144. Sumagin R, Prizant H, Lomakina E, Waugh RE, Sarelius IH. LFA-1 and Mac-1 define characteristically different intraluminal crawling and emigration patterns for monocytes and neutrophils in situ. *J Immunol.* 2010, 185(11):7057-66.
145. Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007, 7(6):467-77.
146. Feigelson SW, Grabovsky V, Shamri R, Levy S, Alon R. The CD81 tetraspanin facilitates instantaneous leukocyte VLA-4 adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) under shear flow. *J Biol Chem.* 2003, 278(51):51203-12.
147. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 1993, 178(2):449-60.
148. Carman CV, Springer TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol.* 2004, 167(2):377-88.
149. Allingham MJ, van Buul JD, Burridge K. ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J Immunol.* 2007, 179(6):4053-64.
150. Liu G, Place AT, Chen Z, Brovkovich VM, Vogel SM, Muller WA, Skidgel RA, Malik AB, Minshall RD. ICAM-1-activated Src and eNOS signaling increase endothelial cell surface PECAM-1 adhesivity and neutrophil transmigration. *Blood.* 2012, 120(9):1942-52.
151. Wittchen ES. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009, 14:2522-45.
152. Vecchi A, Garlanda C, Lampugnani MG, Resnati M, Matteucci C, Stoppacciaro A, Schnurch H, Risau W, Ruco L, Mantovani A, Dejana E. Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol.* 1994, 63(2):247-54.

153. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol.* 2000, 20(11):4106-14.
154. Baez S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res.* 1973, 5(3):384-94.
155. Mempel TR, Moser C, Hutter J, Kuebler WM, Krombach F. Visualization of leukocyte transendothelial and interstitial migration using reflected light oblique transillumination in intravital video microscopy. *J Vasc Res.* 2003, 40(5):435-41.
156. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med.* 2013, 5(5):661-74.
157. Soehnlein O, Zerneck A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, Bidzhekov K, Rottenberg ME, Weber C, Lindbom L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood.* 2008, 112(4):1461-71.
158. Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood.* 2009, 114(21):4613-23.
159. Fenyo IM, Gafencu AV. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunobiology.* 2013, 218(11):1376-84.
160. Drechsler M, Megens RT, van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation.* 2010, 122(18):1837-1845.
161. Cauvi DM, Williams MR, Bermudez JA, Armijo G, De Maio A. Elevated expression of IL-23/IL-17 pathway-related mediators correlates with exacerbation of pulmonary inflammation during polymicrobial sepsis. *Shock.* 2014, 42(3):246-55.

162. Hilgendorf I, Gerhardt LM, Tan TC, Winter C, Holderried TA, Chousterman BG, Iwamoto Y, Liao R, Zirlik A, Scherer-Crosbie M, Hedrick CC, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res.* 2014, 114(10):1611-22.
163. Reichel CA, Khandoga A, Anders HJ, Schlondorff D, Luckow B, Krombach F. Chemokine receptors Ccr1, Ccr2, and Ccr5 mediate neutrophil migration to postischemic tissue. *Journal of leukocyte biology.* 2006, 79(1): 114-122.
164. 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): 880-890.
165. Reichel CA, Rehberg M, Lerchenberger M, Berberich N, Bihari P, Khandoga AG, Zahler S, Krombach F. Ccl2 and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid mediators. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2009, 29(11): 1787-1793.
166. Zernecke A, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2014, 34(4): 742-750.
167. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* 2007, 21(2):99-111.
168. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001, 12(5):261-73.
169. Corken A, Russell S, Dent J, Post SR, Ware J. Platelet glycoprotein Ib-IX as a regulator of systemic inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014, 34(5):996-1001.
170. Tamagawa-Mineoka R. Important roles of platelets as immune cells in the skin. *J Dermatol Sci.* 2014, S0923-1811(14)00247-3.

171. Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol*. 2013, 35(3):254-61.
172. Di Gennaro A, Kenne E, Wan M, Soehnlein O, Lindbom L, Haeggström JZ. Leukotriene B4-induced changes in vascular permeability are mediated by neutrophil release of heparin-binding protein (HBP/CAP37/azurocidin). *FASEB J*. 2009, 23(6):1750-7.
173. Soehnlein O, Oehmcke S, Ma X, Rothfuchs AG, Frithiof R, van Rooijen N, Mörgelin M, Herwald H, Lindbom L. Neutrophil degranulation mediates severe lung damage triggered by streptococcal M1 protein. *Eur Respir J*. 2008, 32(2):405-12.
174. Kahn R, Hellmark T, Leeb-Lundberg LM, Akbari N, Todiras M, Olofsson T, Wieslander J, Christensson A, Westman K, Bader M, Müller-Esterl W, Karpman D. Neutrophil-derived proteinase 3 induces kallikrein-independent release of a novel vasoactive kinin. *J Immunol*. 2009, 182(12):7906-15.
175. Lee TD, Gonzalez ML, Kumar P, Grammas P, Pereira HA. CAP37, a neutrophil-derived inflammatory mediator, augments leukocyte adhesion to endothelial monolayers. *Microvasc Res*. 2003, 66(1):38-48.
176. Taekema-Roelvink ME, Kooten C, Kooij SV, Heemskerk E, Daha MR. Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1. *J Am Soc Nephrol*. 2001, 12(5):932-40.
177. Soehnlein O, Zerneck A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, Bidzhekov K, Rottenberg ME, Weber C, Lindbom L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*. 2008, 112(4):1461-71.
178. Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*. 2003, 113(6):717-30.

179. Liu P, Patil S, Rojas M, Fong AM, Smyth SS, Patel DD. CX3CR1 deficiency confers protection from intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006, 26(9):2056-62.
180. Robbins CS, Chudnovskiy A, Rauch PJ, Figueiredo JL, Iwamoto Y, Gorbатов R, Etzrodt M, Weber GF, Ueno T, van Rooijen N, Mulligan-Kehoe MJ, Libby P, Nahrendorf M, Pittet MJ, Weissleder R, Swirski FK. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation.* 2012, 125(2):364-74.
181. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003, 284(4):L566-77.
182. De Serres SA, Vadivel N, Mfarrej BG, Grafals M, DeJoseph M, Dyer C, Magee CN, Chandraker A, Gallon LG, Najafian N. Monocyte-secreted inflammatory cytokines are associated with transplant glomerulopathy in renal allograft recipients. *Transplantation.* 2011, 91(5):552-9.
183. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002, 283(1):R7-28.
184. Rydström A, Wick MJ. Monocyte and neutrophil recruitment during oral Salmonella infection is driven by MyD88-derived chemokines. *Eur J Immunol.* 2009, 39(11):3019-30.
185. Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physiol.* 2012, 3:56. doi: 10.3389/fphys.2012.00056. eCollection 2012.
186. Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med.* 1997, *J Exp Med.* 1997
187. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94(22):12053-8.

188. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol.* 2006, 7(3):311-7.
189. Maus UA, Waelsch K, Kuziel WA, Delbeck T, Mack M, Blackwell TS, Christman JW, Schlöndorff D, Seeger W, Lohmeyer J. Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis. *J Immunol.* 2003, 170(6):3273-8.
190. Lu H, Huang D, Ransohoff RM, Zhou L. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *FASEB J.* 2011, 25(10):3344-55.
191. Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke.* 2007, 38(4):1345-53.
192. Katayama Y, Hidalgo A, Chang J, Peired A, Frenette PS. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *The Journal of experimental medicine.* 2005, 201(8): 1183-1189.
193. Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skoloff G, Tchernychev B, Williams E, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *The Journal of experimental medicine.* 1999, 190(12): 1769-1782.
194. Jung U, Ley K. Regulation of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule 1 expression in mouse cremaster muscle vasculature. *Microcirculation.* 1997, 4(2): 311-319.
195. Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood.* 1989, 73(5): 1109-1112.

196. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *The Journal of clinical investigation*. 1989, 84(1): 92-99.
197. Westmuckett AD, Thacker KM, Moore KL. Tyrosine sulfation of native mouse Psgl-1 is required for optimal leukocyte rolling on P-selectin in vivo. *PLoS One*. 2011, 6(5):e20406.
198. Spertini O, Cordey AS, Monai N, Giuffre L, Schapira M. P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes, and CD34+ hematopoietic progenitor cells. *The Journal of cell biology*. 1996, 135(2): 523-531.
199. Luscinskas FW, Kansas GS, Ding H, Pizcueta P, Schleiffenbaum BE, Tedder TF, Gimbrone MA Jr. Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins. *The Journal of cell biology*. 1994, 125(6): 1417-1427.
200. Kishimoto TK, Warnock RA, Jutila MA, Butcher EC, Lane C, Anderson DC, Smith CW. Antibodies against human neutrophil LECAM-1 (LAM-1/Leu-8/DREG-56 antigen) and endothelial cell ELAM-1 inhibit a common CD18-independent adhesion pathway in vitro. *Blood*. 1991, 78(3): 805-811.
201. Lim YC, Snapp K, Kansas GS, Camphausen R, Ding H, Luscinskas FW. Important contributions of P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated secondary capture to human monocyte adhesion to P-selectin, E-selectin, and TNF-alpha-activated endothelium under flow in vitro. *Journal of immunology*. 1998, 161(5): 2501-2508.
202. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 1999, 398(6729): 718-723.

203. Kaplanski G, Farnarier C, Tissot O, Pierres A, Benoliel AM, Alessi MC, Kaplanski S, Bongrand P. Granulocyte-endothelium initial adhesion. Analysis of transient binding events mediated by E-selectin in a laminar shear flow. *Biophysical journal*. 1993, 64(6): 1922-1933.
204. Ramos CL, Huo Y, Jung U, Ghosh S, Manka DR, Sarembock IJ, Ley K. Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation research*. 1999, 84(11): 1237-1244.
205. Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflammatory roles of P-selectin. *The Journal of clinical investigation*. 1993, 92(2): 559-570.
206. Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *The Journal of cell biology*. 1995, 128(4): 661-671.
207. Ley K, Tedder TF, Kansas GS. L-selectin can mediate leukocyte rolling in untreated mesenteric venules in vivo independent of E- or P-selectin. *Blood*. 1993, 82(5): 1632-1638.
208. Ley K, Zakrzewicz A, Hanski C, Stoolman LM, Kansas GS. Sialylated O-glycans and L-selectin sequentially mediate myeloid cell rolling in vivo. *Blood*. 1995, 85(12): 3727-3735.
209. Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, Ley K. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *The Journal of experimental medicine*. 2003, 197(10): 1355-1363.
210. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991, 88(17): 7538-7542.

211. Ley K, Bullard DC, Arbonés ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, Beaudet AL. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 1995, 181(2): 669-675.
212. Kunkel EJ, Jung U, Bullard DC, Norman KE, Wolitzky BA, Vestweber D, Beaudet AL, Ley K. Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and intercellular adhesion molecule 1. *The Journal of experimental medicine*. 1996, 183(1): 57-65.
213. Kunkel EJ, Ley K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circulation research*. 1996, 79(6): 1196-1204.
214. Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood*. 1995, 86(12): 4417-4421.
215. Hutas G, Bajnok E, Gal I, Finnegan A, Glant TT, Mikecz K. CD44-specific antibody treatment and CD44 deficiency exert distinct effects on leukocyte recruitment in experimental arthritis. *Blood*. 2008, 112(13): 4999-5006.
216. Kuwano Y, Spelten O, Zhang H, Ley K, Zarbock A. Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood*. 2010, 116(4): 617-624.
217. Stadtmann A, Germena G, Block H, Boras M, Rossaint J, Sundd P, Lefort C, Fisher CI, Buscher K, Gelschefarth B, Urzainqui A, Gerke V, Ley K, Zarbock A. The PSGL-1-L-selectin signaling complex regulates neutrophil adhesion under flow. *The Journal of experimental medicine*. 2013, 210(11): 2171-2180.
218. Yago T, Shao B, Miner JJ, Yao L, Klopocki AG, Maeda K, Coggeshall KM, McEver RP. E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin alphaLbeta2-mediated slow leukocyte rolling. *Blood*. 2010, 116(3): 485-494.

219. Ley K, Zakrzewicz A, Hanski C, Stoolman LM, Kansas GS. Sialylated O-glycans and L-selectin sequentially mediate myeloid cell rolling in vivo. *Blood*. 1995, 85(12): 3727-3735.
220. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2013, 13(3): 159-175.
221. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews Immunology*. 2007, 7(9): 678-689.
222. Reichel CA, Kanse SM, Krombach F. At the interface of fibrinolysis and inflammation: the role of urokinase-type plasminogen activator in the leukocyte extravasation cascade. *Trends in cardiovascular medicine*. 2012, 22(7): 192-196.
223. Vestweber D. Novel insights into leukocyte extravasation. *Current opinion in hematology*. 2012, 19(3): 212-217.
224. Schober A, Zerneck A, Liehn EA, von Hundelshausen P, Knarren S, Kuziel WA, Weber C. Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets. *Circ Res*. 2004, 95(11):1125-33.
225. Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, Cuartero MI, Rossaint J, Bilbao I, Nacher M, Pitaval C, Radovanovic I, Fukui Y, McEver RP, Filippi MD, Lizasoain I, Ruiz-Cabello J, Zarbock A, Moro MA, Hidalgo A. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science*. 2014, 346(6214):1234-8.
226. Hutas G, Bajnok E, Gal I, Finnegan A, Glant TT, Mikecz K. CD44-specific antibody treatment and CD44 deficiency exert distinct effects on leukocyte recruitment in experimental arthritis. *Blood*. 2008, 112(13): 4999-5006.
227. Kuwano Y, Spelten O, Zhang H, Ley K, Zarbock A. Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood*. 2010, 116(4): 617-624.

228. Montecucco F, Steffens S, Burger F, Da Costa A, Bianchi G, Bertolotto M, Mach F, Dallegri F, Ottonello L. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cell Signal*. 2008, 20(3):557-68.
229. Yang Y, Harrison JE, Print CG, Lehnert K, Sammar M, Lazarovits A, Krissansen GW. Interaction of monocytoïd cells with the mucosal addressin MAdCAM-1 via the integrins VLA-4 and LPAM-1. *Immunol Cell Biol*. 1996, 74(5):383-93.
230. Weber C, Springer TA. Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J Immunol*. 1998, 161(12):6825-34.
231. Jung U, Ley K. Regulation of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule 1 expression in mouse cremaster muscle vasculature. *Microcirculation*. 1997, 4(2):311-9.
232. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007, 7(10):803-15.
233. Schmitt MM, Megens RT, Zernecke A, Bidzhekov K, van den Akker NM, Rademakers T, van Zandvoort MA, Hackeng TM, Koenen RR, Weber C. Endothelial junctional adhesion molecule-a guides monocytes into flow-dependent predilection sites of atherosclerosis. *Circulation*. 2014, 129(1):66-76.
234. Cera MR, Fabbri M, Molendini C, Corada M, Orsenigo F, Rehberg M, Reichel CA, Krombach F, Pardi R, Dejana E. JAM-A promotes neutrophil chemotaxis by controlling integrin internalization and recycling. *J Cell Sci*. 2009, 122(Pt 2):268-77.
235. Küppers V, Vestweber D, Schulte D. Locking endothelial junctions blocks leukocyte extravasation, but not in all tissues. *Tissue Barriers*. 2013, 1(1):e23805.

8. Danksagung

Prof. Dr. rer. nat. Kirsten Lauber danke ich für die Ermöglichung der Dissertation sowie die exzellente Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit.

Bei Dr. med. Christoph Reichel möchte ich mich besonders für die vielen Ideen, die ständige Hilfsbereitschaft und sein Engagement in allen meinen Projekten bedanken, was wesentlich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen hat.

Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach danke ich für die Möglichkeit, die *In-vivo*-Experimente in seinen Laborräumen am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin durchzuführen, sowie für die hervorragende Mitbetreuung meiner Dissertation.

Allen Mitarbeitern im Labor der Molekularen Onkologie am Klinikum Großhadern, insbesondere Anne Ernst und Roman Hennel, danke ich für ihre Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Krombach am Walter-Brendel-Zentrum, vor allem Bernd Uhl, Daniel Pühr-Westerheide, Max Hessenauer, Matthias Fabritius, Michaela Pörnbacher, Kariem Sharaf, Gerhard Adams, Sabine Sellner, Katharina Nekolla, Stefanie Hirn, Nadine Haberl und Claudia Fahney, für eine schöne Zeit bedanken.

Großer Dank gilt auch den Mitarbeitern der Tierhaltung am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, ohne deren Hilfe meine Projekte nicht durchführbar gewesen wären.

Außerdem möchte ich mich beim Sonderforschungsbereich 914 bedanken, dass ich am Programm des Graduiertenkollegs teilnehmen durfte und an vielen wissenschaftlich besonders hochwertigen Veranstaltungen teilhaben konnte.

Meinen Eltern und meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung.

9. Publikationen

Die Ergebnisse vorliegender Dissertation wurden zum Teil in folgenden Originalia und wissenschaftlichen Vorträgen publiziert:

Originalia

1. Zuchtriegel G, Uhl B, Pühr-Westerheide D, Pörnbacher M, Lauber K, Krombach F, and Reichel CA. Platelets direct leukocytes to their sites of extravasation. *Angenommen bei Plos Biology*.
2. Kinzel L, Ernst A, Orth M, Albrecht V, Frey B, Gaigl US, Zuchtriegel G, Reichel CA, Blutke A, Schilling D, Multhoff G, Niyazi M, Friedl AA, Winssinger N, Belka C, Lauber K. A novel HSP90 inhibitor with reduced hepatotoxicity synergizes with radiotherapy to induce apoptosis, abrogate clonogenic survival, and improve tumor control in models of colorectal cancer. *Angenommen bei Oncotarget*.
3. Mulay SR, Desai J, Kumar Vr S, Eberhard JN, Thomasova D, Romoli S, Grigorescu M, Kulkarni OP, Popper B, Vielhauer V, Zuchtriegel G, Reichel CA, Bräsen JH, Romagnani P, Bilyy R, Munoz L, Herrmann M, Liapis H, Krautwald S, Linkermann A. Cytotoxicity of crystals involves RIPK3-MLKL-mediated necroptosis in kidney stone disease. *Nat Commun*. 2016 Jan 28; 7:10274.
4. Kumar Vr S, Darisipudi MN, Steiger S, Devarapu SK, Tato M, Kukarni OP, Mulay SR, Thomasova D, Popper B, Demleitner J, Zuchtriegel G, Reichel C, Cohen CD, Lindenmeyer MT, Liapis H, Moll S, Reid E, Stitt AW, Schott B, Gruner S, Haap W, Ebeling M, Hartmann G, Anders HJ. Cathepsin S Cleavage of Protease-Activated Receptor-2 on Endothelial Cells Promotes Microvascular Diabetes Complications. *J Am Soc Nephrol*. 2015, pii: ASN.2015020208.

5. Zuchtriegel G, Uhl B, Hessenauer MET, Kurz A, Rehberg M, Lauber K, Krombach F, and Reichel CA. Spatio-temporal expression dynamics of selectins govern the sequential extravasation of neutrophils and monocytes in the acute inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35(4):899-910.
6. Haberl N, Hirn S, Holzer M, Zuchtriegel G, Rehberg M, Krombach F. Effects of acute systemic administration of TiO₂SiO₂, ZnO, and Ag nanoparticles on hemodynamics, hemostasis, and leukocyte recruitment. *Nanotoxicology.* 2015, 11:1-9.
7. Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N, Mulay SR, Dewitz C, De Zen F, Prokai A, Zuchtriegel G, Krombach F, Welz PS, Weinlich R, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Pasparakis M, Bleich M, Weinberg JM, Reichel CA, Bräsen JH, Kunzendorf U, Anders HJ, Stockwell BR, Green DR, Krautwald S. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014, 111(47):16836-41.
8. Uhl B, Zuchtriegel G, Pühr-Westerheide D, Praetner M, Rehberg M, Fabritius M, Hessenauer M, Holzer M, Khandoga A, Fürst R, Zahler S, Krombach F, Reichel CA. Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014, 34(7):1495-504.
9. Lerchenberger M, Uhl B, Stark K, Zuchtriegel G, Eckart A, Miller M, Pühr-Westerheide D, Praetner M, Rehberg M, Khandoga AG, Lauber K, Massberg S, Krombach F, Reichel CA. Matrix metalloproteinases modulate amoeboid-like migration of neutrophils through inflamed interstitial tissue. *Blood.* 2013, 122(5):770-80.
10. Reichel CA, Pühr-Westerheide D, Zuchtriegel G, Uhl B, Berberich N, Zahler S, Wymann MP, Luckow B, Krombach F. C-C motif chemokine CCL3 and canonical neutrophil attractants promote neutrophil extravasation through common and distinct mechanisms. *Blood.* 2012, 120(4):880-90.

Wissenschaftliche Vorträge

Datum	Veranstaltung	Titel
26. – 29. Februar, 2012	Poster Präsentation (Retreat des SFB 914, Schloss Ringberg, Kreuth, Deutschland)	<i>Tissue-type Plasminogen Activator Contributes to Postischemic Neutrophil Recruitment</i>
15. - 18. Oktober, 2012	Vortrag (Retreat des IRTG, VIU, San Servolo, Italien)	<i>Mechanisms Underlying Leukocyte Recruitment by C-C Motif Chemokines</i>
17. – 20. März, 2013	Poster Präsentation (Retreat des SFB 914, Obergurgl Universitätszentrum, Austria)	<i>Mechanisms Underlying Monocyte Recruitment by C-C Motif Chemokine CCL2</i>
17. – 20. April, 2013	Poster Präsentation (Phagocyte workshop, 47 th Annual ESCI Meeting, Albufeira, Portugal)	<i>Mechanisms Underlying Monocyte Recruitment by C-C Motif Chemokine CCL2</i>
21. – 26. Juli, 2013	Poster Präsentation (37 th World Congress of the International Union of Physiological Sciences, Birmingham, UK)	<i>Vitronectin Stabilizes Neutrophil- Endothelial Cell Interactions in the Inflamed Microvasculature</i>
26. – 28. September, 2013	Vortrag (35. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie, Dresden, Deutschland)	<i>Inflammatory Monocytes Differentially Engage Selectins in their Extravasation Process</i>
21. – 24. Oktober, 2013	Vortrag (Retreat des IRTG, Villa Vigoni, Italien)	<i>Inflammatory Monocytes Differentially Engage Selectins in their Extravasation Process</i>

17. – 20. April, 2014	Poster Präsentation (18 th International Vascular Biology Meeting, Kyoto, Japan)	<i>Mechanisms Underlying Monocyte Recruitment by C-C Motif Chemokine CCL2</i>
30. September – 2. Oktober, 2014	Poster Präsentation (36. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie, Münster, Deutschland)	<i>Neutrophils and Inflammatory Monocytes Differentially Engage β1 and β2 Integrins in their Extravasation Process</i>
3. – 6. November, 2014	Vortrag (Retreat des IRTG, Schloss Reisensburg, Günzburg, Deutschland)	<i>Spatio-temporal Expression of Selectins Govern the Sequential Extravasation of Neutrophils and Monocytes</i>
30. – 31. Mai, 2015	Vortrag (Gordon Research Seminar Phagocytes, Waterville Valley, USA)	<i>Spatio-temporal expression dynamics of selectins govern the sequential extravasation of neutrophils and monocytes</i>
31. Mai – 5. Juni, 2015	Poster Präsentation (Gordon Research Conference Phagocytes, Waterville Valley, USA)	<i>Platelets guide leukocytes to their sites of extravasation</i>
24. – 26. September, 2015	Vortrag (37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie, Hannover, Deutschland)	<i>Platelets guide leukocytes to their sites of extravasation</i>
28. September – 1. Oktober, 2015	Vortrag (Symposium des SFB 914, Villa Vigoni, Italien)	<i>Vitronectin stabilizes neutrophil- endothelial cell interactions in the inflamed microvasculature</i>

10. Eidesstattliche Versicherung

Zuchtriegel, Gabriele

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

**Mechanismen der Extravasation von neutrophilen Granulozyten und
inflammatorischen Monozyten im akuten Entzündungsgeschehen**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche erkenntlich 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 ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

