

**Aus dem Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Direktor : Prof. Dr. med. U. Pohl**

# Nachweis pro-inflammatorischer Eigenschaften extrazellulärer RNA *in vivo*

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

Vorgelegt von  
Tobias Grantzow

aus

München

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatterin : Priv. Doz. Dr. rer. nat. Elisabeth Deindl

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Gerd Juchem  
Prof. Dr. med. Christian Weber

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

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

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2017

*Meinen Eltern*

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in *Thrombosis & Haemostasis* 2012; 108 (4): 730-41

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Leukozytenrekrutierung.....	3
1.1.1. Einfangen und Rollen der Leukozyten .....	4
1.1.2. Feste Adhäsion.....	4
1.1.3. Transmigration.....	6
1.2. TNF- $\alpha$ .....	7
1.3. Das RNA/RNase System .....	8
1.3.1. Ribonukleinsäure (RNA).....	8
1.3.2. Extrazelluläre RNA .....	10
1.3.3. Vascular endothelial cell growth factor A (VEGF-A) und VEGF-Rezeptoren.....	12
1.3.4. RNasen.....	13
1.3.5. RNase A und RNase 1.....	13
2. Fragestellung und Zielsetzung.....	14
3. Material und Methoden .....	15
3.1. Materialien.....	15
3.1.1. Chemikalien und Enzyme.....	15
3.1.2. Puffer und Lösungen.....	16
3.1.3. Medikamente .....	17
3.1.4. Geräte und Instrumente .....	17
3.1.5. Verbrauchsmaterialien .....	18
3.1.6. Software.....	18
3.2. Methoden .....	19
3.2.1. Isolierung von RNA aus Oberschenkelmuskulatur der Maus .....	19
3.2.2. Isolierung von DNA aus Oberschenkelmuskulatur der Maus.....	21

3.2.3. Intravitalmikroskopie am Entzündungsmodell des <i>M. cremaster</i> .....	21
3.2.3.1. Versuchstiere.....	21
3.2.3.2. Narkose.....	22
3.2.3.3. Vorbereitung der Superfusionslösung.....	22
3.2.3.4. Kanülierung der <i>A. carotis communis</i> .....	22
3.2.3.5. Präparation des <i>M. cremaster</i> und Intravitalmikroskopie .....	23
3.3. Histologische Untersuchungen am <i>M. cremaster</i> .....	25
3.4. Intravitalmikroskopische Versuchsreihen.....	27
3.4.1. Vorstimulation mit NaCl, TNF- $\alpha$ und RNA mit anschließender RNase Gabe.....	27
3.4.2. Vorstimulation mit DNA, mit NaOH lysierter RNA, mit RNase degradiertes RNA und RNA27	
3.4.3. Vorbehandlung mit TNF- $\alpha$ Antikörper Infliximab vor Vorstimulation mit TNF- $\alpha$ , NaCl und RNA .....	27
3.4.4. Vorbehandlung mit VEGF-R-2 Antikörper SU-5416 vor Vorstimulation mit TNF- $\alpha$ und RNA .....	28
3.5. Histologische Präparate ohne Vorstimulation, nach Vorstimulation mit NaCl, TNF- $\alpha$ und RNA28	
3.6. Statistische Auswertung.....	28
4. Ergebnisse.....	29
4.1. Intravitalmikroskopie .....	29
4.1.1. Vorstimulation mit NaCl, TNF- $\alpha$ und RNA mit anschließender RNase A Gabe.....	29
4.1.2. Mit NaOH hydrolysierte RNA, mit RNase A degradierte RNA und DNA haben keinen Einfluss auf die Leukozytenadhäsion und die Rolling Flux Fraction .....	33
4.1.3. Der TNF- $\alpha$ Antikörper Infliximab reduziert die RNA-abhängige Adhäsion von Leukozyten nicht .....	35
4.1.4. Der VEGF-R-2 Antikörper SU-5416 reduziert die RNA-abhängige Adhäsion von Leukozyten .....	38
4.2. Histologie .....	42
4.2.1. Intravaskuläre Adhäsion der gesamten Leukozytenpopulation.....	42
4.2.2. Relative Anteile der einzelnen Leukozyten-Subpopulationen intravaskulär.....	43
4.2.3. Gesamtzahl der perivaskulären Leukozyten.....	44

4.2.4. Relative Anteile der einzelnen Leukozyten-Subpopulationen perivaskulär .....	45
5. Diskussion .....	46
5.1. RNA als pro-inflammatorischer Stimulus, RNase A als Konterpart .....	46
5.2. DNA, mit NaOH hydrolysierte RNA und mit RNase degradierte RNA zeigen keinen Einfluss auf die Leukozytenrekrutierung .....	49
5.3. Der akute proinflammatorische Effekt von RNA ist nicht durch TNF- $\alpha$ getriggert .....	50
5.4. Der proinflammatorische Effekt von RNA ist abhängig von VEGF-R-2 .....	51
5.5. Histologie .....	52
6. Zusammenfassung .....	53
7. Anhang .....	55
7.1. Abkürzungsverzeichnis .....	55
7.2. Tabellenverzeichnis .....	56
7.3. Abbildungsverzeichnis .....	56
7.4. Literaturverzeichnis .....	58
7.5. Veröffentlichungen .....	62
8. Danksagungen .....	64
9. Eidesstattliche Versicherung .....	65

## 1. Einleitung

Das Immunsystem dient der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen und der Bekämpfung von Infektionen. Es wird unterschieden in eine angeborene und erworbene Komponente. Im Rahmen der erworbenen Komponente verbessert sich die Immunantwort auf einen entzündlichen Stimulus nach mehrmaliger Exposition. Die zelluläre Komponente des erworbenen Immunsystems besteht aus den Antigen-spezifischen B- und T-Lymphozyten sowie spezifischen Antikörpern, die von B-Lymphozyten produziert werden. Das angeborene Immunsystem reagiert auf einen Stimulus unabhängig von der Häufigkeit der Exposition. Die zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems besteht aus Zellen der Phagozytose wie Monozyten, neutrophilen Granulozyten sowie aus Zellen, die Mediatoren der Entzündungsreaktion ausschütten. Zu diesen gehören basophile und eosinophile Granulozyten sowie Mastzellen. Auf molekularer Ebene besteht das angeborene Immunsystem aus dem Komplementsystem, Akute-Phase-Proteinen und Zytokinen. Diese modulieren die Immunantwort [1]. Abbildung 1 zeigt die Einteilung des Immunsystems in die angeborene und erworbene Komponente.



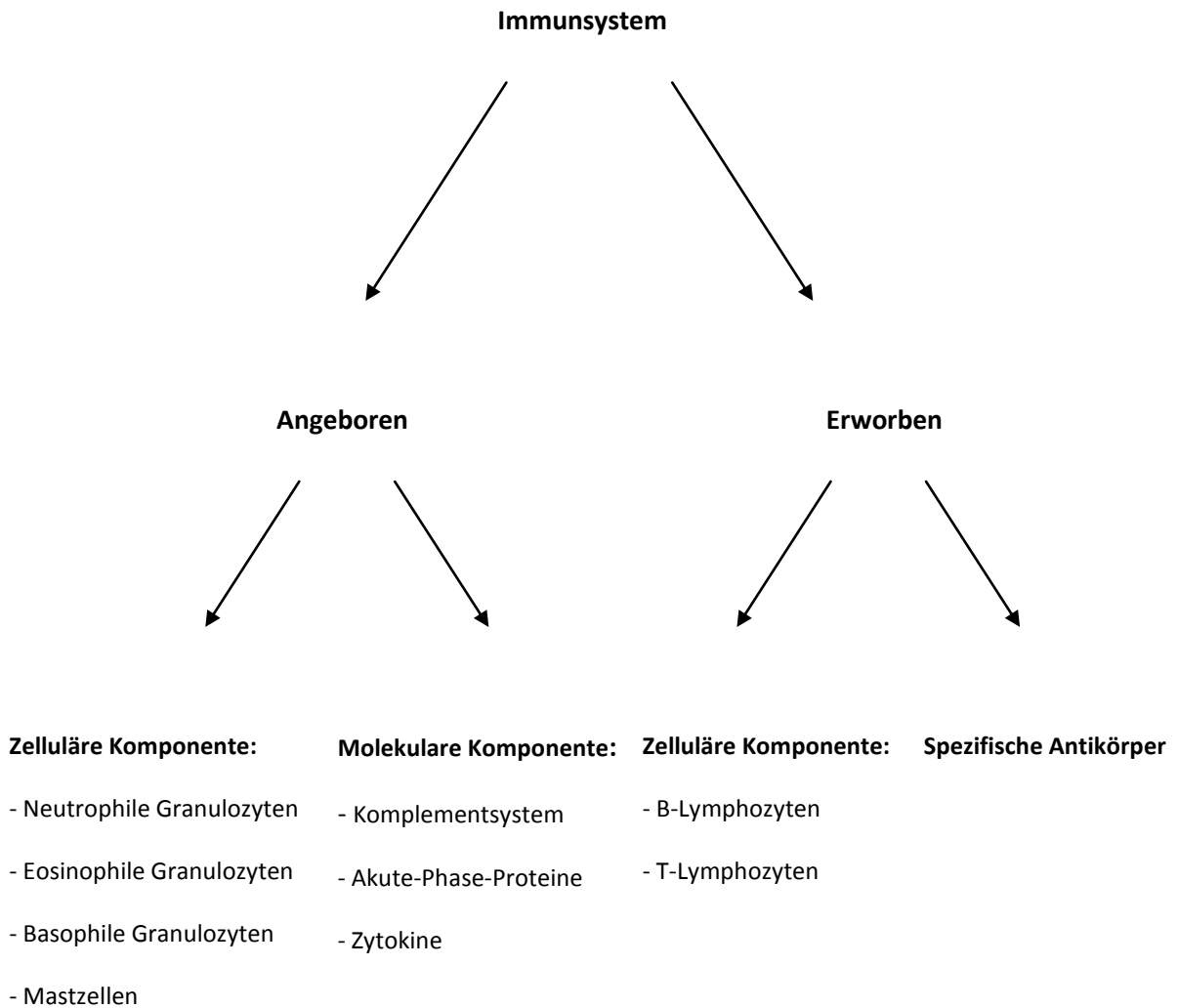


Abbildung 1: Einteilung des Immunsystems in eine angeborene und erworbene Komponente.

Für die vorliegende Arbeit ist das angeborene Immunsystem von Bedeutung. Im Falle einer akuten Entzündung sind hier die neutrophilen Granulozyten die entscheidende zelluläre Komponente der Abwehr. Neutrophile Granulozyten entstammen dem Knochenmark und zirkulieren im Blutkreislauf für wenige Stunden. Um mögliche pathogene Mikroorganismen zu bekämpfen müssen sie das vaskuläre System verlassen und in den betroffenen Gewebeabschnitt auswandern. Dies erfolgt über die lokale Hochregulation bestimmter Zytokine wie zum Beispiel TNF- $\alpha$  und verschiedenen Interleukinen. Nach dem Auswandern erfolgt die Sekretion von Zytokinen, die Phagozytose pathogener Mikroorganismen und anschließend die Nekrose oder Apoptose [2].

## 1.1. Leukozytenrekrutierung

Das Auswandern von Leukozyten aus dem Gefäßsystem ist die entscheidende Reaktion des Körpers auf Entzündungen und Verletzungen. Über einen mehrstufigen Prozess werden Leukozyten aktiviert und gelangen nach Andocken, schnellen Rollen, langsamen Rollen, fester Adhäsion und Transmigration aus postkapillären Venolen in das perivaskuläre Gewebe [3]. Abbildung 2 zeigt den schematischen Ablauf der Leukozytenrekrutierung bis hin zur Transmigration.

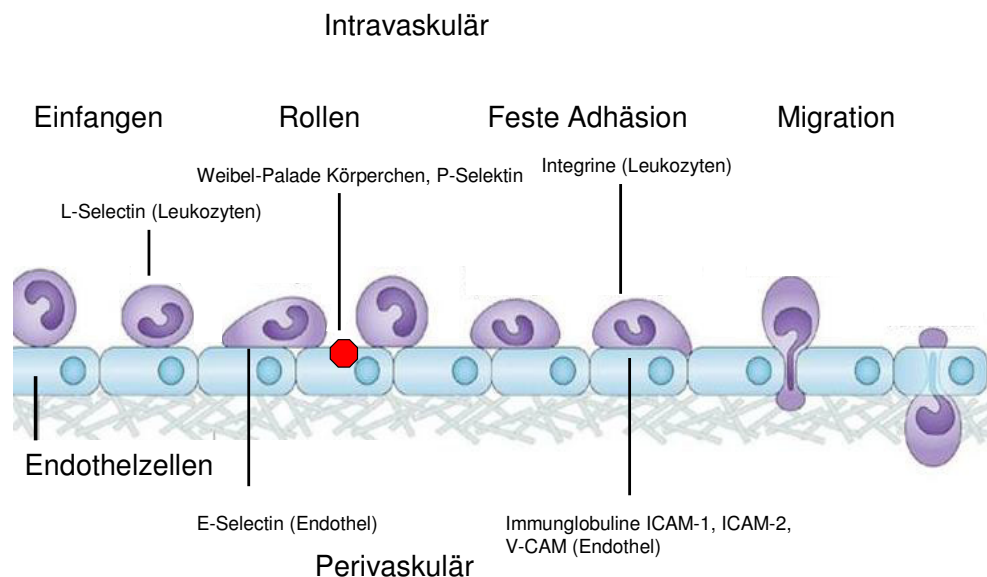


Abbildung 2: Schematischer Ablauf der einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung. Im ersten Schritt docken die frei schwimmenden Leukozyten über Selektine an der Gefäßwand an. Nach dem Andocken erfolgt ein schnelles Rollen. Nach der Aktivierung der Leukozyten verlangsamt sich die Rollgeschwindigkeit und geht in eine feste Adhäsion der Leukozyten an der Gefäßwand über. Dann folgt die Migration in das perivaskuläre Gewebe. Hier wird zwischen einer parazellulären und transzellulären Migration unterschieden. Modifiziert nach Ley et al. 2007, Nature reviews, Sep. 7 Seite 678-689

### 1.1.1. Einfangen und Rollen der Leukozyten

Initialer Schritt ist das Einfangen der frei in der Blutbahn schwimmenden Leukozyten (Capture) und das anschließende Rollen von Leukozyten an der Gefäßwand. Dieser Schritt ist durch Selektine bedingt, die in L-, P- und E-Selektine unterschieden werden [4, 5]. L-Selektin wird auf der Oberfläche von fast allen Leukozyten exprimiert. L-Selektin bindet an glykosylierten Anteilen seiner Liganden, die auf dem Endothel von entzündlichem Gewebe und auf Leukozyten selbst exprimiert werden und ist auch an der Bindung zwischen bereits adhären und frei schwimmenden Leukozyten beteiligt [6-8]. E-Selektin wird auf aktiviertem Endothel von Blutgefäßen vermehrt als Antwort auf entzündliche Stimuli wie Interleukin-1, TNF- $\alpha$  oder bakterielle Lipopolysaccharide exprimiert und ist für das langsame Rollen von Leukozyten an der Gefäßwand verantwortlich [8, 9]. P-Selektin wird in Endothelzellen und Thrombozyten gebildet und in  $\alpha$ -Granula und Weibel-Palade-Körperchen als intrazelluläre Speicher gelagert. Proinflammatorische Stimuli wie Thrombin, Histamin und Komplementfaktoren führen innerhalb von Minuten zu einer Fusion der intrazellulären Speicher mit der Zellmembran und sind so für die Initialphase des Leukozytenrollens auf luminalen Seite von vaskulären Endothelien verantwortlich. Auf Transkriptionsebene wird P-Selektin nach 2 bis 4 Stunden durch Lipopolysaccharide, TNF- $\alpha$  oder Interleukin-1 hochreguliert [8].

### 1.1.2. Feste Adhäsion

Der Übergang vom Rollen zur Adhäsion wird über Chemokine und andere Botenstoffe getriggert. Dies führt zu einer festen Bindung zwischen den Integrinen der Leukozyten und den Adhäsionsmolekülen der Endothelzellen [4]. Die für die feste Adhäsion wichtigen Integrine gehören der  $\beta$ 2-Klasse an und werden in die 4 Untereinheiten LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), p150,95 (CD11c/CD18) und  $\alpha$ d  $\beta$ 2 (CD11d/CD18) eingeteilt. Integrine sind im Normalzustand inaktiviert und nicht bindungsfähig, erst durch die Aktivierung des Leukozyten durch Chemokine und andere Botenstoffe ändern sie über „Inside-Out-Signalling“ ihre Konformation und können mit ihren Liganden eine feste Bindung eingehen [10]. Die wichtigsten Liganden sind dabei die Immunglobuline ICAM-1, ICAM-2, VCAM. ICAM-1 kann auf Endothelzellen nachgewiesen werden. Unter dem Einfluss von Chemokinen und Mediatoren wie TNF- $\alpha$  wird ICAM-1 im entzündeten Gewebe hochreguliert und ist auf der Zelloberfläche von Endothelzellen vermehrt nachweisbar. ICAM-1 bindet

LFA-1, Mac-1 und p150/95 und ist der wichtigste Ligand zwischen neutrophilen Granulozyten und entzündetem Endothel [11, 12]. ICAM-2 wird unabhängig von entzündlichen Stimuli exprimiert und ist auf der Oberfläche von Endothelzellen und Leukozyten nachweisbar. Ausgenommen hiervon sind die neutrophilen Granulozyten. ICAM-2 bindet mit starker Affinität an LFA-1 [12, 13]. VCAM-1 ist vor allem auf Endothelzellen nachweisbar und wird in arteriosklerotischen Plaques vermehrt exprimiert [14]. Tabelle 1 zeigt einen Überblick über verschiedenen Adhäsionsmoleküle, deren Vorkommen und die entsprechenden Liganden.

<b>Adhäsionsmolekül</b>	<b>Synonym</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Hauptligand</b>
<i>Selektine</i>			
L-Selectin	CD62L	Leukozyten	CD34, Glycam-1, MAdCam-1, PSGL-1
P-Selectin	CD62P	Endothelzellen, Thrombozyten	PSGL-1
E-Selectin	CD62E	Endothelzellen	ESL-1, PSGL-1
<i>Integrine</i>			
<i><math>\beta_1</math>-Integrine</i>			
$\alpha_4/\beta_1$	CD49d/CD29, VLA-4	Lymphozyten, Monozyten	VCAM-1, fibronectin
<i><math>\beta_2</math>-Integrine</i>			
$\alpha_L/\beta_2$	CD11a/CD18, LFA-1	Leukozyten	ICAM-1, -2, -3
$\alpha_M/\beta_2$	CD11b/CD18, Mac-1	Neutrophile, Monozyten	ICAM-1, fibrinogen, C3bi, factor X
$\alpha_X/\beta_2$	CD11c/CD18, gp150/95	Neutrophile, Monozyten	ICAM-1, fibrinogen, C3bi
$\alpha_D/\beta_2$	CD11d/CD18	Lymphozyten	VCAM-1, ICAM-3

Adhäsionsmolekül	Synonym	Vorkommen	Hauptligand
<i><math>\beta_3</math>-Integrine</i>			
$\alpha_v/\beta_3$	CD51/CD61	Leukozyten	Vitronectin, CD31
<i><math>\beta_7</math>-Integrine</i>			
$\alpha_4/\beta_7$	CD49d/ $\beta_7$	Lymphozyten	VCAM-1, MAdCam-1
$\alpha_E/\beta_7$	CD103/ $\beta_7$	Lymphozyten	E-cadherin
<i>Immunoglobuline</i>			
ICAM-1	CD54	Endothelzellen	LFA-1, gp150/95
ICAM-2	CD102	Endothelzellen	LFA-1, (Mac-1)
ICAM-3	CD50	Leukozyten	LFA-1, $\alpha_D/\beta_2$
VCAM-1	CD106	Endothelzellen	$\alpha_4/\beta_1$ , $\alpha_4/\beta_7$
PECAM-1	CD31	Neutrophile, Monozyten, Thrombozyten, Endothelzellen	CD31, $\alpha_v/\beta_3$
<i>Weitere</i>			
CD44		Leukozyten	Hyaluronan
VAP-1		Endothelzellen	?

Tabelle 1: Adhäsionsmoleküle mit Vorkommen und Liganden. Modifiziert nach: Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation, B. Walzog, P. Gaehtgens, News in physiological science, Juni 2000, 15, 107-113

### 1.1.3. Transmigration

Die Transmigration aus dem Gefäßlumen in das perivaskuläre Gewebe ist der letzte Schritt der Leukozytenrekrutierung. Dabei durchwandern die Leukozyten die Endothelschicht, die Basalmembran und die umgebende Schicht aus Perizyten. Bei der Durchwanderung der

Endothelzellschicht wird zwischen einem parazellulären und einem transzellulären Weg unterschieden [4]. Bei der parazellulären Transmigration löst das Andocken der Leukozyten an der Gefäßwand über intrazelluläre Signalkaskaden eine Lockerung der interzellulären Zell-Zell-Kontakte aus und die Endothelzellschicht wird passierbar [15]. Im Rahmen der transzellulären Migration bleiben die Zell-Zell-Kontakte intakt und die Migration erfolgt über transiente Poren in der Endothelzelle [16].

## 1.2. TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, das primär von Makrophagen und T-Zellen, exprimiert wird, aber auch von Langerhanszellen, Astrogliazellen, Mikrogliazellen, Kupferzellen, Alveolarmakrophagen und anderen. Es wird vermehrt nach Traumata und bei Infektionen ausgeschüttet. TNF- $\alpha$  bindet an zwei verschiedenen Rezeptoren: Der TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) wird konstitutiv auf allen Gewebearten exprimiert und initiiert die proinflammatorische Wirkung von TNF- $\alpha$ , der TNF-Rezeptor 2 (TNFR2) nur auf Zellen des Immunsystems und wirkt modulierend auf die TNFR1 Wirkung [17-19]. Nach Bindung von TNF- $\alpha$  an den TNFR1 wird die Zelle entweder über die Caspase 8 in die Apoptose geführt oder führt über eine Aktivierung von „Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“ (NF- $\kappa$ B) und die „Mitogen activated kinase“ (MAPK) zur Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen und Cytokinen [17]. So führt die exogene Applikation von TNF- $\alpha$  zu einer verstärkten Expression von ICAM-1 und E-Selektin in postkapillären Venolen des *M. cremaster* der Maus [20]. Abbildung 3 zeigt die zwei verschiedenen Rezeptoren für TNF- $\alpha$  und die untergeordneten Signalkaskaden.

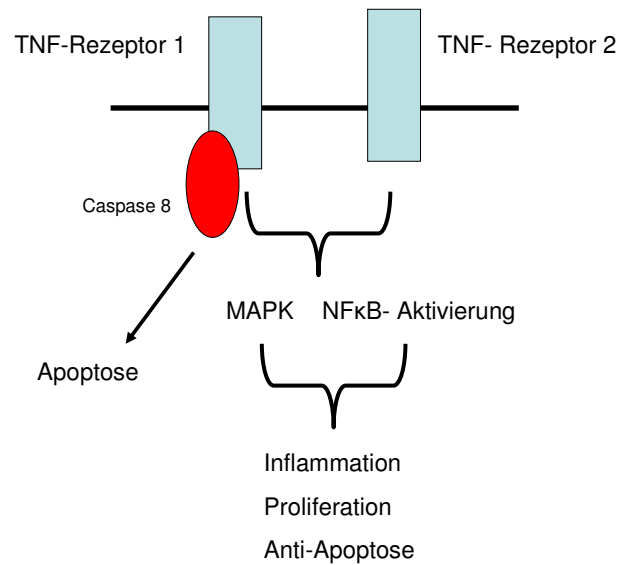


Abbildung 3: Die TNF- $\alpha$ -Rezeptoren 1 und 2. Die Bindung an den Rezeptor 1 führt die Zelle über untergeordnete Signalkaskaden in die Apoptose oder über einen alternativen Signalweg über die MAPK und NF $\kappa$ B zu einer proinflammatorischen Antwort. Die Bindung an den Rezeptor 2 wirkt modulierend auf die Wirkung des Rezeptor 1. Modifiziert nach Parameswaran N, Patial S. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2010;20(2):87-103. Review.

### 1.3. Das RNA/RNase System

#### 1.3.1. Ribonukleinsäure (RNA)

In der menschlichen Zelle existieren verschiedene Arten von Ribonukleinsäuren (RNA). RNAs sind an der Gen-Expression beteiligt und erfüllen weiter eine Funktion als Strukturelemente. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht verschiedener RNA-Typen und deren Funktion.

<b>Typ</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Funktion</b>
Kodierende RNA	messenger RNA (mRNA)	Proteinbiosynthese
Nicht-kodierende RNA mit strukturell katalytischer Funktion	transfer RNA (tRNA)	Translation der genetischen Funktion
	ribosomale RNA (rRNA)	Strukturelement der Ribosomen Katalysator bei der Knüpfung von Peptidbindungen
	small nuclear (snRNA)	Spleißen der Prä-mRNA Strukturelement der Spleißosomen
	small nucleolar RNA (snoRNA)	RNA-Modifikation Spleißen der der Prä-rRNA
	75SL-RNA im "signal recognition particle RNA"	Intrazellulärer Proteintransport
	Ribonuklease P-RNA	Reifung der prä-tRNA
	Telomerase-RNA	DNA Synthese an den Telomeren
Nicht-kodierende RNA mit regulatorischer Funktion	micro-RNA (miRNA)	Abbau von mRNA
	small interfering RNA (siRNA)	Hemmung der Translation Regulation der Genexpression
	antisense-RNA	Regulation der Genexpression
	X-inactive-specific transcript RNA ( Xist-RNA)	Inaktivierung des X-Chromosoms

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen RNA-Arten in der menschlichen Zelle. Modifiziert nach Löffler et. al., Biochemie und Pathobiochemie, Springer, 9. Auflage, Seite 147 [21].

Der Gehalt an RNA in der menschlichen Zelle ist höher als an DNA [22]. Auch liegt RNA im Unterschied zur DNA prinzipiell als Einzelstrang vor, auf Grund von intramolekularen



Basenpaarungen bildet sich aber auch innerhalb der RNA häufig eine Doppelhelix aus [23].  
Abbildung 4 zeigt exemplarisch die schematische Struktur einer tRNA.

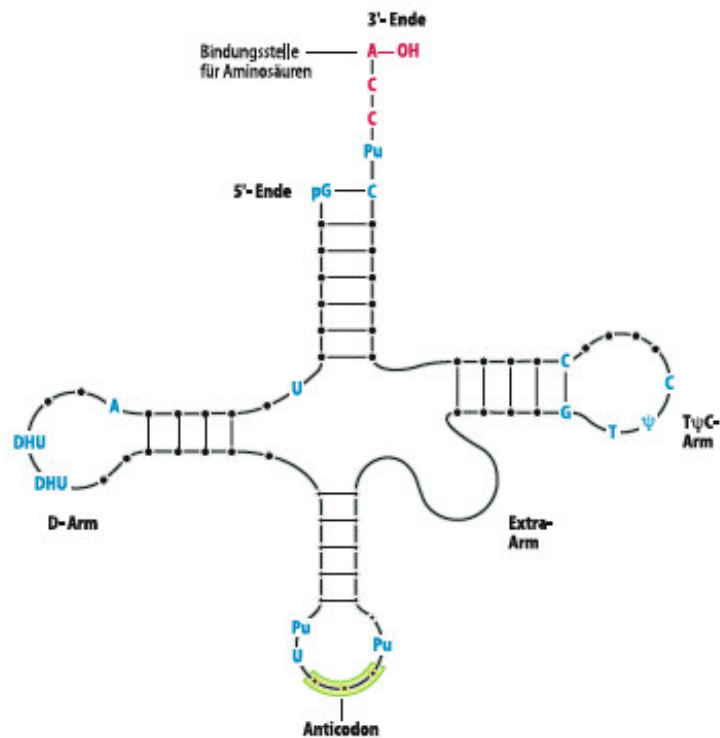


Abbildung 4: Schematische Struktur einer tRNA (Löffler et. Al. , Biochemie und Pathobiochemie, Springer, 8. Auflage, Seite 163, mit Genehmigung des Springerverlages, Lizenznummer 3703681114540) [22] .

Um die Regulation der Proteinsynthese zu gewährleisten, muss die synthetisierte RNA wieder durch die RNasen abgebaut werden [24] .

### 1.3.2. Extrazelluläre RNA

Bei Zelluntergang als Folge von Verletzungen oder Nekrosen gelangt RNA in den extrazellulären Raum und kann im vaskulären System nachgewiesen werden. Der erste Nachweis erfolgte bereits in den 1940er Jahren des letzten Jahrhunderts durch eine Gruppe aus Frankreich [25] und wurde danach mehrfach bestätigt, z.B. durch Kamm et al. [26].

Später erfolgte der Nachweis eines spezifischen RNA-Proteolipid-Komplexes im Serum von Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen, wie zum Beispiel akute und chronische Leukämie, malignen Lymphomen, Bronchialkarzinom und Harnblasenkarzinom. Bei nicht-malignen Erkrankungen wie viralen Infektionen, chronischer Bronchitis, Sklerodermie und anderen erfolgte kein Nachweis. Bei den malignen Erkrankungen zeigte sich eine große Spannweite des Serumlevels des Komplexes, abhängig von Zellzerfall und Proliferation. *In vitro* Studien zeigten eine Sekretion des Komplexes aus malignen Zelllinien, eine Degradation des Komplexes durch RNase C konnte dabei nicht nachgewiesen werden [27]. Später konnte bei Patienten mit malignem Melanom im Serum ein erhöhtes Level an Tyrosinase mRNA nachgewiesen werden [28]. Bei Patienten mit Mammakarzinom und Bronchialkarzinom erfolgte der Nachweis von 5T4 mRNA. 5T4 ist ein transmembranes Glykoprotein, das im Embryonalgewebe exprimiert und bei verschiedenen epithelialen Tumoren überexprimiert wird. Ein potentieller Nutzen dieses Nachweises liegt in der Funktion als diagnostischer Tumormarker [29]. Teilweise verbleibt unklar, wie diese freien Nukleinsäuren gegenüber der Degradation durch Ribonukleasen geschützt sind. So postulieren einige Autoren einen Schutz über eine Komplexbildung mit Proteinen oder Lipiden [27]. Alternativ ist eine Verpackung in „apoptotic bodies“ denkbar. So konnte gezeigt werden, dass nach Apoptoseinduktion einer humanen leukämischen Zelllinie RNA getrennt von DNA verpackt und sezerniert wird [30] und dass Tyrosinase-mRNA aus Melanomzellen assoziiert mit „apoptotic bodies“ vor einer schnellen Degradation durch RNasen geschützt ist [31]. Weitere Studien beschäftigten sich mit der bis dahin unklaren biologischen Wirksamkeit freier Ribonukleinsäuren. Nakazawa et. al. konnten zeigen, dass RNA einen hoch-potenten Ko-Faktor der „Faktor VII-activating-Protease“ darstellt. Diese Protease ist zum einen an der Aktivierung des Faktor VII im Rahmen der Blutgerinnung beteiligt und zum anderen an der Entstehung der Urokinase und damit an der Lyse von Blutgerinnseln. *In vitro* führt extrazelluläre RNA zu einer Autoaktivierung dieser Protease und ist so an einer Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade beteiligt [32]. Weiter führt extrazelluläre RNA auch zu einer Aktivierung der intrinsischen Blutgerinnung. Bei Verletzungen des vaskulären Systems kommt es lokal zu einer Zerstörung von Zellen und der Zellinhalt gelangt in den extrazellulären Raum. Im Rahmen dieses Vorganges konnte *in vitro* gezeigt werden, dass freie RNA zu einer Aktivierung von Faktor XII und XI der Kontaktphase der intrinsischen Blutgerinnung führt. *In vivo* stellt RNA eine „natürliche Fremdoberfläche“ dar. Diese dient als Ko-Faktor der durch Faktor XI/XII induzierten Gerinnung im Rahmen der Aktivierung durch die Kontaktphase [33]. Neben der prothrombotischen Eigenschaft erhöht freie RNA die Permeabilität vaskulärer Endothelien. Fischer et al. konnten zeigen, dass sich die Permeabilität eines Monolayers von mikrovaskulären Endothelzellen, isoliert aus Hirngewebe

von Schweinen, nach Vorinkubation mit RNA konzentrationsabhängig erhöht. Dieser Effekt konnte durch totale RNA, artifizielle poly:IC RNA und „single-strand RNA“ (ssRNA) hervorgerufen werden, durch eine Bindung der RNA an VEGF. Eine Blockierung des VEGF-R-2 minimierte diesen Effekt [34]. Über die Aktivierung von VEGF-R-2 konnte *in vitro* an „human endothelial umbilical vein endothelial cells“ (HUVECs) eine vermehrte Exozytose von Weibel-Palade-Körperchen gezeigt werden. Weibel-Palade-Körperchen enthalten unter anderem vasoaktive Substanzen wie den prothrombotischen von-Willebrand-Faktor sowie P-Selektin, entscheidend für die Rekrutierung von Leukozyten aus der Blutbahn [35].

### 1.3.3. Vascular endothelial cell growth factor A (VEGF-A) und VEGF-Rezeptoren

VEGFs bezeichnen eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, die im Rahmen der Embryogenese die Entwicklung der Blutgefäße kontrollieren. Im adulten Organismus sind VEGFs unter anderem an der Regulation der Permeabilität von vaskulären Endothelien, bei inflammatorischen Vorgängen und bei der Neubildung von Gefäßen beteiligt. Sie werden unterschieden in VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und „placental growth factor“ (PLGF) (zur Übersicht siehe [36]). Für die vorliegende Arbeit ist die inflammatorische Komponente von VEGF-A von Bedeutung. Yano et al. konnten bei intensivpflichtigen Patienten mit schwerer Sepsis erhöhte Serum-Level an VEGF-A nachweisen. Die gleichen Autoren konnten in einem murinen Sepsis-Modell in verschiedenen Gewebearten eine erhöhte Expression an VEGF-A nach Stimulation mit Lipopolysacchariden aus *E. coli* nachweisen [37]. Es existieren drei verschiedene Rezeptoren für VEGF. VEGF-R-1 wird auf den meisten Endothelzellen der Blutbahn exprimiert und unter Sauerstoffarmut hochreguliert. VEGF-R-2 wird ebenfalls auf Endothelzellen der Blutbahn exprimiert und während der embryonalen Vaskulogenese und Angiogenese hochreguliert. VEGF-R-2 ist der Hauptakteur für die angiogene Wirkung und für die Erhöhung der Permeabilität vaskulärer Endothelien durch VEGF-A. VEGF-R-3 wird auf Lymphgefäßendothelien exprimiert und ist für die Neuentstehung von Lymphgefäßen und der Funktion ihrer Endothelien bedeutend, Liganden sind hier nur VEGF-C und VEGF-D, nicht VEGF-A (zur Übersicht siehe [38] und [39]).

### 1.3.4. RNasen

Als RNasen werden Enzyme bezeichnet, die in der Lage sind, Ribonukleinsäuren zu spalten. Intrazellulär katalysieren RNasen die Degradation von RNA im Rahmen der Genexpression und Genregulation [40]. Weiter werden RNasen auch extrazellulär nachgewiesen mit Eigenschaften, die nicht nur auf eine Ribonuklease-Aktivität beruhen. Eine erhöhte Serumaktivität von RNase kann bei malignen Erkrankungen wie zum Beispiel dem Pankreas-Karzinom [41] und dem malignen Melanom [42] nachgewiesen werden. Bei malignen Erkrankungen haben RNasen auf Grund ihrer zytotoxischen Wirkung ein hohes Potential als Therapeutikum. So wird Ranpirnase, eine Ribonuklease aus dem Frosch *Rana pipiens* bereits in klinischen Studien zur Therapie des inoperablen Mesothelioms eingesetzt. Ranpirnase wird in die Zelle aufgenommen und degradiert tRNA im Zytosol [43]. Auch unterstützen RNasen die Abwehr von Mikroorganismen. So wird RNase 7 im *Stratum corneum* der Haut nachgewiesen und besitzt eine toxische Wirkung gegenüber *Enterococcus faecium*. Dieser Effekt wird hier nicht durch eine Ribonuklease-Aktivität hervorgerufen; Studien zeigen hier eine toxische Wirkung durch Bindung an die negativ geladene Oberfläche von Bakterien [44]. RNase 5, Angiogenin, ist an der Angiogenese beteiligt. Produziert wird das Enzym vor allem in der Leber, von wo es in den Blutkreislauf ausgeschüttet wird. Angiogenin beeinflusst die Transkription von rRNA in Endothelzellen durch Bindung an entsprechende Promoter-Regionen [45].

### 1.3.5. RNase A und RNase 1

RNase A wurde erstmals 1939 aus bovinen Pankreasgewebe isoliert [46]. Diese besitzt zu 70% die gleiche Gen-Sequenz wie die humane RNase 1 [47]. Beim Menschen wird RNase 1, auch als humane pankreatische Ribonuklease bezeichnet, neben dem Pankreas [48] auch in vaskulären Endothelzellen exprimiert. Fischer et al. konnten *in vitro* zeigen, dass RNase 1 einen weiteren Bestandteil von Weibel-Palade-Körperchen darstellt, in dem unter anderem auch der von-Willebrand-Faktor gespeichert wird. Eine Stimulation mit Thrombin, VEGF und extrazellulärer RNA führte bei HUVECs zu einer simultanen Ausschüttung von RNase 1 und von-Willebrand-Faktor. Eine Stimulation mit DNA hatte hier keinen Einfluss [49]. Bezüglich ihrer spezifischen Fähigkeit, RNA zu spalten besitzt die bovine RNase A nahezu die gleichen Eigenschaften wie die humane RNase 1 [50].

## 2. Fragestellung und Zielsetzung

RNA ist nicht nur ein Bestandteil der Genexpression und Strukturelement in der Zelle. RNA stellt vielmehr im extrazellulären Raum einen wichtigen Ko-Faktor der Homöostase der Blutgerinnung dar und hat Einfluss auf die Funktion vaskulärer Endothelien. RNase ist der natürliche Gegenspieler von RNA, sowohl im extrazellulären Raum als auch intrazellulär im Rahmen der Genexpression. Auch wenn es viele Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen inflammatorischen Prozessen und extrazellulärer RNA gibt, konnte bislang kein mechanistischer Zusammenhang gezeigt werden. Unklar ist hier auch die Rolle von RNasen bei solchen Prozessen. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war, die Funktion extrazellulärer RNA bei inflammatorischen Prozessen zu charakterisieren und auch die Rolle der RNase in diesem Zusammenhang genauer zu untersuchen. Hierzu sollten *in vivo* Untersuchungen am Entzündungsmodell des *M. cremaster* an der Maus durchgeführt werden. Folgende Versuchsansätze sollten dabei durchgeführt werden:

1. Analyse der Leukozytenrekrutierung nach Vorstimulation mit totaler RNA, TNF- $\alpha$  und NaCl
2. Analyse des Einflusses von RNase A auf die Adhäsion von Leukozyten nach Vorstimulation mit totaler RNA, TNF- $\alpha$  und NaCl
3. Analyse der Leukozytenrekrutierung nach Vorstimulation mit totaler RNA im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit TNF- $\alpha$ , NaCl, mit RNase degradierter RNA sowie mit NaOH hydrolysiertes RNA.
4. Analyse des Einflusses von Antikörpern gegen TNF- $\alpha$  und VEGF-R-2 auf die Leukozytenrekrutierung nach Vorstimulation mit totaler RNA.
5. Charakterisierung der Leukozytengesamtzahl und der Subpopulationen ohne Vorstimulation sowie nach Vorstimulation mit totaler RNA, TNF- $\alpha$  und NaCl in histologischen Präparaten des *M. cremaster* nach Färbung nach Giemsa.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Chemikalien und Enzyme

Calcium-Chlorid CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform-Isoamylalkohol 49:1	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
DNase	Promega, Mannheim, Deutschland
Essigsäure (0,01 %, 0,03 %, absolut)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (70 %, 95 %, absolut)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Eukitt	O.Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland
Gas 95 % N <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub>	Linde, Höllrigelskreuth, Deutschland
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Guanidine Thiocyanate	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Heparin	Pfizer, Berlin, Deutschland
Kalium-Chlorid KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesium-Chlorid MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoäthanol	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium dihydrogen Phosphat, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Bicarbonat HCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Chlorid NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchloridlösung 0,9 %	Braun, Melsungen, Deutschland
N-Lauroylarcosin-Natriumsalz	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Paraformaldehyd 4 %	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phenol	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI)	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Proteinkinase A	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
RNase A	Fermentas/ Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland

Trishydroxymethylaminomethane (TRIS)	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Tuercks Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.2. Puffer und Lösungen

Guanidinium Puffer	100 ml Aqua dest. 47,25 g 4M Guanidinium Thiocyanat 2,5 ml 25 mM Trinatriumcitrat -Dihydrat 0,5 g 0,5 % N-Lauroylarcosin-Natriumsalz 720 µl 1M 2-Mercaptoäthanol
2 M Natrium Acetat, pH 4,0	2M Na-acetate 16,4 g 100 ml Aqua dest.
PK-Puffer	60,55 mg TRIS in 50 µl H <sub>2</sub> O, titriert auf pH 8,0 292,2 mg NaCl 14,61 mg EDTA 10 % SDS Lösung, 100 ml 12,3 g NaAC
PK-Lösung	500 µl PK-Puffer 50 µl 10 % SDS Lösung 15 µl Proteinnase K
10 % SDS Lösung	10 g SDS 100 ml H <sub>2</sub> O
Lösung für Superfusion 1	292,9 g NaCl 13,3 g KCl 11,2 g CaCl <sub>2</sub> 3,8 l Aqua dest.
Lösung für Superfusion 2	57,5 g NaHCO <sub>3</sub> 3,8 l Aqua dest.

Superfusionslösung	200 ml Lösung 1 200 ml Lösung 2 1600 ml Aqua dest.
Lösung 1 für Phosphatpuffer	5,999 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 500 ml Aqua dest.
Lösung 2 für Phosphatpuffer	17,799 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 1000 ml Aqua dest.
Phosphatpuffer 0,1 M	70 ml Lösung 1 für Phosphatpuffer ca. 30 ml Lösung 2 für Phosphatpuffer, bis pH 7,4
Giemsa`s azur Methylenblaulösung für Mikroskopie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Immersionöl	Zeiss, München, Deutschland

### 3.1.3. Medikamente

Fentanyl	Johnsson und Johnson, Neuss, Deutschland
Medetomidin	Pfizer GmbH, Berlin Deutschland
Midazolam	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
SU-5416	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland

### 3.1.4. Geräte und Instrumente

Axioskop 40 Mikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland
CCD Kamera System Modell CF8/1	Kappa, Gleichen, Deutschland
Eppendorf Bio-Photometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5424	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Thermomixer Compact	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Heizmatte	Tyco Thermal Controls, Heidelberg, Deutschland
Hematocytometer	Reichert, Seefeld, Deutschland
Intravitalmikroskop Olympus BX51 Immersionobjektiv lumplan Fi/IR x40/0,8 W	Olympus, Hamburg, Deutschland
Kaltlichtquelle LCD 1500	Schott, Mainz, Deutschland
Operationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland



Operationsmikroskop Olympus SZ61 Objektiv DF Plabo 1x -4	Olympus,Hamburg, Deutschland
Rollerpumpe	Stöckert, München, Deutschland
S-VHS Video-Rekorder	Panasonic, Osaka, Japan
Tauchbad	Julabo, Seelbach, Deutschland

### 3.1.5. Verbrauchsmaterialien

C57/Bl6 Mäuse, männlich, Alter 6-10 Wochen	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
Cutasept Hautdesinfizienz	Bode, Hamburg, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Einmalhandschuhe Peha Soft	Hartman, Heidenheim, Deutschland
Einmalspritzen Omnican100, 0,3mm x 0,8mm	Braun, Melsungen, Deutschland
Falcon Tube Polystyrene	BD, Heidelberg, Deutschland
Gefäße 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Kanülen 0,3 mm x 13 mm	BD, Heidelberg, Deutschland
Kompressen 7,5 cm x 7,5 cm	NOBA, Wetter, Deutschland
MaXtract High Density 2 ml	Quiagen, Düsseldorf, Deutschland
Objektträger Superfrost	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Polyethylen-Schlauch, ID 28mm, AD O,61 mm	Portex, smith medical, Grassbrunn, Deutschland

### 3.1.6. Software

Cross-Korrelationsprogramm	Circusoft Instrumentation, Hockessin, USA
Sigma Plot, Version 13.0	Systat Software, Chicago, USA
Spot Basic Bildverarbeitung	Diagnostik Instruments.Inc, Burroughs, USA
V-morph	Videowin, Los Angeles, USA

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Isolierung von RNA aus Oberschenkelmuskulatur der Maus

Aus dem Oberschenkel von männlichen C57/Bl6 Mäusen wurde nach Euthanasie Muskulatur entnommen und bei -80 °C gelagert. Die Isolierung der RNA erfolgte nach dem Protokoll von Chomczynski et al. mit Modifikationen. Das Grundprinzip dieses Protokolls besteht in einer Denaturierung von Proteinen aus Gewebeprobe mit anschließender Extraktion von Nukleinsäuren mittels Guanidinium Puffer, Phenol und Chloroform. Abschließend erfolgt die Fällung und Extraktion der RNA durch Zentrifugation. Die Methode führt zu einer hohen Ausbeute an RNA bei gleichzeitig hoher Reinheit und geringer Degradierung [51]. Im Einzelnen wurden 30 mg Muskelgewebe mit 600 µl Guanidinium Puffer homogenisiert. Nach Zugabe von 60 µl 2 M Na-Acetat (pH 4,0), 600 µl mit Tris-EDTA gesättigtem Phenol und 120 µl Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) wurde das Gewebe für eine Minute kräftig geschüttelt. Das gesamte Volumen wurde dann in 2 ml MaXtract High Density pipettiert. Nach Kühlung auf Eis für 15 Minuten wurde die Mischung für zwei Minuten bei 1200 g und 4 °C zentrifugiert und der gewonnene Überstand in ein 1,5 ml Gefäß pipettiert und mit 6 µl Reaktionspuffer und 6 µl DNase die noch vorhandene DNA bei 37 °C für 30 Minuten verdaut. Im Anschluss wurden alle Proben mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf das gleiche Volumen aufgefüllt und ein halbes Volumen Phenol und Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) zur Inaktivierung der DNase hinzugegeben. Diese Mischung wurde für 15 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 12000 g und 4 °C, das Pipettieren des Überstandes in ein 1,5 ml Gefäß und Mischen mit 600 µl Isopropanol zur Fällung. Dann folgte eine mindestens einstündige Kühlung der Proben bei -20 °C. Nach Kühlung wurden die Proben bei 10.000 g für 30 Minuten zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und für weitere 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 90 µl Guanidinium Puffer aufgenommen, mit 90 µl Isopropanol vermischt, für mindestens eine Stunde bei -20 °C gekühlt und dann für 20 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde im Anschluss zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und jeweils für fünf Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Nach Lufttrocknung des Sediments wurde dieses in destilliertem H<sub>2</sub>O aufgenommen und durch zehn Minuten Schütteln bei 64 °C gelöst. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C bis zum weiteren Verbrauch. Vor Verwendung der Proben wurden diese mittels Elektrophorese auf eine Degradierung im Rahmen der Isolierung oder Lagerung hin untersucht. Hierzu wurde das entsprechende Volumen von 1 µg auf ein 1,2 % Agarosegel aufgetragen und eine Spannung von 100 Volt bei 70 Milliampere angelegt. Die Proben

wurden unter UV Licht begutachtet. Hier zeigte sich das entsprechende Muster der 18S rRNA und 28S rRNA Bande. Die Reinheit und Konzentration der gewonnenen RNA wurde photometrisch bestimmt. Hierfür wurde die Probe im Verhältnis 1:50  $\mu\text{l}$  mit destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine und Phenol) bestimmt. Anschließend wurde das Verhältnis 260/280 ermittelt, die Werte lagen hier im Durchschnitt bei 1,63. Für reine RNA werden hier Werte zwischen 1,9 und 2,1 erwartet [52], eine geringe Kontamination durch Proteine wurde für die eigenen Versuchsansätze akzeptiert. Für eine Versuchsgruppe wurde die vorher isolierte RNA mit NaOH für zehn Minuten bei 65 °C inkubiert, um eine Hydrolyse der RNA zu bewirken. Das Ergebnis wurde mittels Elektrophorese verifiziert, hier waren keine Banden mehr darstellbar und die RNA wurde als degradiert klassifiziert. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der Elektrophorese, links ohne Degradation, rechts nach Degradation durch Hydrolyse.

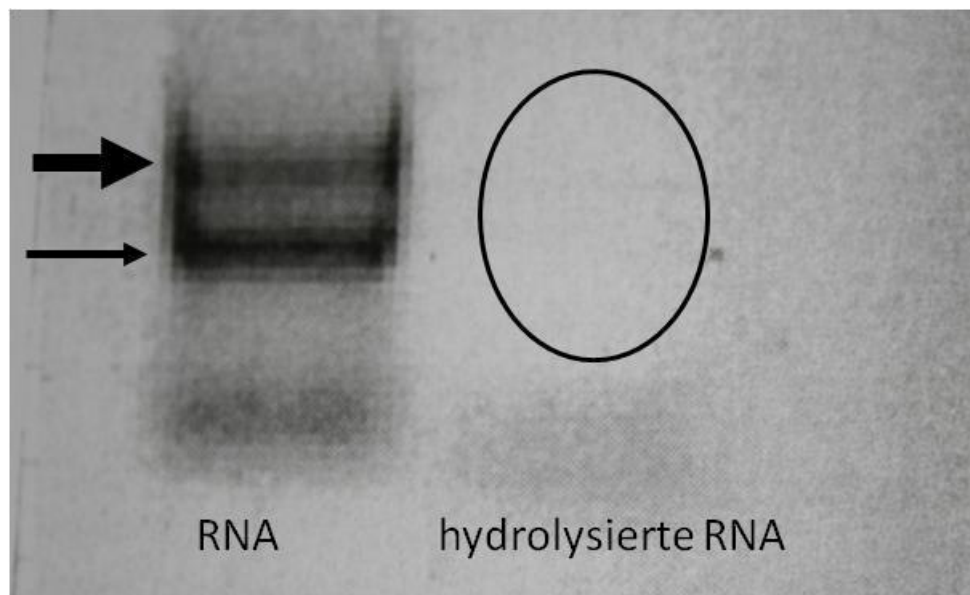


Abbildung 5: Auszüge aus der Elektrophorese der RNA Proben nach Isolation aus der Skelettmuskulatur des Oberschenkels der Versuchstiere. Linksseitig zeigt sich eine scharfe Abgrenzung der Banden der 18 S rRNA (dicker Pfeil) und 28 S rRNA (dünner Pfeil), eine Degradierung der RNA ist auszuschließen. Rechtsseitig ist die Elektrophorese nach Hydrolyse mit NaOH dargestellt (Ellipse). Hier sind als Zeichen der Degradierung keine Einzelbanden mehr erkennbar.

### 3.2.2. Isolierung von DNA aus Oberschenkelmuskulatur der Maus

Aus der Oberschenkelmuskulatur von männlichen C57/Bl6 Mäusen wurde nach Euthanasie Gewebeproben entnommen und diese bei -80 °C gelagert. Zur Isolierung von DNA aus der Muskulatur wurden die entsprechenden Proben aufgetaut, in 0,5 ml PK-Puffer inkubiert und bei 55 °C für 12 Stunden erwärmt. Durch die Proteinkinase K im Puffer wurden die enthaltenen Proteine abgebaut. Die Proben wurden dann bei 4.000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann 1:1 mit PCI Mischung aufgefüllt und mit 800 U/min für 15 Minuten zentrifugiert. Das Volumen wurde dann in ein MaXtract High Density Tube pipettiert und anschließend für zwei Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,1 Volumen 3 M NaAC und 2 Volumen Ethanol 100 % aufgefüllt und die Probe für eine Stunde bei -80 °C gekühlt. Dann wurde die Probe bei 12.000 U/min für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 200 – 500 µl Ethanol gewaschen. Die Probe wurde dann erneut bei 12.000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 50 - 80 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und für fünf Minuten bei 55 °C getrocknet. Die erhaltenen DNA Konzentration und Reinheit wurde mittels Photometer bestimmt, analog zur Bestimmung der RNA-Konzentration. Das Verhältnis OD 260/280 lag hier bei 1,72, so dass hier von reiner DNA auszugehen ist [53]. Anschließend erfolgte die Lagerung der Proben bei -20 °C.

### 3.2.3. Intravitalmikroskopie am Entzündungsmodell des *M. cremaster*

#### 3.2.3.1. Versuchstiere

Für sämtliche Versuche wurden männliche C57/BL6 Mäuse im Alter von sechs bis zehn Wochen verwendet, die unter freiem Zugang zu Futter und in einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus gehalten wurden. Die Haltung der Tiere sowie die Durchführung der Versuche erfolgten nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern und unter Einhaltung der aktuell geltenden Vorschriften und Bedingungen. Die Versuche wurden in den Räumlichkeiten des Walter-Brendel-Zentrums der Ludwig-Maximilians-Universität München im Zeitraum von 2007 bis 2011 durchgeführt.

### 3.2.3.2. Narkose

30 Minuten vor dem chirurgischen Eingriff wurden die Tiere mit einer Kombination aus Midazolam (0,15 mg/Kilogramm Körpergewicht), Medetomidin (15 µg/Kilogramm Körpergewicht) und Fentanyl (1,5 µg/Kilogramm Körpergewicht) anästhesiert. Alle chirurgischen Eingriffe wurden mit Hilfe eines Operationsmikroskops und einer Kaltlichtquelle durchgeführt.

### 3.2.3.3. Vorbereitung der Superfusionslösung

Für die intravitalmikroskopischen Versuchsreihe war die Herstellung einer Superfusionslösung erforderlich. Lösung 1 bestand aus 292,9 g NaCl, 13,3 g KCl, CaCl<sub>2</sub> 11,2 g, MgCl<sub>2</sub> 7,7 g), in 3,8 l deionisiertem Wasser gelöst. Lösung 2 bestand aus 57,5 g NaHCO<sub>3</sub>, auch in 3,8 l deionisiertem Wasser gelöst. Die endgültige Superfusionslösung bestand aus 200 ml Lösung 1, 200 ml Lösung 2 und 1.600 ml deionisiertem Wasser. Diese Lösung wurde mit einem Gemisch aus 95 % N<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> kontinuierlich begast. Die Erwärmung auf 35 °C erfolgte über ein Schlauchsystem, das durch ein Wärmebecken geleitet wurde.

### 3.2.3.4. Kanülierung der *A. carotis communis*

Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch einen Schmerzreiz wurden die Versuchstiere in Rückenlage auf einer Heizmatte zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur gelagert und die Pfoten fixiert. Anschließend wurde mit einer spitzen Schere der Hals der Maus medial eröffnet und der nun zum Vorschein kommende Drüsenkörper stumpf nach lateral abpräpariert. Dann erfolgte die Präparation des Gefäß-Nerven-Stranges rechts lateral der Trachea mit Darstellung der *A. carotis communis* nach kranial bis zur Bifurkation in die *A. carotis interna* und *A. carotis externa*. Nach dem Abklemmen mittels Gefäßklemme nach proximal wurde eine Ligatur vorgelegt, dann erfolgte die Eröffnung des Gefäßes mittels Schere und das Einführen des heparinisierten Polyethylen-Katheters. Der Katheter wurde mit der vorgelegten Ligatur fixiert und anschließend der Blutstrom wieder freigegeben. Über den

Katheter erfolgte die Gewinnung von Blutproben zur Analyse der systemischen Leukozytenzahl sowie die systemische Applikation von Substanzen während des Versuchs.

### 3.2.3.5. Präparation des *M. cremaster* und Intravitalmikroskopie

Die Präparation des Muskels erfolgte nach Baez mit Modifikationen [54]. Nach Kanülierung der *A. carotis communis* wurde das Versuchstier in Rückenlage auf einer entsprechenden Beobachtungsvorrichtung gelagert. Nach Hautinzision des Skrotums wurde der Muskel hervorluxiert und mittels Kanülen fixiert. Anschließend folgte eine ventrale Längsinzision und der Muskel wurde flächig mit weiteren Pins aufgespannt und die *Testes* am Rand fixiert. Abbildung 6 zeigt den *M. cremaster* nach vollendeter Präparation. Die Beobachtungsvorrichtung mit Versuchstier wurde dann unter das Intravitalmikroskop umgelagert und der Muskel mit der Superfusionslösung konstant überspült. Die Beobachtung der Mikrozirkulation des Muskels erfolgte mit einem Immersionsobjektiv, Augenmerk lag hier auf der Beobachtung der an dem Endothel postkapillärer Venolen rollenden und adhärenenten Leukozyten. Während den Experimenten wurden den Versuchstieren über den Carotis-Katheter 10 µl Blut entnommen, mit 90 µl Tuercks Lösung gefärbt und die systemische Leukozytenzahl als Anzahl der Leukozyten pro Mikroliter Blut mit einem Hematocytometer bestimmt. Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten wurde für jedes beobachtete Gefäß mit einer dualen Photodiode und einem digitalen Cross-Korrelationsprogramm bestimmt.



Abbildung 6 : Präparierter *M. cremaster*. Nach Eröffnung des Skrotums durch einen Längsschnitt wurde der Muskel freipräpariert und hervorluxiert. Dann wurde der Muskel längs gespalten und in die Beobachtungsvorrichtung aufgespannt. Die *Testes* wurden an der Seite fixiert.

Alle Experimente wurden mit einem CCD Kamera System und einem VHS Videorekorder aufgezeichnet. Die Analyse erfolgte im Anschluss an die Experimente anhand der Videoaufnahmen. Hier wurden die „Rolling-Flux-Fraction“ (RFF) sowie die Adhäsion bestimmt. Die RFF ist der prozentuale Anteil der an der Gefäßwand rollenden Leukozyten im Verhältnis zu den nicht gebundenen, frei schwimmenden Leukozyten im Gefäß pro Minute. Der gesamte Leukozytenfluss wurde durch das Produkt der gemessenen Leukozytenkonzentration im Blut und dem Blut-Volumen-Fluss bestimmt, z.B. [55]. Als adhärenz wurden Zellen definiert, die sich im beobachteten Abschnitt über einen Zeitraum von mindestens 30 Sekunden nicht bewegten [56]. Weiter wurde die Schubspannung an den Gefäßwänden ermittelt, Formel hierfür:

$$\gamma(w) = 4,9 \cdot (8 \cdot (V/1,6)) / D$$

V ist die Blutflussgeschwindigkeit in der Mitte des Gefäßes und D der Durchmesser [57, 58].  
Abbildung 7 zeigt einen entsprechenden Bildausschnitt der angefertigten Videosequenzen.

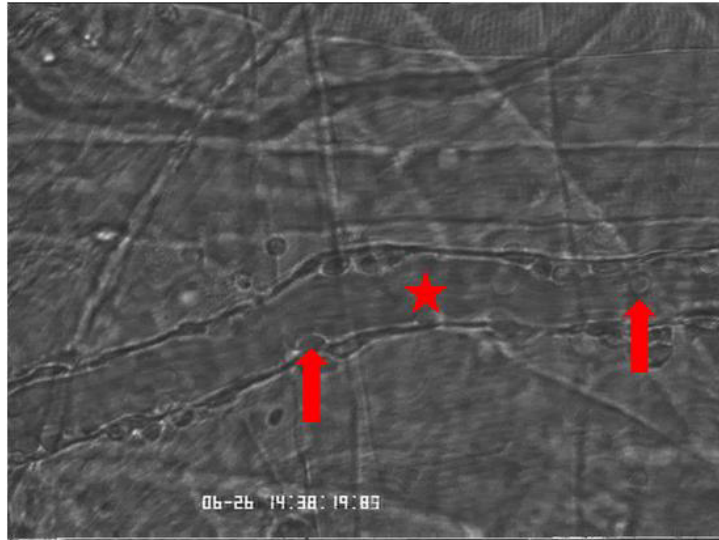


Abbildung 7: Bildausschnitt einer Videosequenz der intravitalmikroskopischen Untersuchung am *M. cremaster* der Maus. Zentral liegt der ausgewählte Gefäßabschnitt einer postkapillären Venole (Stern), eingebettet in die quergestreifte Muskulatur. Intravasal zeigen sich Leukozyten (Pfeile), die auf Grund der Dynamik im Versuch in adhärenente und rollende Zellen unterschieden wurden.

### 3.3. Histologische Untersuchungen am *M. cremaster*

Zur Quantifizierung und Differenzierung von intravaskulären und perivaskulären Leukozyten wurden histologische Untersuchungen am *M. cremaster* mittels Färbung nach Giemsa durchgeführt. Nach der Präparation wie in den intravitalmikroskopischen Versuchsreihen wurde der Muskel mit 4 % PFA-Lösung für zwei Minuten beträufelt, mit der Schere abgetrennt und auf einem Superfrost-Objektträger für fünf Minuten luftfixiert und bis zur Färbung in 4 % PFA-Lösung bei 4 °C gelagert. Zur Färbung wurde das Gewebe drei mal fünf Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer mit 5 % Ethanol gewaschen. Zur Färbung wurden die Präparate dann für drei bis fünf Minuten mit Giemsa-Azur-Eosin-Methylenblaulösung bedeckt und unter fließendem Wasser wieder abgespült. Zur weiteren Differenzierung wurden die Präparate 5-20 Minuten in 0,01 % Essigsäure eingelegt und für jeweils zehn Minuten mit 70 %, 96 % und absoluten Ethanol entwässert. Der Alkohol wurde durch zweimaliges Waschen für fünf Minuten in Xylol entfernt und die Präparate anschließend mit Eukitt eingedeckt. Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte mittels Durchlichtmikroskop. Dabei wurde die Gesamtzahl der gefärbten Leukozyten sowohl intravaskulär in postkapillären Venolen als auch in deren perivaskulären Umfeld pro Gesichtsfeld bestimmt. Die Anzahl der Zellen wurden pro Quadratmillimeter (Zellen/mm<sup>2</sup>)



angegeben. Weiter wurden die gefärbten Zellen unter morphologischen Gesichtspunkten in mononukleäre Zellen (MZ), eosinophile Granulozyten (Eos) sowie in polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) unterschieden. Abbildung 8 zeigt einen exemplarischen Bildausschnitt nach Färbung des Gewebes nach Giemsa mit den entsprechenden morphologischen Charakteristika zur Differenzierung der verschiedenen Subtypen.

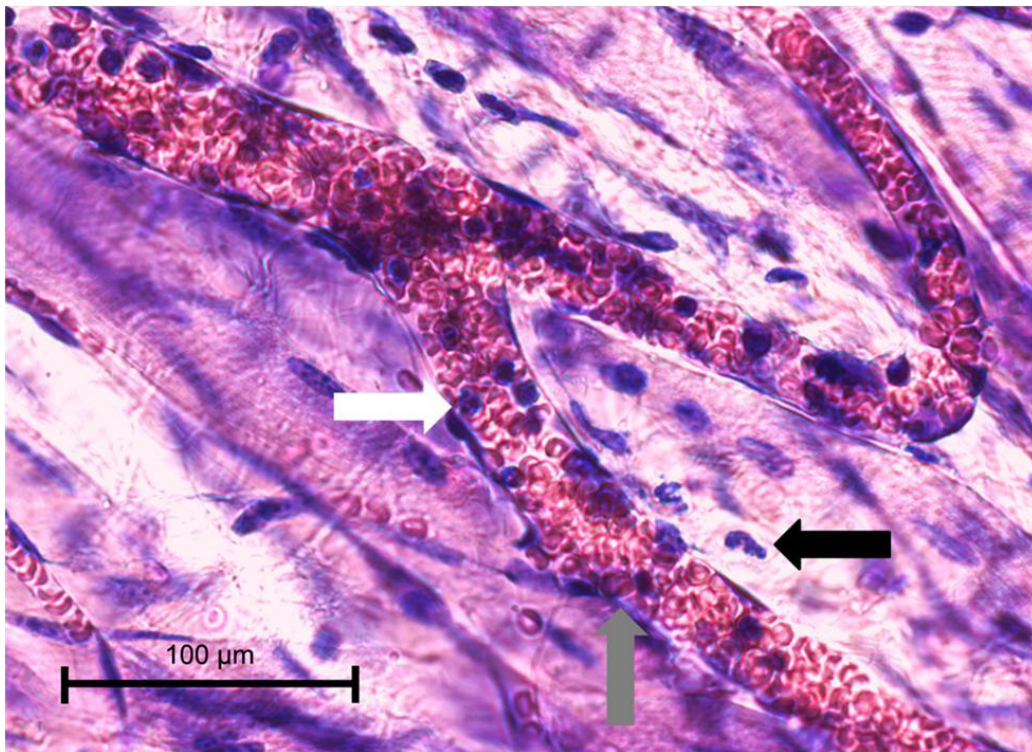


Abbildung 8: Bildausschnitt eines Whole-mount Präparates des *M. cremaster* nach Färbung nach Giemsa. Blau angefärbt zeigen sich intravaskuläre und perivaskuläre (emigrierte) Leukozyten. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten imponieren durch ihre mehrfach gelappte Kernstruktur (weißer Pfeil), eosinophile Granulozyten (grauer Pfeil) durch einen meist zweigelappten Kern mit rötlich angefärbten Zytoplasma und mononukleäre Zellen durch ihre Größe und meist nierenförmigen Zellkern (schwarzer Pfeil) [59]. Der Ausschnitt entstammt einer Versuchsreihe nach vorangegangener Stimulation mit  $\text{TNF-}\alpha$ .

### 3.4. Intravitalmikroskopische Versuchsreihen

#### 3.4.1. Vorstimulation mit NaCl, TNF- $\alpha$ und RNA mit anschließender RNase Gabe

Die erste Gruppe dieser Versuchsreihe wurde durch eine intrascrotale (i.s.) Injektion von 150  $\mu$ l NaCl vorbehandelt und nach einer Wartezeit von zwei Stunden mit der Präparation begonnen. Nach der Videoaufzeichnung wurden den Versuchstiere über den Katheter in der *A. carotis* systemisch RNase A in der Dosierung 42  $\mu$ g/kg Körpergewicht appliziert und nach einer Wartezeit von zehn Minuten dieselben Gefäße erneut aufgezeichnet und analysiert. Die zweite Gruppe wurde mit einer i.s. Injektion von 500 ng TNF- $\alpha$  gelöst in 150  $\mu$ l NaCl zwei Stunden vor Versuchsbeginn vorbehandelt und nach der Aufzeichnung mit RNase behandelt, nach zehn Minuten erfolgte eine erneute Aufzeichnung. Die dritte Gruppe wurde mit einer Dosis von 15  $\mu$ g totaler RNA gelöst in 150  $\mu$ l NaCl i.s. vorbehandelt und nach zwei Stunden mit dem Versuch begonnen. Nach der Aufzeichnung von Gefäßen wurde den Tieren ebenfalls RNase in der obigen Dosierung appliziert und dieselben Gefäße nach zehn Minuten erneut aufgezeichnet. Nach Versuchsende wurde den Tieren über den arteriellen Katheter Blut abgenommen und die systemische Leukozytenzahl bestimmt.

#### 3.4.2. Vorstimulation mit DNA, mit NaOH lysierter RNA, mit RNase degradierter RNA und RNA

In dieser Versuchsreihe wurden die Tiere mit 15  $\mu$ g DNA, mit 15  $\mu$ g durch NaOH hydrolysierte RNA in 150  $\mu$ l NaCl oder 15  $\mu$ g RNA, die vorher mit 46  $\mu$ g RNase für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert wurde, vorstimuliert. Alle Substanzen wurden in 150  $\mu$ l NaCl aufgelöst und zwei Stunden vor Versuchsbeginn i.s. injiziert. Diese drei Gruppen wurden mit den Ergebnissen der nur mit RNA oder nur mit NaCl behandelten Gruppe verglichen.

#### 3.4.3. Vorbehandlung mit TNF- $\alpha$ Antikörper Infliximab vor Vorstimulation mit TNF- $\alpha$ , NaCl und RNA

In dieser Versuchsreihe wurde den Tieren 10 mg/kg Körpergewicht des monoklonalen TNF- $\alpha$  Antikörpers Infliximab gelöst in 100 ml NaCl intraperitoneal (i.p.) appliziert. Nach einer

Stunde wurden die Tiere mit einer i.s. Injektion von 150 µl NaCl, 500 ng TNF-α gelöst in 150 µl NaCl oder 15 µg RNA, gelöst in 150 µl NaCl vorstimuliert und nach zwei Stunden mit der Präparation begonnen.

#### 3.4.4. Vorbehandlung mit VEGF-R-2 Antikörper SU-5416 vor Vorstimulation mit TNF-α und RNA

Der ersten Gruppe wurde 24 Stunden sowie drei Stunden vor Versuchsbeginn 10 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) i.p. appliziert sowie zwei Stunden vor Versuchsbeginn 500 ng TNF-α gelöst in 150 µl NaCl i.s.. DMSO ist das Lösungsmittel für den VEGF-R-2 Antikörper SU-5416. Die zweite Gruppe wurde analog behandelt, nur dass hier zusätzlich 4 mg SU-5416 pro kg Körpergewicht in das DMSO hinzugegeben wurde. Die dritte und vierte Gruppe wurde mit DMSO beziehungsweise DMSO mit SU-5416 behandelt, intrascrotal erfolgte aber anstatt von TNF-α die Applikation von 15 µg RNA gelöst in 150 µl NaCl zwei Stunden vor Versuchsbeginn.

#### 3.5. Histologische Präparate ohne Vorstimulation, nach Vorstimulation mit NaCl, TNF-α und RNA

In der ersten Gruppe wurde der *M. cremaster* direkt präpariert und entnommen. Für diese Gruppe wurde der Begriff „Trauma“ aus der Literatur übernommen (z.B. [60]), da bereits durch die chirurgische Präparation des Muskels ein vermehrtes Rollen mit anschließender Adhäsion von Leukozyten hervorgerufen wird. Die zweite Gruppe wurde durch eine i.s. Injektion von 150 µl NaCl vorbehandelt und nach 2 Stunden Wartezeit der Muskel präpariert und entnommen. Die dritte Gruppe wurde mit 500 ng TNF-α gelöst in 150 µl NaCl vorstimuliert und nach 2 Stunden der Muskel entnommen. Die vierte Gruppe wurde mit 15 µg RNA, gelöst in 150 µl NaCl, i.s. vorstimuliert und nach zwei Stunden der Muskel entnommen.

#### 3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Sigma Plot, Version 13.0. Mehrere Gruppen wurden mittels einer Kruskal-Wallis Anova on Ranks durchgeführt, gefolgt von einem paarweisen Vergleich mittels Dunns Test. Wurden nur zwei Gruppen verglichen, erfolgte die Analyse mittels Mann-Withney-Rank-Sum-Test. Die Ergebnisse wurden

dargestellt als Mittelwert mit entsprechendem Standardfehler. Als signifikant wurde  $p < 0,05$  gewertet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Intravitalmikroskopie

#### 4.1.1. Vorstimulation mit NaCl, TNF- $\alpha$ und RNA mit anschließender RNase A Gabe

Tabelle 3 zeigt die hämodynamischen Parameter der einzelnen Versuchsgruppen zum Einfluss von RNA und RNase auf die Leukozytenrekrutierung *in vivo*. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich im Vergleich der TNF- $\alpha$ -Gruppe mit der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe. Unterschiede in der Blutflussgeschwindigkeit vor und nach RNase-Applikation und in der systemischen Leukozytenzahl konnten nicht beobachtet werden.

Behandlung	Mäuse n	Gefäße	Durchmesser $\mu\text{m}$	Blutflussgeschwindigkeit $\mu\text{m/s}$	Scherrate $\text{s}^{-1}$	Systemische Leukozytenzahl n/mikroliter
NaCl	3	8	31 $\pm$ 2	2263 $\pm$ 256	1818 $\pm$ 179 <sup>x</sup>	3500 $\pm$ 48
TNF- $\alpha$	6	10	29 $\pm$ 2	1300 $\pm$ 200 <sup>x</sup>	1085 $\pm$ 138	3233 $\pm$ 182
RNA	12	19	27 $\pm$ 1	1752 $\pm$ 244	1564 $\pm$ 218	3846 $\pm$ 226
			n.s.	<sup>x</sup> p < 0,05 vs. NaCl	<sup>x</sup> p < 0,05 vs. Tnf- $\alpha$	n.s.

Tabelle 3 : Hämodynamische Parameter zur Untersuchung des Einflusses von NaCl, TNF- $\alpha$  und RNA mit nachfolgender Applikation von RNase A auf die Leukozytenrekrutierung *in vivo*. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. <sup>x</sup> p < 0,05; n.s. nicht signifikant.

Abbildung 9 zeigt die Leukozytenadhäsion im Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen. Die Adhäsion in der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe lag bei 135  $\pm$  23 Zellen/mm<sup>2</sup>. Die Behandlung mit TNF- $\alpha$  führte zu einer Adhäsion von 1070  $\pm$  203 Zellen/mm<sup>2</sup> und mit RNA zu

einer Adhäsion von  $1156 \pm 111$  Zellen/mm<sup>2</sup>. Beide Werte waren signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Applikation von RNase ergab in der Kontrollgruppe mit  $122 \pm 17$  Zellen/mm<sup>2</sup> im Vergleich zum Ausgangsbefund keine signifikanten Unterschiede. In der TNF- $\alpha$ -Gruppe reduzierte die Applikation von RNase die Adhäsion auf einen signifikant niedrigeren Wert von  $599 \pm 192$  Zellen/mm<sup>2</sup>. In der RNA-Gruppe reduzierte die RNase-Behandlung die Adhäsion auf  $669 \pm 72$  Zellen/mm<sup>2</sup> und war signifikant geringer als vor der Behandlung. Im Versuch konnte beobachtet werden, dass die Applikation von RNase zu einem Loslösen von bereits adhären Zellen führte. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe war die Adhäsion in der TNF- $\alpha$ -Gruppe und der RNA-Gruppe auch nach RNase-Gabe noch erhöht.

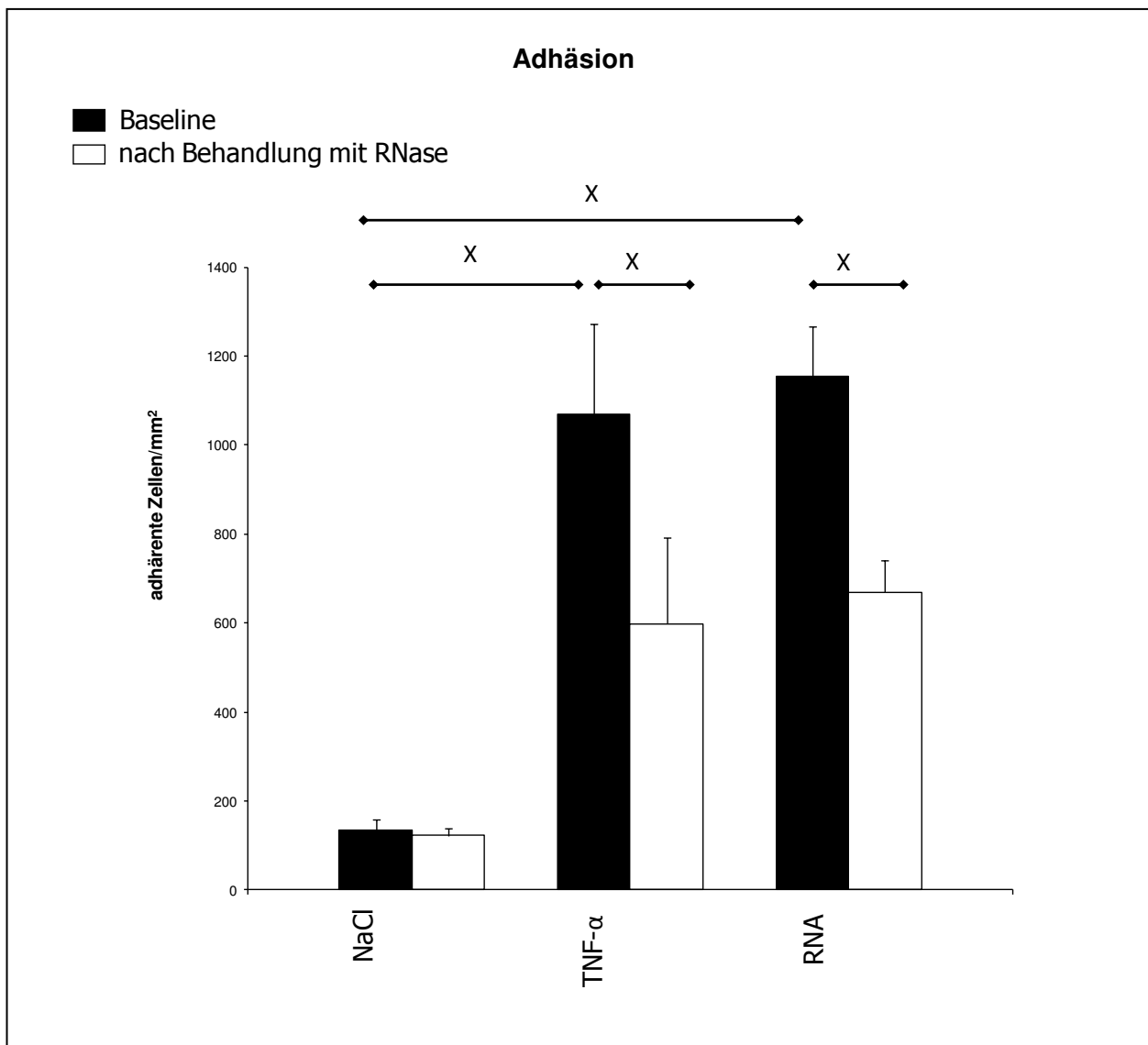


Abbildung 9 : Adhäsion nach Vorstimulation mit NaCl, TNF- $\alpha$  und RNA sowie Adhäsion in denselben Gefäßen nach Gabe von RNase. Im Versuch ließ sich das Loslösen bereits adhärenter Zellen beobachten. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. <sup>X</sup>  $p < 0,05$ .

Abbildung 10 zeigt die RFF der obigen Versuchsgruppen. Die RFF lag in der NaCl-Gruppe vor und nach RNase-Gabe bei  $0,27 \pm 0,11$  und  $0,24 \pm 0,07$ . Bei den mit TNF- $\alpha$  vorstimulierten Tieren lag die RFF zu Beginn des Versuchs bei  $0,09 \pm 0,04$  und war im Vergleich mit der RFF in der NaCl-Gruppe ohne Stimulation vermindert. Nach Gabe von RNase stieg die RFF an auf einen Wert von  $0,15 \pm 0,04$ . Die RFF bei den mit RNA vorstimulierten Tieren lag zu Beginn bei  $0,09 \pm 0,02$  und stieg nach RNase-Gabe auf  $0,14 \pm 0,04$  an.

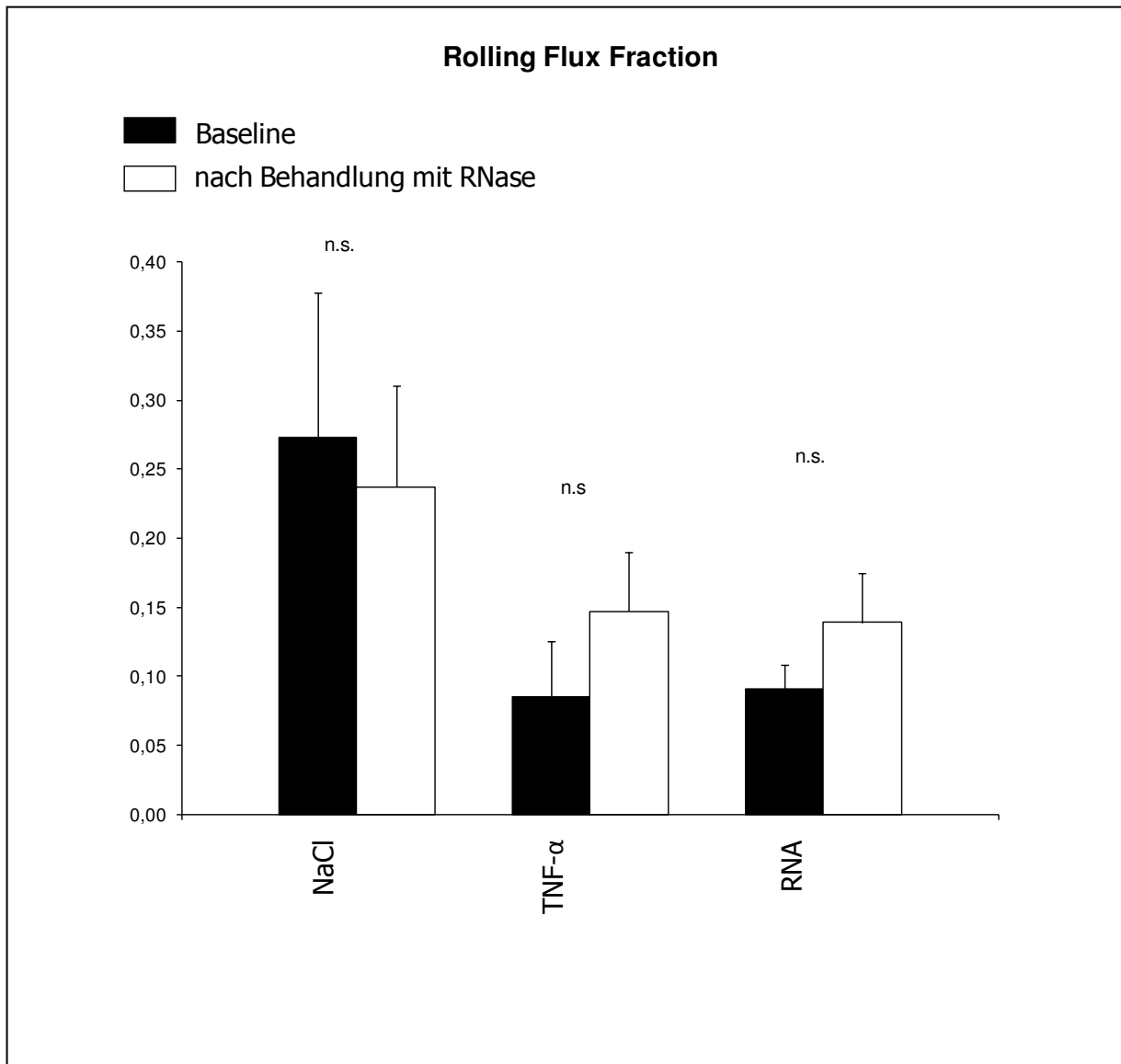


Abbildung 10: RFF nach Vorstimulation mit NaCl, TNF- $\alpha$  und RNA sowie nach Gabe von RNase in denselben Gefäßen. Signifikante Unterschiede fanden sich nicht. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. n.s. nicht signifikant.

#### 4.1.2. Mit NaOH hydrolysierte RNA, mit RNase A degradierte RNA und DNA haben keinen Einfluss auf die Leukozytenadhäsion und die Rolling Flux Fraction

Tabelle 4 zeigt die hämodynamischen Parameter der Untersuchungsreihe zum Einfluss von hydrolysierte RNA, hydrolysierte RNA und von DNA im Vergleich mit undegradierter RNA, NaCl und TNF- $\alpha$  als Kontrollgruppen. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Behandlung	Mäuse n	Gefäße	Durchmesser $\mu\text{m}$	Blutflussgeschwindigkeit $\mu\text{m/s}$	Scherrate $\text{s}^{-1}$	Systemische Leukozytenzahl n/mikroliter
NaCl	4	13	32 $\pm$ 3	2200 $\pm$ 266	1715 $\pm$ 197	3500 $\pm$ 48
RNA	12	20	27 $\pm$ 1	1695 $\pm$ 239	1564 $\pm$ 218	3846 $\pm$ 226
DNA	5	8	34 $\pm$ 2	1938 $\pm$ 231	1461 $\pm$ 204	4035 $\pm$ 490
NaOH-RNA	4	11	33 $\pm$ 2	1636 $\pm$ 134	1265 $\pm$ 113	3150 $\pm$ 401
RNA/RNase	3	9	33 $\pm$ 3	1239 $\pm$ 199	924 $\pm$ 113	4266 $\pm$ 467
TNF- $\alpha$	6	10	29 $\pm$ 2	1300 $\pm$ 200	1086 $\pm$ 138	3233 $\pm$ 182
			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 4: Übersicht der hämodynamischen Parameter der verschiedenen Gruppen zur Untersuchung des Einflusses von vorbehandelter RNA und DNA auf die Leukozytenrekrutierung *in vivo*. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. n.s. nicht signifikant.

Abbildung 11 zeigt die Adhäsion der verschiedenen Versuchsgruppen. Die Adhäsion in der mit RNA behandelten Gruppe lag mit 1133,25 Zellen/ $\text{mm}^2$  signifikant über den Werten der Kontrollgruppe, in den anderen Gruppen schwankten die Werte zwischen 122,07 Zellen/ $\text{mm}^2$  und 441,79 Zellen/ $\text{mm}^2$ .



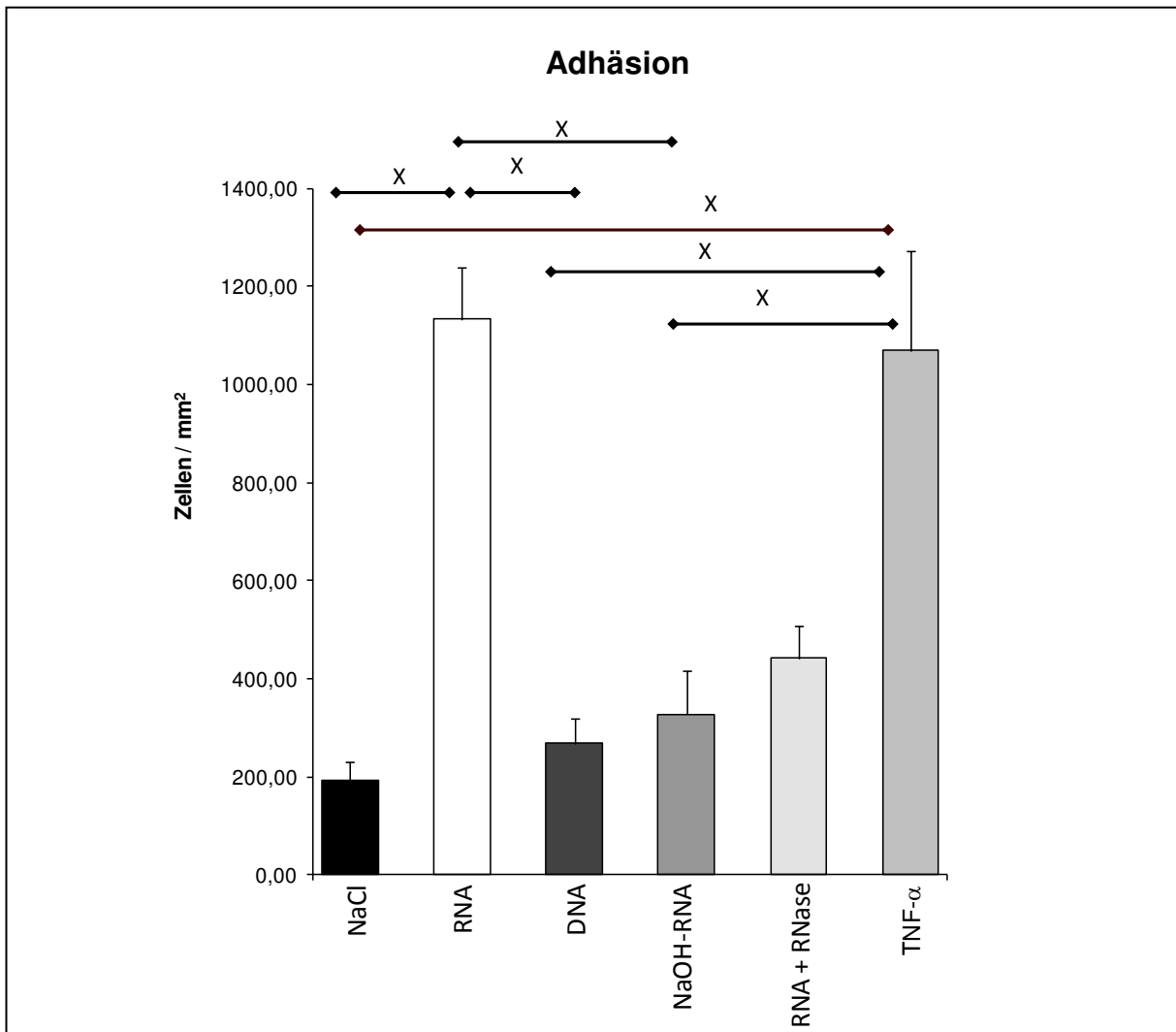


Abbildung 11: Adhäsion von Leukozyten nach Vorstimulation mit NaCl, RNA, DNA, mit NaOH degradierter RNA, mit RNase verdauter RNA und TNF- $\alpha$ . Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. <sup>x</sup>  $p < 0,05$ .

Die RFF der verschiedenen Versuchsgruppen lagen zwischen 0,26 in der NaCl Gruppe als höchstem Wert und 0,09 als niedrigstem Wert. Signifikanzen zeigten sich hier im Vergleich der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe nur mit der mit TNF- $\alpha$  behandelten Gruppe, siehe Abbildung 12.

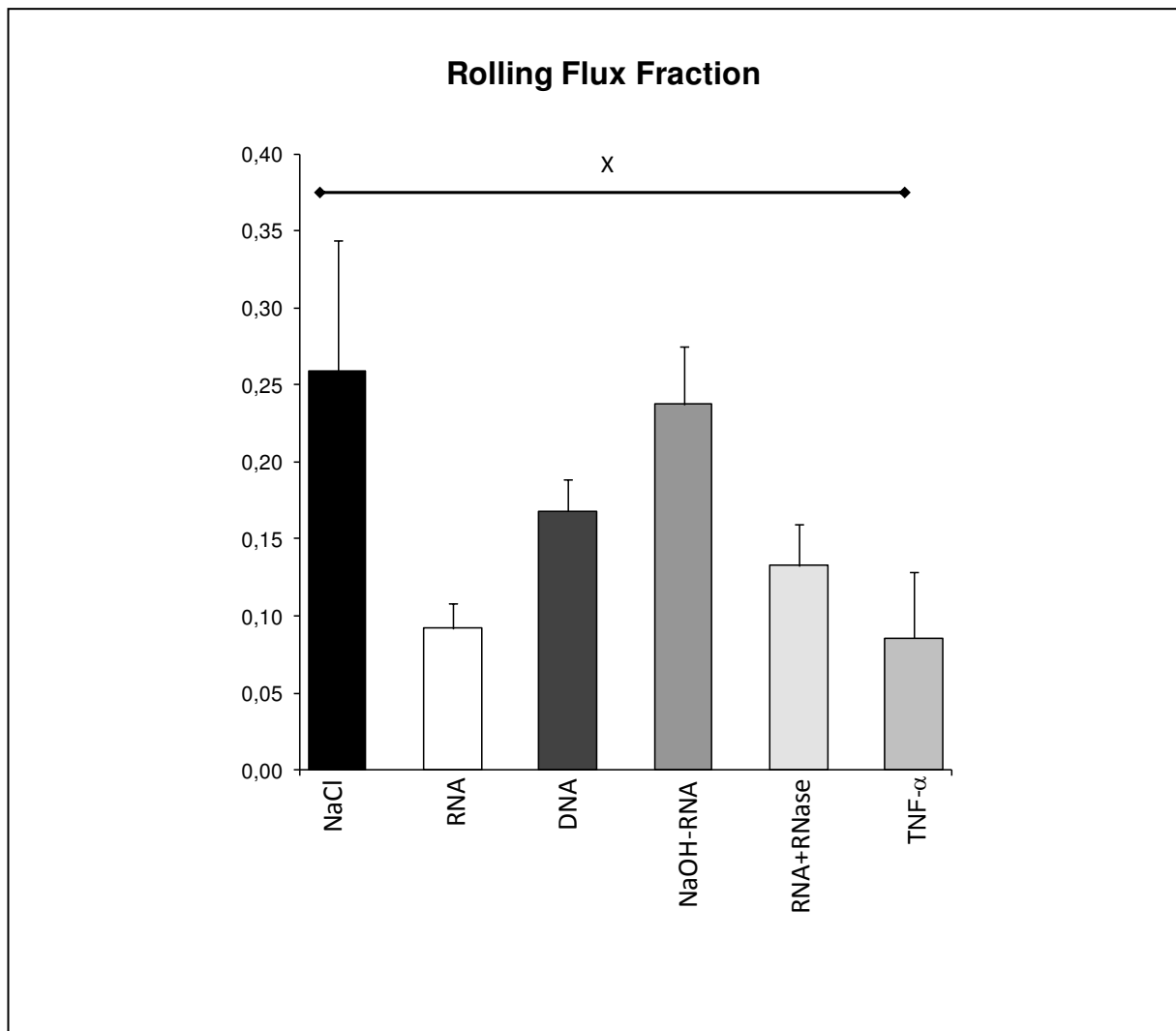


Abbildung 12: RFF nach Vorstimulation mit NaCl, RNA, DNA, mit NaOH-degradierter RNA, mit RNase verdauter RNA und TNF- $\alpha$ . Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. <sup>x</sup>  $p < 0,05$ .

#### 4.1.3. Der TNF- $\alpha$ Antikörper Infliximab reduziert die RNA-abhängige Adhäsion von Leukozyten nicht

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen des Einfluss des TNF- $\alpha$  Antikörper Infliximab auf den proinflammatorischen Einfluss freier RNA dargestellt. Tabelle 5 zeigt die erhobenen hämodynamischen Parameter.

Behandlung	Mäuse n	Gefäße	Durchmesser µm	Blutflussgeschwindigkeit µm/s	Scherrate s <sup>-1</sup>	Systemische Leukozytenzahl n/mikroliter
NaCl	4	13	34± 2	2069 ± 266	1584±197	3475 ± 48
NaCl/ Infliximab	2	7	34±3	2586±295 <sup>x</sup>	2005±337	3475±1250
TNF-α	6	10	29±2	1300±199	1086±138	3233±182
TNF-α/ Infliximab	3	15	31±1	2240±196	1857±202	3075±434
RNA	12	21	26±1	1671±228	1556±207	3897±209
RNA/ Infliximab	3	10	29±1	1780±225	1526±212	3842±424
			n.s.	<sup>x</sup> p<0,05 vs. TNF-α	n.s.	n.s.

Tabelle 5: Hämodynamische Parameter der Versuchsgruppen zur Untersuchung des Einflusses des TNF-α Antikörpers Infliximab auf die RNA-abhängige Leukozytenrekretierung. Mittelwerte ± Standardfehler. <sup>x</sup>p < 0,05; n.s. nicht signifikant.

Die Adhäsion in der mit Infliximab und NaCl i.s. behandelten Gruppe lag bei  $384 \pm 22$  Zellen/mm<sup>2</sup> und war nicht signifikant erhöht im Vergleich zu NaCl alleine ( $192 \pm 40$  Zellen/mm<sup>2</sup>). In der mit Infliximab und RNA i.s. behandelten Gruppe lag die Adhäsion bei  $970 \pm 159$  Zellen/mm<sup>2</sup>. Dieser Wert war reduziert im Vergleich zu RNA alleine mit  $1104 \pm 107$  Zellen/mm<sup>2</sup>, ein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch nicht. In der mit TNF-α vorstimulierten Gruppe führte die Behandlung mit Infliximab zu einer Adhäsion von  $698 \pm 69$  Zellen/mm<sup>2</sup>. Dieser Wert war signifikant niedriger im Vergleich mit TNF-α ohne Infliximab, hier lag die Adhäsion bei  $1070 \pm 203$  Zellen/mm<sup>2</sup>. Abbildung 13 zeigt die entsprechende graphische Darstellung der Adhäsion in den obigen Versuchsgruppen.

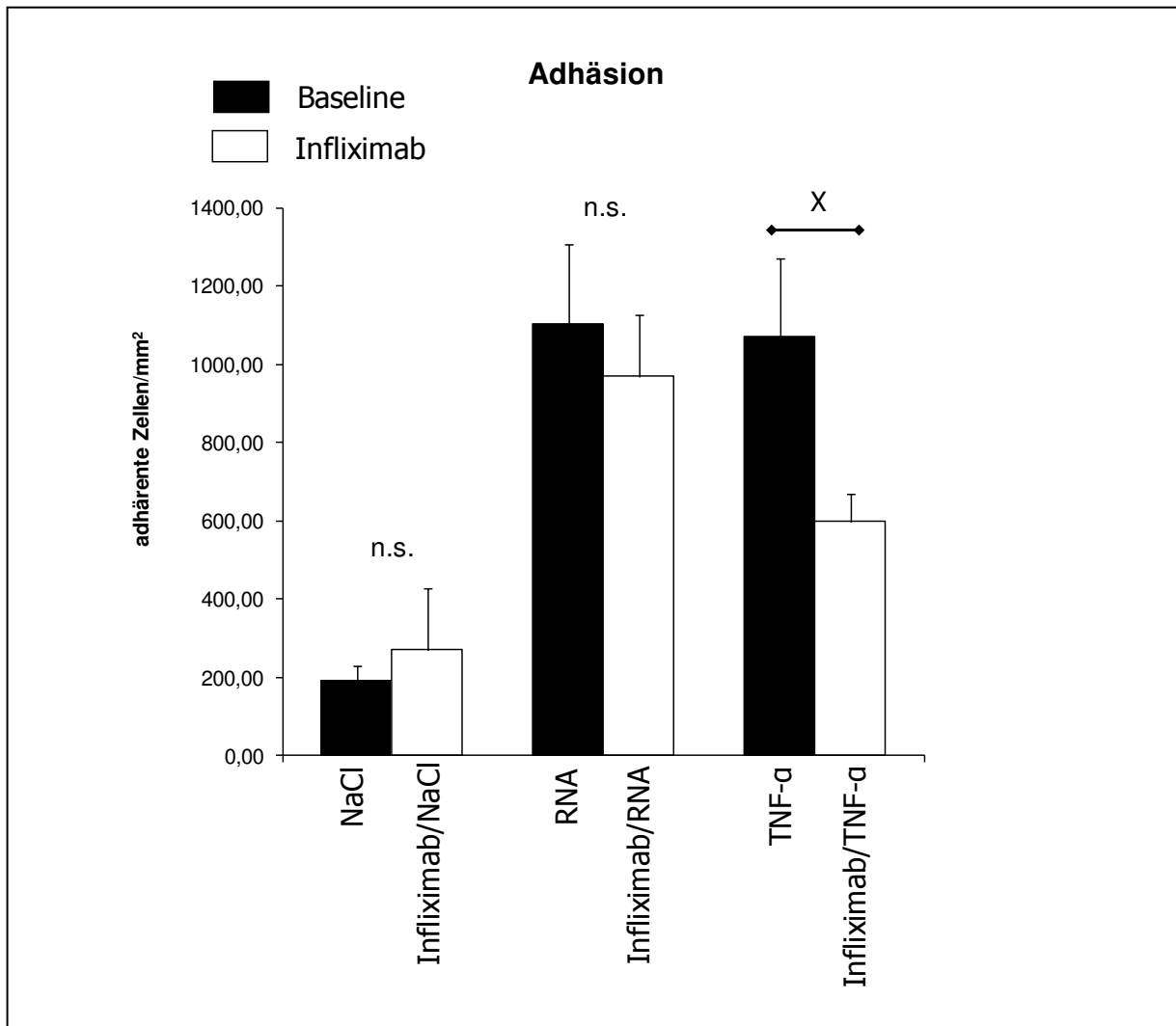


Abbildung 13: Vergleich der Adhäsion nach systemischer Behandlung mit dem TNF- $\alpha$  Antikörper Infliximab nach Vorstimulation mit NaCl, RNA und TNF- $\alpha$ . Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. <sup>x</sup>  $p < 0,05$ ; n.s. nicht signifikant.

Im Vergleich der RFF in den obigen Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit und ohne Infliximab. In der NaCl-Gruppe lag die RFF bei  $0,3 \pm 0,08$  und mit Infliximab bei  $0,21 \pm 0,07$ . Nach Vorbehandlung mit RNA lag die RFF bei  $0,09 \pm 0,02$ , Infliximab erhöhte hier die RFF auf  $0,17 \pm 0,03$ . In der TNF- $\alpha$  Gruppe lag die RFF bei  $0,09 \pm 0,04$  und wurde durch Infliximab reduziert auf  $0,04 \pm 0,03$ . Abbildung 14 zeigt die RFF der obigen Versuchsgruppen.

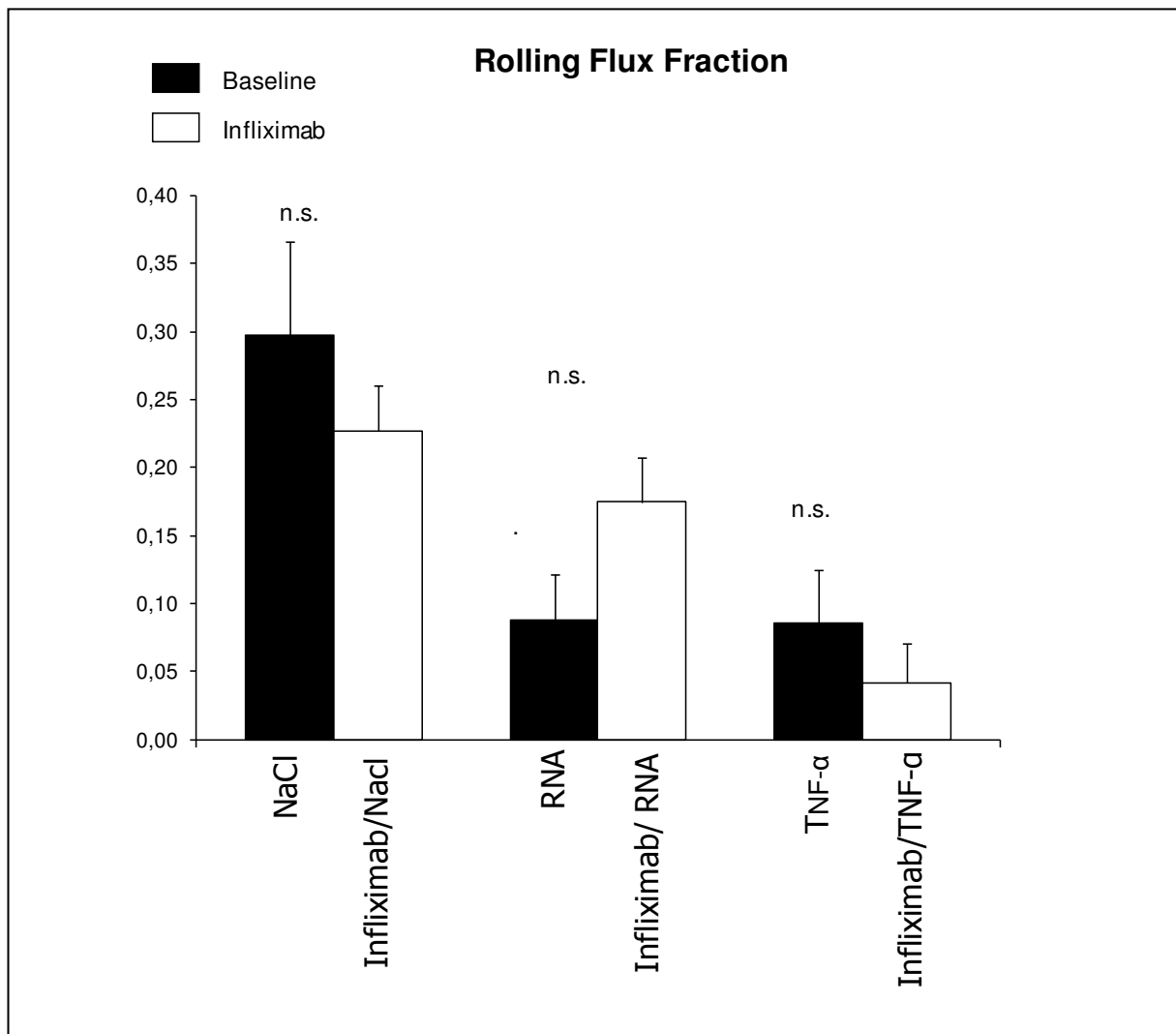


Abbildung 14: RFF Vorstimulation mit NaCl, RNA und TNF- $\alpha$  im Vergleich zur RFF in den genannten Gruppen mit simultaner Behandlung mit Infliximab. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. n.s. nicht signifikant.

#### 4.1.4. Der VEGF-R-2 Antikörper SU-5416 reduziert die RNA-abhängige Adhäsion von Leukozyten

Tabelle 6 zeigt die hämodynamischen Parameter der Versuchsreihen zur Untersuchung, ob eine proinflammatorische Komponente von freier RNA abhängig vom VEGF-R-2 abhängig ist.

Behandlung	Mäuse n	Gefäße	Durchmes- ser $\mu\text{m}$	Blutflussgeschwindigkeit $\mu\text{m/s}$	Scherrate $\text{s}^{-1}$	Systemische Leukozyten zahl n/mikroliter
TNF- $\alpha$ / DMSO	3	10	30 $\pm$ 2	1510 $\pm$ 261	1216 $\pm$ 178	6133 $\pm$ 1458
TNF- $\alpha$ / SU-5416	3	10	33 $\pm$ 3	920 $\pm$ 246 <sup>x</sup>	682 $\pm$ 136 <sup>x</sup>	2800 $\pm$ 404
RNA/DMSO	3	10	28 $\pm$ 2	1310 $\pm$ 329	1124 $\pm$ 231	5100 $\pm$ 462
RNA/ SU-5416	3	12	31 $\pm$ 1	1817 $\pm$ 288	1482 $\pm$ 255	2967 $\pm$ 418
			n.s.	<sup>x</sup> p<0,05 vs. DMSO/TNF- $\alpha$	<sup>x</sup> p<0,05 vs. DMSO/TNF- $\alpha$	n.s.

Tabelle 6: Hämodynamische Parameter nach Vorbehandlung mit dem VEGF-R2 Inhibitor SU-5416 nach Vorstimulation mit TNF- $\alpha$  und RNA. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. <sup>x</sup> p > 0,05. n.s. nicht signifikant.

Abbildung 15 zeigt den Vergleich der Adhäsion der Versuchsgruppen mit DMSO und TNF- $\alpha$ , SU-5416 und TNF- $\alpha$  sowie DMSO und RNA sowie SU-5416 und RNA behandelten Tieren.

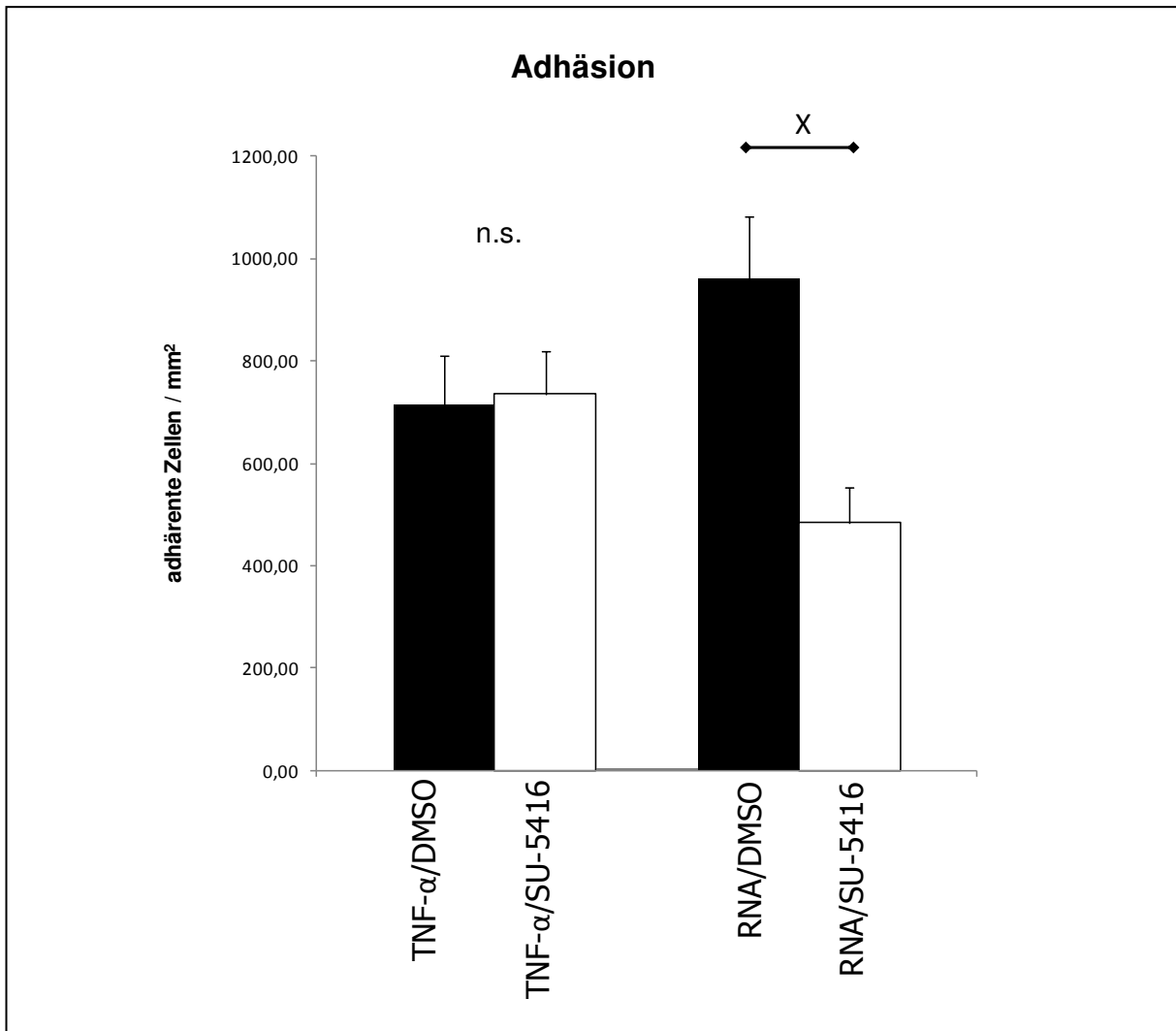


Abbildung 15: Adhäsion von Leukozyten nach Vorstimulation mit TNF- $\alpha$  oder RNA nach Gabe von DMSO als Trägersubstanz und SU-5416 in DMSO. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. <sup>X</sup> p < 0,05; n.s. nicht signifikant.

Die Adhäsion in der nur mit der Trägerlösung DMSO und TNF- $\alpha$  behandelten Kontrollgruppe lag bei  $714,7 \pm 97$  Zellen/mm<sup>2</sup>. Eine signifikante Veränderung der Adhäsion nach zusätzlicher Gabe von SU-5416 ( $735,9 \pm 84,4$  Zellen/mm<sup>2</sup>) fand sich nicht. In der mit DMSO und RNA behandelten Gruppe lag die Adhäsion bei  $959,9 \pm 122,8$  Zellen/mm<sup>2</sup>. Die zusätzliche Behandlung mit SU-5416 reduzierte die Adhäsion signifikant auf  $483,5 \pm 71,3$  Zellen/mm<sup>2</sup>.

Im Vergleich der RFF der obigen Gruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit SU-5416 oder nur mit der Trägerlösung DMSO behandelten Tieren. Die RFF nach Behandlung TNF- $\alpha$ /DMSO lag bei  $0,04 \pm 0,01$ , nach TNF- $\alpha$ /SU-5416 bei  $0,04 \pm 0,02$ . Die Behandlung mit RNA/SU-5416 reduzierte die RFF auf  $0,19 \pm 0,03$  im Vergleich zu RNA/DMSO, hier lag die RFF bei  $0,32 \pm 0,07$ . Abbildung 16 zeigt die RFF der Versuchsgruppen analog zu Abbildung 15.

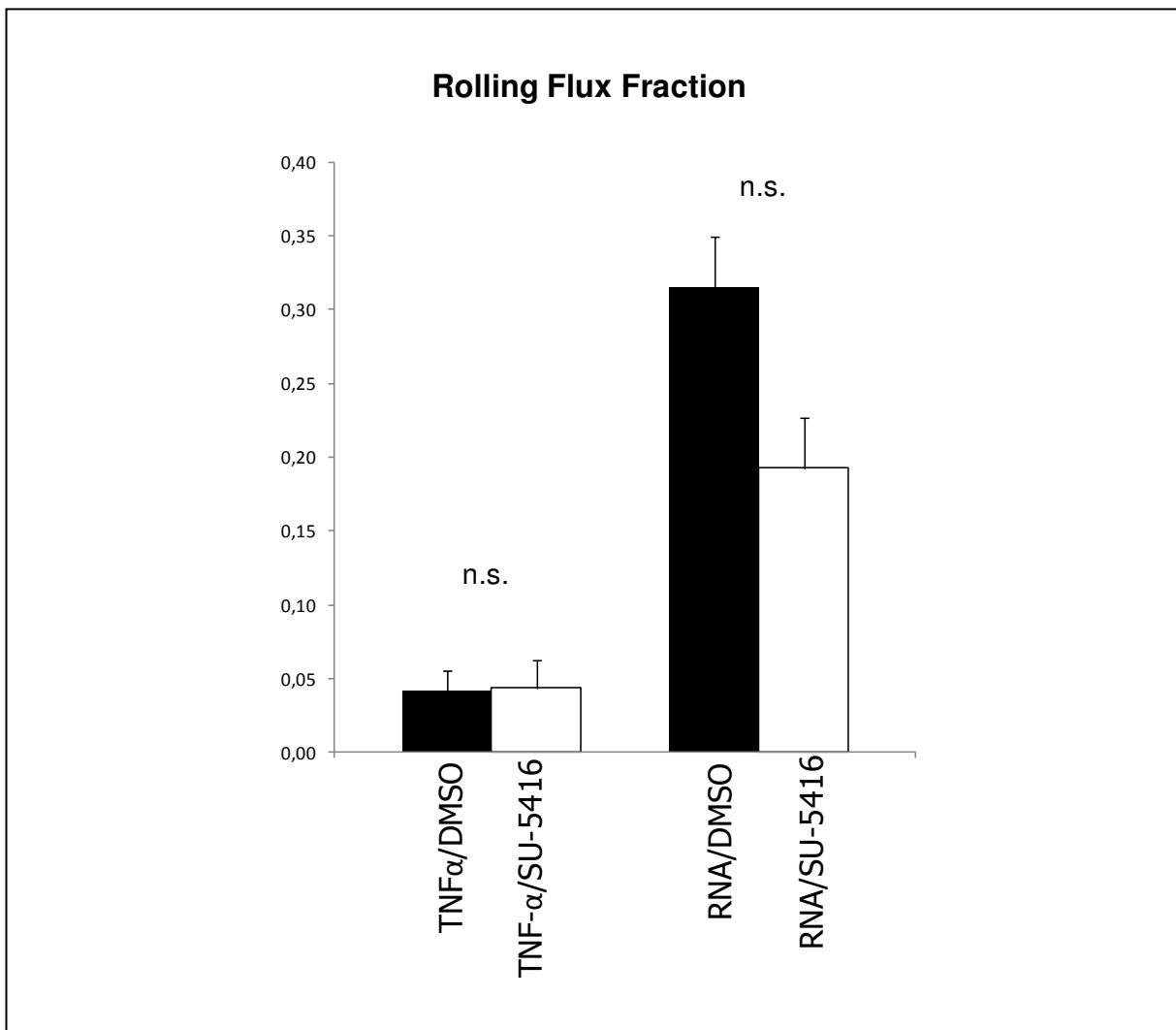


Abbildung 16: RFF nach Vorstimulation mit TNF- $\alpha$  oder RNA nach Gabe von DMSO als Trägersubstanz und SU-5416 in DMSO. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. n.s. nicht signifikant.



## 4.2. Histologie

### 4.2.1. Intravaskuläre Adhäsion der gesamten Leukozytenpopulation

Abbildung 17 zeigt die adhärenenten Zellen intravaskulär in den Präparaten des *M. cremaster* nach Färbung nach Giemsa in den verschiedenen Versuchsgruppen. Die Vorbehandlung mit 150 µl NaCl führte zu  $361 \pm 40$  Zellen/mm<sup>2</sup>. Die Zahl der intravaskulären Leukozyten in der unbehandelten Gruppe (Trauma) lag bei  $730 \pm 83$  Zellen/mm<sup>2</sup>. Die Vorbehandlung mit TNF-α führte zu einem Anstieg der intravaskulären Leukozyten auf  $2381 \pm 109$  Zellen/mm<sup>2</sup> und war signifikant erhöht im Vergleich mit den ersten beiden Gruppen. Die Behandlung mit RNA führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der intravaskulären Leukozyten im Vergleich mit den ersten beiden Gruppen auf  $1567 \pm 113$  Zellen/mm<sup>2</sup> und war signifikant reduziert im Vergleich mit der TNF-α-Gruppe. Abbildung 17 zeigt den Vergleich der Gesamtzahl der perivaskulären Leukozyten in den obigen Gruppen.

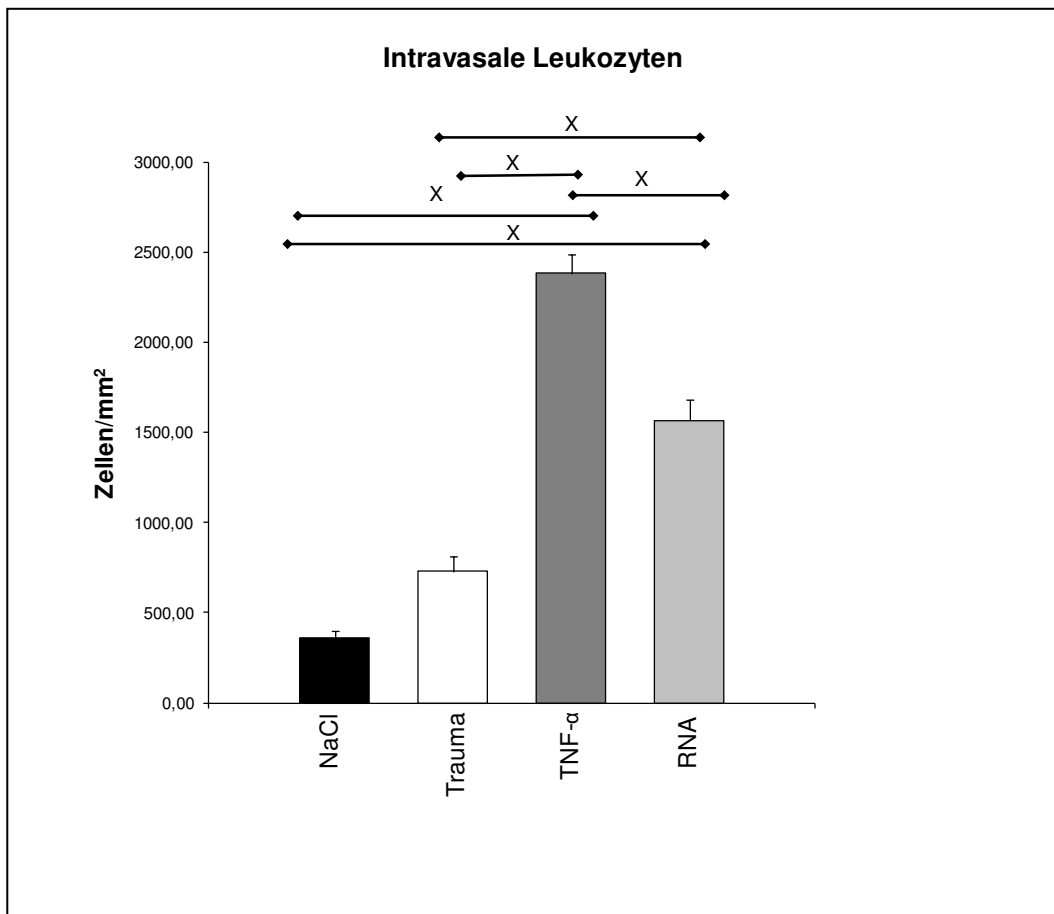


Abbildung 17: Vergleich der Gesamtzahl der intravaskulären Leukozyten, nach Vorbehandlung mit NaCl, ohne Behandlung (Trauma) sowie nach Vorbehandlung mit TNF- $\alpha$  und RNA. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. <sup>X</sup>  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2. Relative Anteile der einzelnen Leukozyten-Subpopulationen intravaskulär

Der Anteil der PMNs lag zwischen  $77 \pm 2$  % (RNA) und  $80,0 \pm 0,01$  % (TNF- $\alpha$ ) und zeigte keinerlei signifikante Unterschiede. Der Anteil der eosinophilen Granulozyten lag zwischen  $5 \pm 3$  % (NaCl) und  $6 \pm 1$  % (Trauma) und ergab keine Signifikanzen in den einzelnen Behandlungsgruppen. Der Anteil der mononukleären Zellen schwankte zwischen  $15 \pm 1$  % (TNF- $\alpha$ ) und  $18 \pm 4$  % (NaCl). Signifikante Unterschiede fanden sich auch hier nicht. Abbildung 18 zeigt die relativen Anteile der einzelnen Leukozyten-Subpopulationen intravaskulär der entsprechenden Gruppen.

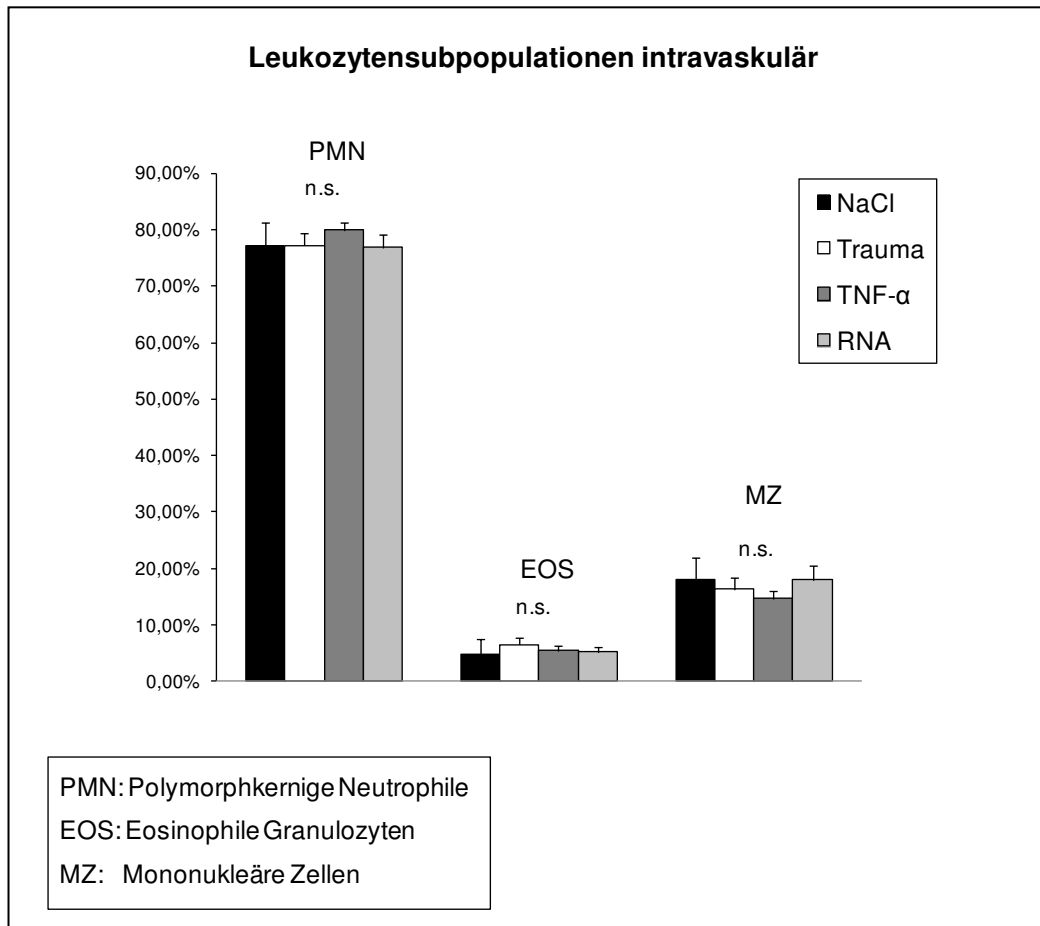


Abbildung 18: Vergleich der relativen Anteile der einzelnen Leukozytensubpopulationen intravaskulär nach Stimulation mit NaCl, ohne Behandlung (Trauma), TNF- $\alpha$  mit NaCl und RNA mit NaCl. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. n.s. nicht signifikant.

#### 4.2.3. Gesamtzahl der perivaskulären Leukozyten

Die Vorbehandlung mit NaCl ergab  $207 \pm 44$  Zellen/mm<sup>2</sup>. Die Gesamtzahl der perivaskulären Leukozyten lag in der unbehandelten (Trauma-) Gruppe bei  $224 \pm 25$  Zellen/mm<sup>2</sup>. Die Behandlung mit TNF- $\alpha$  ergab einen Anstieg der perivaskulären Leukozyten auf  $426 \pm 31$  Zellen/mm<sup>2</sup> und lag signifikant über dem Level der ersten beiden Gruppen. Die Zahl der perivaskulären Leukozyten nach RNA-Behandlung war mit  $388 \pm 22$  Zellen/mm<sup>2</sup> ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich mit den ersten beiden Gruppen, nicht im Vergleich mit der TNF- $\alpha$  Gruppe. Abbildung 19 zeigt die Gesamtzahl der perivaskulären Leukozyten der verschiedenen Gruppen.

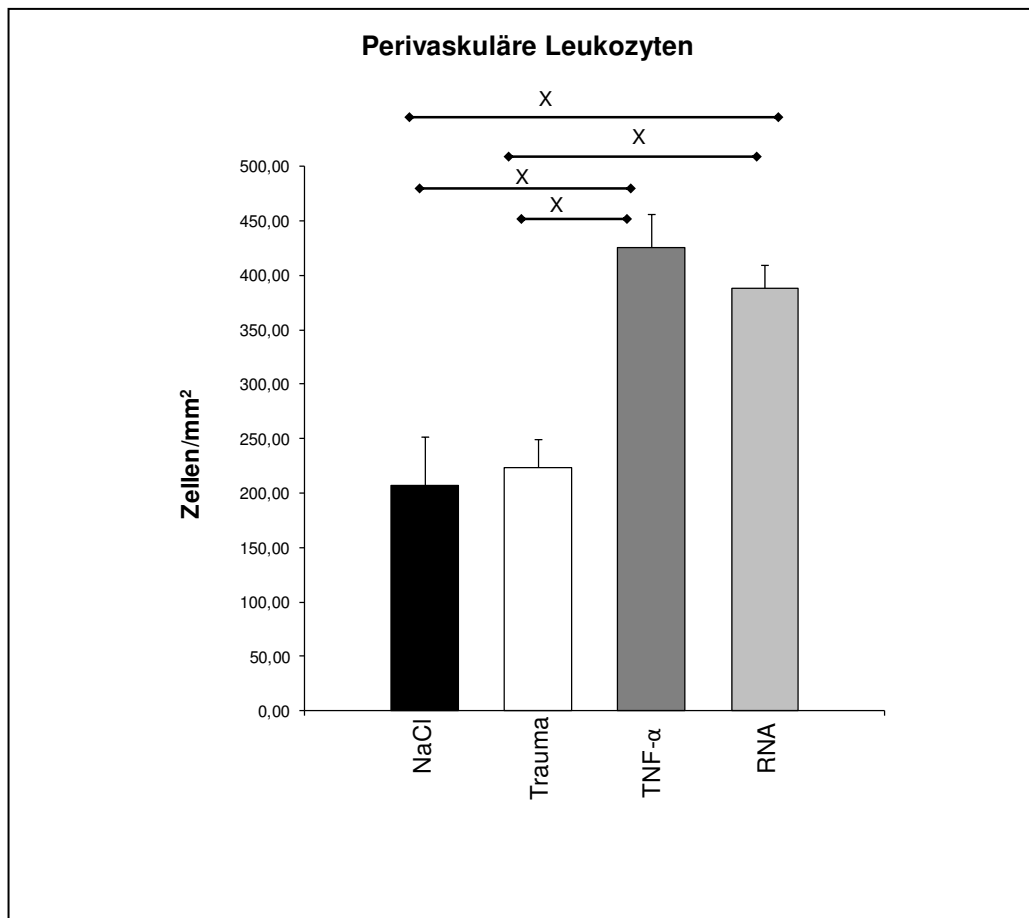


Abbildung 19: Vergleich der Gesamtzahl der perivaskulären Leukozyten, nach Behandlung mit NaCl, ohne Stimulation (Trauma), TNF- $\alpha$  mit NaCl und RNA mit NaCl. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. <sup>x</sup>  $p < 0,05$ .

#### 4.2.4. Relative Anteile der einzelnen Leukozyten-Subpopulationen perivaskulär

Der Anteil der polymorphkernigen neutrophilen Zellen (PMN) lag in allen vier Behandlungsgruppen ( NaCl, Trauma, TNF-  $\alpha$  und RNA) zwischen  $69 \pm 3$  % ( TNF- $\alpha$ ) und  $76 \pm 6$  % (NaCl), der Anteil der eosinophilen Granulozyten (EOS) lag zwischen  $6 \pm 1$  % (RNA) und  $15 \pm 4$  % (Trauma). In beiden Zellreihen fanden sich keine signifikanten Unterschiede. In der mit NaCl behandelten Gruppe lag der Anteil der mononukleären Zellen bei  $14 \pm 4$  %, in der unbehandelten Gruppe (Trauma) bei  $9 \pm 2$  %. Nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  lag der Anteil  $23 \pm 2$  % und nach RNA Behandlung bei  $22 \pm 2$  %. Dieser Anteil war in

beiden letzten Gruppen signifikant gegenüber der unbehandelten (Trauma-) Gruppe. Abbildung 20 zeigt die relativen Anteile der perivaskulären Leukozytensubpopulationen.

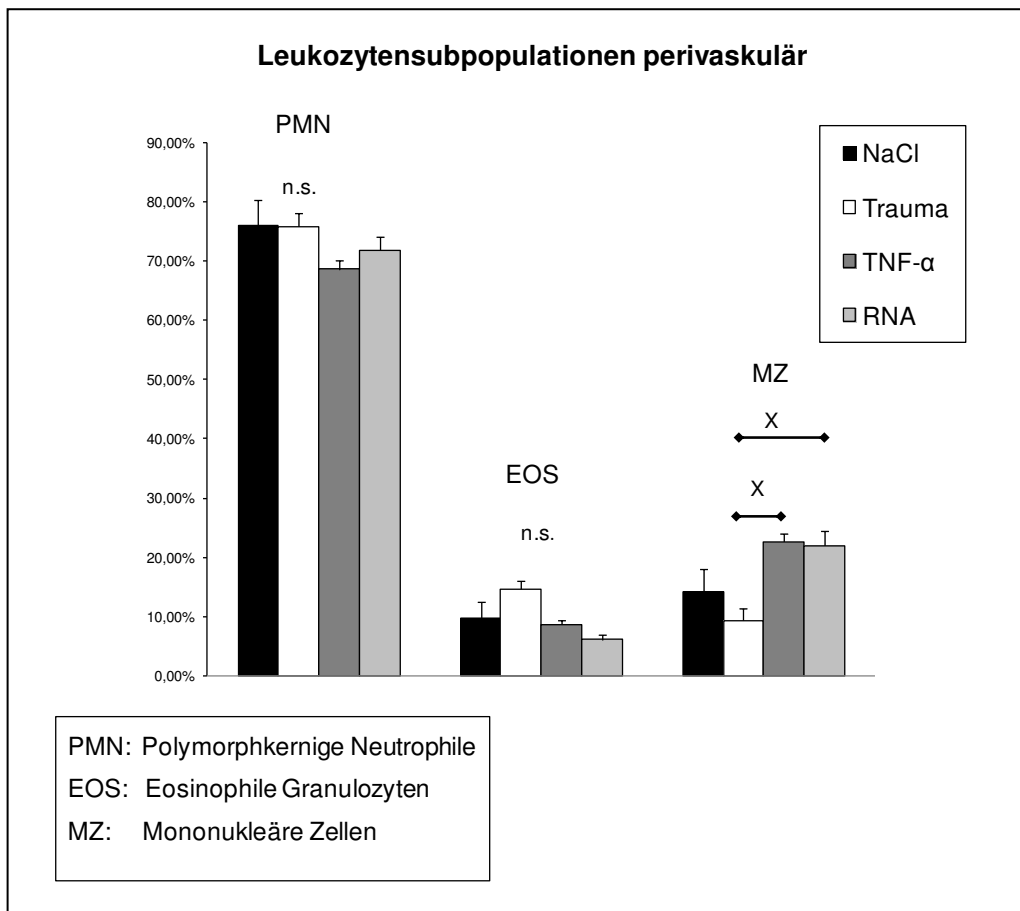


Abbildung 20: Vergleich der einzelnen Leukozytensubpopulationen perivaskulär nach Behandlung mit NaCl, ohne Behandlung (Trauma), TNF- $\alpha$  und RNA. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. <sup>x</sup>  $p < 0,05$ ; n.s. nicht signifikant.

## 5. Diskussion

### 5.1. RNA als pro-inflammatorischer Stimulus, RNase A als Konterpart

TNF- $\alpha$  diente in der Arbeit als Positivkontrolle als pro-inflammatorischer Stimulus. Die i.s. Injektion von TNF- $\alpha$  für das Entzündungsmodell des *M. cremaster* zwei Stunden vor Versuchsbeginn in der verwendeten Dosierung ist so vorbeschrieben (z.B. [7]) und führt zu einer vermehrten Adhäsion der Leukozyten in postkapillären Venolen. Die in den

Versuchsreihen erhobenen Werte waren wie erwartet signifikant erhöht gegenüber der nur mit NaCl behandelten Kontroll-Gruppe. Auch die Vorstimulation mit RNA erhöhte die Adhäsion auf signifikant höhere Werte gegenüber der Kontrollgruppe. Eine Erhöhung der systemischen Leukozytenzahl konnte bei beiden Gruppen nicht beobachtet werden. Auf eine vermehrte Mobilisierung von Leukozyten aus dem Knochenmark kann somit nicht geschlossen werden. RNA beeinflusst *in vivo* somit nicht nur die Permeabilität vaskulärer Endothelien [34] und besitzt pro-thrombotische Eigenschaften [32, 33], sondern stellt vielmehr einen starken pro-inflammatorischen Stimulus da. Die Dosierung von 15 µg liegt im supraphysiologischen Bereich. Tsui et al. konnten zeigen, dass *in vitro* nach der Zugabe von freier RNA in Blutplasma nach einer Inkubationszeit von 15 Sekunden nur noch ca. 1 % der ursprünglichen Menge detektierbar war [61]. Da in dem vorliegenden Versuchsprotokoll somit auch nur ein Bruchteil der applizierten 15 µg die Zielzellen erreicht, kann so von Bedingungen im annähernd physiologischen Bereich ausgegangen werden. Für die Freisetzung von RNA unter pathologischen Bedingungen, wie beispielsweise bei Tumorwachstum und Entzündungen, wird eine verminderte RNA-Degradation durch eine Komplexbildung zum Beispiel mit Lipiden postuliert [27] oder durch die Verpackung in „apoptotic bodies“ [31]. Auch bei der Freisetzung von RNA bei inflammatorischen Geschehen ist ein entsprechender Mechanismus denkbar, der einer schnellen RNA-Degradation entgegenwirkt. *In vitro* Versuche konnten zeigen, dass die Inkubation von Endothelzellen mit extrazellulärer RNA für 24 Stunden die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 induziert, nicht aber die Expression von weiteren Moleküle der Leukozytenadhäsion wie zum Beispiel VCAM und P-Selektin [62]. Die vorliegenden Ergebnisse der Intravitalmikroskopie unterstützen somit die *in vitro* vorliegenden Daten. Nach Erhebung der Adhäsion und der RFF folgte im Versuch die Applikation von RNase A und nach einer Wartezeit von zehn Minuten erneute Messungen an denselben Gefäßen. Die Dosierung der RNase A wurde aus der Literatur übernommen [34]. In einem Modell der fokalen cerebralen Ischämie durch temporäre Okklusion der *A. cerebri media* an der Ratte führte die Vorbehandlung mit RNase A zu einer verminderten Ödembildung im Vergleich zur Kontrollgruppe. In einem Modell der venösen Okklusion des *Sinus sagittalis* an der Ratte zeigte sich nach Vorbehandlung mit RNase A auch hier ein protektiver Effekt bezüglich der Ödembildung auf Grund einer Reduktion der Thrombusformation und einer verkürzten Rekanalisation [34]. Kannemeier et. al konnten mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbte RNA in einer Thrombusformation nachweisen und fanden nach Vorbehandlung mit RNase A eine Reduktion der Anfärbung [33]. Die Dosierung von 50 µg RNase pro Kilogramm Körpergewicht täglich sowie die 20-fach erhöhte Dosis über einen Zeitraum von 4 Wochen zeigten an der Ratte in einer anderen Studie ohne weitere Behandlung keine toxischen

Effekte. Untersucht wurden hier neben dem Körpergewicht der Versuchstiere auch die Nierenretentionsparametern, die hepatischen Transaminasen sowie die Gesamtzahl an Leukozyten und der Hämoglobingehalt im peripheren Blut. Weiter erfolgte die histologische Aufarbeitung verschiedener Gewebeproben (Nervensystem, muskuloskeletales System, Gastrointestinaltrakt und andere) [63]. Ein toxischer Effekt in den eigenen Versuchsreihen an einem murinen Modell nach Einmalgabe von RNase in der Dosierung von 42 µg pro Kilogramm Körpergewicht ist dementsprechend nicht zu erwarten. In der vorliegenden Arbeit führte RNase A nach Vorstimulation mit RNA zu einem Loslösen bereits adhärenter Zellen. Denkbar wäre, dass freie RNA auch einen bis dato unbekanntem Liganden zwischen Leukozyten und Endothel darstellt und die Verminderung der Adhäsion nach RNase-Gabe auf eine Lösung dieser Verbindung hinweist. Abbildung 21 zeigt eine schematische Darstellung dieser postulierten Ligandenfunktion. Auch nach Vorstimulation mit TNF- $\alpha$  konnte ein Rückgang der Leukozytenadhäsion nach RNase beobachtet werden. Dieser Effekt ist möglicherweise durch eine Freisetzung von RNA durch den pro-inflammatorischen Stimulus TNF- $\alpha$  zu erklären, die, ähnlich wie bei der direkten Vorstimulation mit RNA, hier eine direkte Ligandenfunktion erfüllt. Kleinert et. al. konnten an einem Modell der heterogenen Herztransplantation an der Ratte zeigen, dass die Applikation von boviner RNase A und rekombinanter humaner RNase 1 (50 µg pro Kilogramm Körpergewicht) unmittelbar vor der Transplantation und danach einmal täglich die akute Abstoßungsreaktion des Transplantates signifikant verzögerte. Inaktive RNase 1 ohne ribonukleolytische Aktivität hatte hier keinen Einfluss auf das Überleben des Transplantates. Die Autoren schließen daraus, dass sich der protektive Effekt auf das transplantierte Organ durch die ribonukleolytische Aktivität erklären lässt [63]. Im Rahmen einer akuten zellulären Abstoßungsreaktion eines Transplantates findet sich neben Ödembildung, Vaskulitiden und Hämorrhagien histologisch eine inflammatorische Infiltration des Transplantatgewebes, vor allem mit Lymphozyten, aber auch mit Makrophagen, Plasmazellen und neutrophilen Granulozyten [64]. In quantitativen Gewebesanalysen mittels Durchflusszytometrie zeigten Kleinert et al. in den Transplantaten unter Behandlung mit RNase A am 1. Tag postoperativ eine verminderte Gesamtzahl von Leukozyten sowie der neutrophilen Granulozyten im Vergleich mit der Kontrollgruppe [63]. Diese Ergebnisse stützen so die eigenen Ergebnisse und die Theorie, dass die Applikation von RNase A das Andocken von Leukozyten an die Gefäßwand und die nachfolgende Transmigration hemmt. In weiteren Versuchsreihen gilt es zu klären, welche genauen Mechanismen zur Lösung von Leukozyten nach exogen applizierter RNase führen.

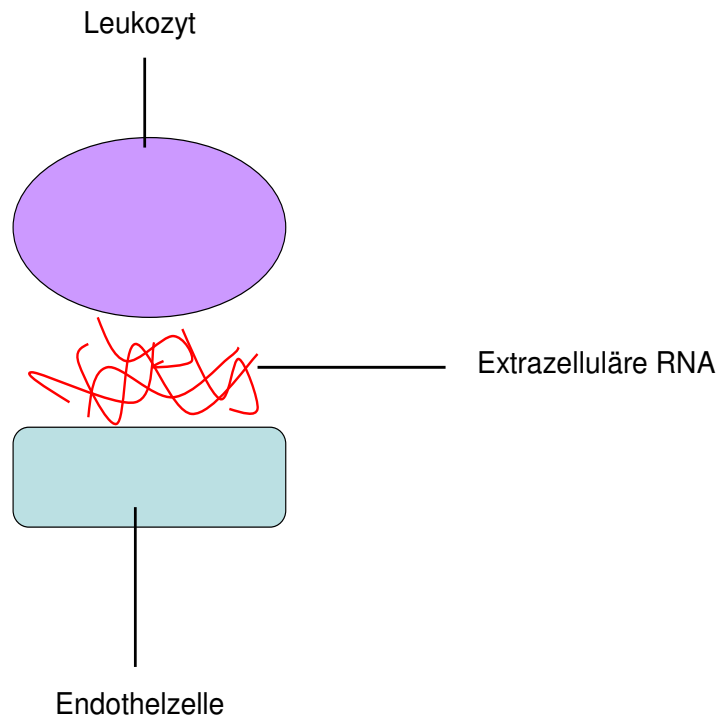


Abbildung 21: In der Arbeit postulierter mechanistischer Zusammenhang zwischen fester Adhäsion von Leukozyten am Gefäßendothel nach Vorstimulation mit RNA. RNA führt nicht nur zu einer Freisetzung proinflammatorischer Stimuli, sondern stellt einen bisher unbekanntem Liganden zwischen Leukozyten und Endothel dar.

## 5.2. DNA, mit NaOH hydrolysierte RNA und mit RNase degradierte RNA zeigen keinen Einfluss auf die Leukozytenrekrutierung

Nach Vorstimulation mit 15 µg DNA i.s. zeigte sich keine vermehrte Adhäsion im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe. Auch eine Vorstimulation mit RNA, die mit RNase A degradiert wurde, und mit NaOH hydrolysierte RNA zeigte keine Veränderung in der Adhäsion im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Diese *in vivo* Ergebnisse unterstützen Versuchsreihen aus der Zellkultur, in der die Inkubation von Endothelzellen mit DNA oder hydrolysierte RNA zu keiner vermehrten Hochregulation von ICAM-1 führte [62]. Hieraus lässt sich schließen, dass der proinflammatorische Effekt von RNA nicht auf einzelne Nukleotide zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf eine bestimmte, bis dato unbekannte Sekundärstruktur der RNA.



### 5.3. Der akute proinflammatorische Effekt von RNA ist nicht durch TNF- $\alpha$ getriggert

In dieser Versuchsreihe wurde ein möglicher Zusammenhang der proinflammatorischen Antwort von RNA und TNF- $\alpha$  untersucht. Infliximab ist ein monoklonaler Antikörper gegen TNF- $\alpha$ , der klinisch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie *Morbus crohn* [65] oder rheumatoider Arthritis [66] verwendet wird. In der mit TNF- $\alpha$  behandelten Gruppe sank die Adhäsion nach Infliximab-Therapie signifikant, in der Kontrollgruppe und der mit RNA behandelten Tieren kam es zu keiner relevanten Minderung der Adhäsion durch Infliximab. Eine Aufhebung des TNF- $\alpha$  Effektes durch den TNF- $\alpha$ -Antikörper war zu erwarten. In einer weiteren Versuchsanordnung aus der eigenen Arbeitsgruppe führte die Vorbehandlung mit TAPI, einem Inhibitor des „TNF- $\alpha$  converting enzyme“ zu einer signifikanten Verminderung der Adhäsion von Leukozyten nach RNA-Gabe intraskrotal im Entzündungsmodell des *M. cremaster* im Vergleich zur Kontrollgruppe (publiziert in [62]). Auch führt die intraskrotale Applikation von RNA in der wie in den eigenen Versuchen gewählten Konzentration und Dosierung zu einer Hochregulation von TNF- $\alpha$  im Gewebe des *M. cremaster* nach zwei Stunden. *In vitro* führt RNA weiter zu einer Freisetzung von TNF- $\alpha$  aus Monozyten zeit- und konzentrationsabhängig mit einem Maximum an Ausschüttung nach vier Stunden [62]. Infliximab bindet und neutralisiert nicht nur gelöstes TNF- $\alpha$ , sondern auch die membrangebundene Form an Monozyten und induziert in den entsprechenden Zellen die Apoptose [67]. In der Versuchsanordnung konnte die durch RNA induzierte Adhäsion nicht blockiert werden. Das Entzündungsmodell des *M. cremaster* mit einer Stimulationszeit von zwei Stunden ist ein Modell der akuten Entzündung. Zwar sollte RNA neben der vermehrten Expression auch zu einer vermehrten TNF- $\alpha$ -Ausschüttung aus Monozyten führen und über eine vermehrte Expression von TNF- $\alpha$  vermehrt aus Endothelzellen freigesetzt werden, in der eigenen Versuchsanordnung führte die Blockade von TNF- $\alpha$  jedoch zu keiner Herabsetzung der durch RNA induzierten Adhäsion. Der Zeitpunkt der Untersuchung ist möglicherweise zu früh. Um hier weiterführende Ergebnisse zu bekommen, wäre ein Modell der chronischen Entzündung zielführend, um hier den chronologischen Ablauf einer durch RNA getriggerten Entzündungskomponente durch TNF- $\alpha$  besser charakterisieren zu können.

## 5.4. Der proinflammatorische Effekt von RNA ist abhängig von VEGF-R-2

Die Behandlung mit der Trägerlösung DMSO führte zu keiner Reduktion der von TNF- $\alpha$  und RNA ausgelösten Leukozytenadhäsion. Die Ergebnisse wurden somit durch die Trägerlösung nicht beeinflusst. Die Behandlung mit SU-5416 führte auch zu keiner Minderung der Adhäsion nach TNF- $\alpha$  Gabe. In der mit RNA behandelten Gruppe reduzierte SU-5416 die Adhäsion signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. SU-5416 blockiert die Autophosphorylierung des VEGF-R-2 [68] und wird auf Grund seiner anti-angiogenetischen Eigenschaften klinisch zur Therapie maligner Erkrankungen wie dem metastasierten Colon-Carcinom [69], Tumoren des zentralen Nervensystems bei Kindern [70] und anderen verwendet. Die in der Literatur verwendeten Dosierungen in murinen Modellen schwanken. In einem Modell der diabetischen Nephropathie wurden 2 mg pro Kilogramm Körpergewicht zweimal pro Woche appliziert [71]; zur Untersuchung des Wachstums verschiedenen Tumorzelllinien nach subcutaner Implantation in einer anderen Versuchsreihe erhielten die Versuchstiere 25 mg pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag [68]. Die in der eigenen Versuchsreihe gewählte Dosierung erfolgte empirisch. In einem murinen Sepsis-Modell reduzierte die Blockade des VEGF-R-2, nicht aber die Blockade des VEGF-R-1 zu einer signifikant geringen Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe [37]. Fischer et. al. konnten zeigen dass RNA die Permeabilität vaskulärer Endothelien erhöht. *In vitro* konnte dieser Effekt durch eine Blockade des VEGF-R-2 sowie einen neutralisierenden Antikörper gegen VEGF-A aufgehoben werden. Weiter konnten die Autoren eine konzentrationsabhängige Bindung von RNA an VEGF-A-165 nachweisen, das eine Bindungsstelle für Heparin aufweist. Die Autoren postulieren hier den polyanionischen Charakter von RNA als ursächlich für eine mögliche Mobilisierung von VEGF-A-165 und der Verbindung mit dem VEGF-R-2 [34]. Später konnte *in vitro* gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von RNA die Bindung von VEGF-A an den VEGF-R-2 konzentrationsabhängig verstärkt wird und die Phosphorylierung des VEGF-R-2 durch RNA vergleichbar ist, wie durch VEGF-A selbst. Die Phosphorylierung des VEGF-R-2 führt über untergeordnete Signalkaskaden zu einer Exozytose des von-Willebrand-Faktors aus den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen, die unter anderem auch pro-inflammatorische Zelladhäsionsmoleküle wie P-Selektin enthalten [35]. Weiter konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine vermehrte Adhäsion mononukleärer Zellen unter RNA in der Anwesenheit eines VEGF-Antikörpers signifikant vermindert ist [62]. Die eigenen Ergebnisse lassen, vor dem Hintergrund der Daten aus der

Literatur, auf eine Beteiligung von VEGF-R-2 an der proinflammatorischen Komponente von RNA schließen.

## 5.5. Histologie

In den nach Giemsa gefärbten Präparaten des *M. cremaster* zeigte sich ebenfalls, wie in der Intravitalmikroskopie, eine vermehrte Anzahl intravaskulärer Leukozyten nach Vorstimulation mit RNA. Der Vergleich der einzelnen Leukozytensubpopulationen intravaskulär zeigte keine signifikanten Unterschiede. Extravaskulär zeigte sich neben einer vermehrten Gesamtzahl an Leukozyten auch eine Verschiebung zu mononukleären Zellen sowohl in den mit TNF- $\alpha$  behandelten Tieren als auch in der RNA-Gruppe. *In vitro* Versuche von Fischer et al. zeigten eine vermehrte Transmigration von Monozyten über eine Einzelschicht aus Endothelzellen nach Vorbehandlung der Endothelien mit RNA und TNF- $\alpha$ . Diese Transmigration war in Anwesenheit eines VEGF-Antikörpers signifikant reduziert [62]. Extrazelluläre RNA als proinflammatorischer Stimulus führt somit nicht nur zu einer vermehrten Adhäsion von Leukozyten, sondern konsekutiv auch zu einer vermehrten Extravasation *in vivo*.

## 6. Zusammenfassung

Zielsetzung der Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von extrazellulärer RNA auf die Rekrutierung von Leukozyten *in vivo* am intravitalmikroskopischen Modell des *M. cremaster* der Maus. Im Rahmen von Verletzungen, Apoptose und Nekrose von Zellen wird RNA in den extrazellulären Raum abgesondert. Bekannt ist, dass diese RNA zum einen prothrombotische Eigenschaften hat, und zum anderen zu einer erhöhten Permeabilität vaskulärer Endothelien führt. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob extrazelluläre RNA einen Einfluss auf inflammatorische Prozesse, speziell der Leukozytenrekrutierung, besitzt. Weiter galt es, die mechanistische Rolle von RNase A in diesem Zusammenhang zu charakterisieren. Hierfür wurden intravitalmikroskopische Studien am Entzündungsmodell des *M. cremaster* der Maus durchgeführt. Es zeigte sich eine vermehrte Adhäsion von Leukozyten in postkapillären Venolen nach Vorstimulation mit freier RNA, vergleichbar mit der Vorstimulation mit TNF- $\alpha$ . DNA, hydrolysierte und degradierte RNA zeigten keinen proinflammatorischen Einfluss. Die Gabe von RNase A im Versuch führte zu einem Loslösen bereits adhärenter Zellen nach Vorstimulation mit RNA. Der gleiche Effekt wurde interessanterweise auch nach der Vorstimulation mit TNF- $\alpha$  beobachtet. Diese Ergebnisse werden durch experimentelle Ansätze aus der Transplantationschirurgie untermauert. In einem Modell der heterogenen Herztransplantation an der Ratte führte die Behandlung mit RNase A zu einer verminderten Infiltration des Transplantates durch Leukozyten im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Nach Vorbehandlung mit dem VEGF-R-2 Blocker SU-5416 konnte die Adhäsion von Leukozyten in der hier vorliegenden Arbeit nach Vorstimulation durch RNA signifikant vermindert werden. Dies lässt auf eine starke Abhängigkeit des proinflammatorischen Effektes von RNA von VEGF-R-2 schließen. Nach Vorbehandlung mit dem TNF- $\alpha$  Antikörper Infliximab konnte keine signifikante Verminderung der Adhäsion nach Vorstimulation mit RNA beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen in Konflikt mit Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe, in der die Vorbehandlung mit TAPI, einem Inhibitor des TNF- $\alpha$ -Converting-Enzyme die Adhäsion signifikant reduzierte. Weitere Versuchsansätze werden hier zeigen, ob eine Reduktion der Adhäsion durch Infliximab erst im zeitlichen Verlauf zu beobachten ist. Eine Erhöhung der Gesamtzahl der Leukozyten im Blut konnte nach Vorstimulation mit RNA nicht beobachtet werden, eine kurzfristige Mobilisierung von Leukozyten aus dem Knochenmark kann somit ausgeschlossen werden. In der Histologie zeigten sich eine vermehrte Extravasation von Leukozyten nach Vorstimulation mit RNA und eine signifikante Verschiebung hin zu mononukleären Zellen. Diese mononukleären Zellen verstärken möglicherweise den proinflammatorischen Effekt von RNA durch die zusätzliche

Ausschüttung von Zytokinen, wie zum Beispiel TNF- $\alpha$ . Neu an der Arbeit ist, dass extrazelluläre RNA nicht nur prothrombotische Eigenschaften besitzt und die Permeabilität vaskulärer Endothelien beeinflusst. Sie besitzt weiter einen besonderen Einfluss auf inflammatorische Prozesse durch Hervorrufung vermehrter Adhäsion und Transmigration von Leukozyten im Falle eines lokalen Entzündungsreizes. Die erhobenen Daten legen einen Zusammenhang mit VEGF-R-2 nahe, TNF- $\alpha$  spielt in dem vorliegenden Modell einer akuten Entzündungsreaktion nur eine untergeordnete Rolle. Neu ist weiter, dass RNase A zu einem Loslösen von bereits adhären Leukozyten führt. Hier werden weitere Versuchsansätze den genauen kausalen Zusammenhang klären. Von klinischer Bedeutung an der vorliegenden Arbeit sind vor allem neue Therapieansätze durch RNase A. Mögliche Einsatzgebiete liegen hier bei inflammatorischen Krankheitsbildern wie der Sepsis sowie in der Verhinderung von akuten Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiaminetetraacetat Acid
Eos	Eosinophile Zellen
HUVECs	Human endothelial umbilical vein endothelial cells
i.p.	intraperitoneal
i.s.	intrascrotal
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
ICAM-2	Intercellular Adhesion Molecule 2
Lfa-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MZ	Mononukleäre Zellen
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PIGF	Placental Growth Factor
PMNs	Polymorphkernige Leukozyten
RNA	Ribonucleicacid
ssRNA	single-stranded Ribonucleicacid
TACE	Tumor-Necrosis-Factor- $\alpha$ Converting Enzyme
TNF- $\alpha$	Tumor- Necrosis-Faktor- $\alpha$
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF-A	Vaskular Endothelial Growth Factor A
VEGF-B	Vaskular Endothelial growth factor B
VEGF-C	Vaskular Endothelial Growth Factor C
VEGF-D	Vaskular Endothelial Growth Factor D
vWF	von Willebrand Faktor

## 7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verschiedene Adhäsionsmoleküle mit Vorkommen und Liganden. Modifiziert nach: Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation, B. Walzog, P. Gaetgens, News in physiological science, Juni 2000, 15, 107-113

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen RNA-Arten in der menschlichen Zelle. (Modifiziert nach Löffler et. Al. , Biochemie und Pathobiochemie, Springer, 8. Auflage, Seite 163)

Tabelle 3: Häodynamische Parameter der Versuchsreihe zur Untersuchung des Einflusses von NaCl, TNF- $\alpha$  und RNA auf die Leukozytenrekrutierung *in vivo*.

Tabelle 4: Häodynamische Parameter der verschiedenen Gruppen zur Untersuchung des Einflusses von vorbehandelter RNA und DNA auf die Leukozytenrekrutierung *in vivo*.

Tabelle 5: Häodynamische Parameter der verschiedenen Versuchsgruppen Untersuchung des Einflusses des TNF- $\alpha$  Antikörpers auf die RNA-abhängige Leukozytenrekrutierung.

Tabelle 6: Häodynamische Parameter zur Untersuchung des Einflusses des VEGF-R-2 Inhibitors SU-5416 auf die Leukozytenrekrutierung

## 7.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Einteilung des Immunsystems in angeborenen und erworbenen Anteil

Abbildung 2: Schematischer Ablauf der einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung. Modifiziert nach Ley et al. 2007, Nature reviews, Sep.7 Seite 678-689

Abbildung 3: Die Bindung von TNF- $\alpha$  an die Rezeptoren 1 und 2 und die entsprechenden untergeordneten Signalkaskaden. Modifiziert nach Parameswaran N, et al., Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2010;20(2):87-103. Review

Abbildung 4: Schematische Struktur einer tRNA (Löffler et. Al. , Biochemie und Pathobiochemie, Springer, 8. Auflage, Seite 163, mit Genehmigung des Springerverlages, Lizenznummer 370368114540)

Abbildung 5: Auszüge aus der Elektrophorese der RNA Proben nach Isolation aus der Skelettmuskulatur des Oberschenkels von männlichen C57/Bl6 Mäusen

Abbildung 6: Präparierter *M. cremaster* der Maus

Abbildung 7: Bildausschnitt einer Videosequenz der intravitalmikroskopischen Untersuchung am *M. cremaster* der Maus

Abbildung 8: Bildausschnitt eines Whole-mount Präparates des *M. cremaster* der Maus nach Färbung nach Giemsa

Abbildung 9: Adhäsion nach Vorstimulation mit NaCl, TNF- $\alpha$  und RNA vor und nach Applikation von RNase

Abbildung 10: RFF nach Vorstimulation mit NaCl, TNF- $\alpha$  oder RNA intrascrotal vor und nach Applikation von RNase

Abbildung 11: Adhäsion von Leukozyten nach Applikation von NaCl, RNA, DNA, mit NaOH hydrolysiertes RNA, mit RNase verdauter RNA und TNF- $\alpha$

Abbildung 12: RFF nach Vorstimulation mit NaCl, RNA, DNA, mit NaOH hydrolysiertes RNA, mit RNase verdauter RNA und TNF- $\alpha$

Abbildung 13: Adhäsion nach systemischer Behandlung mit dem TNF- $\alpha$  Antikörper Infliximab nach Vorstimulation mit NaCl, RNA oder TNF- $\alpha$

Abbildung 14: RFF nach systemischer Behandlung mit dem TNF- $\alpha$  Antikörper Infliximab nach Vorstimulation mit NaCl, RNA oder TNF- $\alpha$

Abbildung 15: Adhäsion von Leukozyten unter Vorstimulation mit DMSO, DMSO mit TNF- $\alpha$  oder DMSO mit RNA sowie mit dem VEGF-R-2 Inhibitor SU-5416, gelöst in DMSO bei Vorstimulation mit RNA oder TNF- $\alpha$

Abbildung 16: RFF nach Vorstimulation mit TNF- $\alpha$  oder RNA nach Gabe von DMSO als Trägersubstanz und SU-5416 in DMSO

Abbildung 17: Gesamtzahl der intravaskulären Leukozyten ohne Behandlung (Trauma) und nach Vorbehandlung mit NaCl, TNF- $\alpha$  oder RNA

Abbildung 18: Relativen Anteile der einzelnen Leukozytensubpopulationen intravaskulär ohne Behandlung (Trauma) und nach Vorbehandlung mit NaCl, TNF- $\alpha$  oder RNA

Abbildung 19: Gesamtzahl der perivaskulären Leukozyten ohne Behandlung (Trauma) und nach Behandlung mit NaCl, TNF- $\alpha$  oder RNA

Abbildung 20: Relative Anteile der einzelnen Leukozytensubpopulationen perivaskulär ohne Behandlung (Trauma), nach Behandlung mit NaCl, TNF- $\alpha$  oder RNA

Abbildung 21: RNA als Ligand zwischen Leukozyten und Endothelzellen



## 7.4. Literaturverzeichnis

1. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
2. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 657-70.
3. Zarbock, A. and K. Ley, *Neutrophil adhesion and activation under flow*. Microcirculation, 2009. **16**(1): p. 31-42.
4. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
5. Vestweber, D. and J.E. Blanks, *Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 181-213.
6. Alon, R., et al., *Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow*. J Cell Biol, 1996. **135**(3): p. 849-65.
7. Sperandio, M., et al., *Alpha 2,3-sialyltransferase-IV is essential for L-selectin ligand function in inflammation*. Eur J Immunol, 2006. **36**(12): p. 3207-15.
8. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
9. Kunkel, E.J. and K. Ley, *Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo*. Circ Res, 1996. **79**(6): p. 1196-204.
10. Evans, R., et al., *Integrins in immunity*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 2): p. 215-25.
11. Staunton, D.E., et al., *The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus*. Cell, 1990. **61**(2): p. 243-54.
12. Walzog, B. and P. Gaehdgens, *Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation*. News Physiol Sci, 2000. **15**: p. 107-113.
13. de Fougères, A.R., et al., *Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1*. J Exp Med, 1991. **174**(1): p. 253-67.
14. Galkina, E. and K. Ley, *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2292-301.
15. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 327-34.
16. Carman, C.V., *Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 17): p. 3025-35.
17. Parameswaran, N. and S. Patial, *Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2010. **20**(2): p. 87-103.
18. Twu, Y.C., M.R. Gold, and H.S. Teh, *TNFR1 delivers pro-survival signals that are required for limiting TNFR2-dependent activation-induced cell death (AICD) in CD8+ T cells*. Eur J Immunol, 2011. **41**(2): p. 335-44.
19. Bradley, J.R., *TNF-mediated inflammatory disease*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 149-60.
20. Jung, U. and K. Ley, *Regulation of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule 1 expression in mouse cremaster muscle vasculature*. Microcirculation, 1997. **4**(2): p. 311-9.
21. Löffler, *Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage, 2014, S. 147: Springer Verlag, Heidelberg.
22. Löffler, *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage, 2006 S. 162: Springer Verlag, Heidelberg.
23. Rassow, *Duale Reihe: Biochemie*. 3. Auflage, 2008, S. 433: Thieme Verlag, Stuttgart,

24. Löffler, *Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie*, S. 255. 6. Auflage, 2005 S. 255: Springer Verlag, Heidelberg.
25. Mandel P, M.P., *Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme*. C R Acad Sci 112,16, 1947.
26. Kamm, R.C. and A.G. Smith, *Nucleic acid concentrations in normal human plasma*. Clin Chem, 1972. **18**(6): p. 519-22.
27. Wieczorek, A.J., C. Rhyner, and L.H. Block, *Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(10): p. 3455-9.
28. Kopreski, M.S., et al., *Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(8): p. 1961-5.
29. Kopreski, M.S., F.A. Benko, and C.D. Gocke, *Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **945**: p. 172-8.
30. Halicka, H.D., E. Bedner, and Z. Darzynkiewicz, *Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis*. Exp Cell Res, 2000. **260**(2): p. 248-56.
31. Hasselmann, D.O., et al., *Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum*. Clin Chem, 2001. **47**(8): p. 1488-9.
32. Nakazawa, F., et al., *Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP)*. Biochem J, 2005. **385**(Pt 3): p. 831-8.
33. Kannemeier, C., et al., *Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(15): p. 6388-93.
34. Fischer, S., et al., *Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2457-65.
35. Fischer, S., et al., *Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells*. FASEB J, 2009. **23**(7): p. 2100-9.
36. Cao, Y., *Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands*. Sci Signal, 2009. **2**(59): p. re1.
37. Yano, K., et al., *Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality*. J Exp Med, 2006. **203**(6): p. 1447-58.
38. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
39. Karkkainen, M.J., T. Makinen, and K. Alitalo, *Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(1): p. E2-5.
40. Matousek, J., *Ribonucleases and their antitumor activity*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2001. **129**(3): p. 175-91.
41. Reddi, K.K. and J.F. Holland, *Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(7): p. 2308-10.
42. Vihinen, P., et al., *Serum angiogenin levels predict treatment response in patients with stage IV melanoma*. Clin Exp Metastasis, 2007. **24**(7): p. 567-74.
43. Costanzi, J., et al., *Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: review of the preclinical and clinical data for ranpirnase*. Cancer Invest, 2005. **23**(7): p. 643-50.
44. Koten, B., et al., *RNase 7 contributes to the cutaneous defense against Enterococcus faecium*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6424.
45. Li, S. and G.F. Hu, *Angiogenin-mediated rRNA transcription in cancer and neurodegeneration*. Int J Biochem Mol Biol, 2010. **1**(1): p. 26-35.

46. Kunitz, M., *Isolation from Beef Pancreas of a Crystalline Protein Possessing Ribonuclease Activity*. Science, 1939. **90**(2327): p. 112-3.
47. Ribo, M., et al., *Purification of engineered human pancreatic ribonuclease*. Methods Enzymol, 2001. **341**: p. 221-34.
48. Beintema, J.J., et al., *The amino acid sequence of human pancreatic ribonuclease*. Anal Biochem, 1984. **136**(1): p. 48-64.
49. Fischer, S., et al., *Expression and localisation of vascular ribonucleases in endothelial cells*. Thromb Haemost, 2011. **105**(2): p. 345-55.
50. Weickmann, J.L., M. Elson, and D.G. Glitz, *Purification and characterization of human pancreatic ribonuclease*. Biochemistry, 1981. **20**(5): p. 1272-8.
51. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
52. Reineke, *Gentechnik: Grundlagen, Methoden und Anwendung*. 2004, S. 60: Verlag Eugen Ulmer GmbH und Co, Stuttgart.
53. Jansohn, *Gentechnische Methoden 5. Auflage*, 2012, S. 133: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
54. Baez, S., *An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy*. Microvasc Res, 1973. **5**(3): p. 384-94.
55. Ley, K., et al., *Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 669-75.
56. Forlow, S.B. and K. Ley, *Selectin-independent leukocyte rolling and adhesion in mice deficient in E-, P-, and L-selectin and ICAM-1*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(2): p. H634-41.
57. Long, D.S., et al., *Microviscometry reveals reduced blood viscosity and altered shear rate and shear stress profiles in microvessels after hemodilution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10060-5.
58. Smith, M.L., et al., *Near-wall micro-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo*. Biophys J, 2003. **85**(1): p. 637-45.
59. Welsch, *Lehrbuch Histologie*. 2014.
60. Frommhold, D., et al., *RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo*. Blood, 2010. **116**(5): p. 841-9.
61. Tsui, N.B., E.K. Ng, and Y.M. Lo, *Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma*. Clin Chem, 2002. **48**(10): p. 1647-53.
62. Fischer, S., et al., *Extracellular RNA promotes leukocyte recruitment in the vascular system by mobilising proinflammatory cytokines*. Thromb Haemost, 2012. **108**(4): p. 730-41.
63. Kleinert, E., et al., *Ribonuclease (RNase) Prolongs Survival of Grafts in Experimental Heart Transplantation*. J Am Heart Assoc, 2016. **5**(5).
64. Stewart, S., et al., *Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(11): p. 1710-20.
65. Chaparro, M., et al., *Effectiveness of infliximab after adalimumab failure in Crohn's disease*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(37): p. 5219-24.
66. Krintel, S.B., et al., *The frequency of anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis treated in routine care and the associations with adverse drug reactions and treatment failure*. Rheumatology (Oxford), 2013.

67. Lugerling, A., et al., *Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway.* Gastroenterology, 2001. **121**(5): p. 1145-57.
68. Fong, T.A., et al., *SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types.* Cancer Res, 1999. **59**(1): p. 99-106.
69. Shaheen, R.M., et al., *Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis.* Cancer Res, 1999. **59**(21): p. 5412-6.
70. Kieran, M.W., et al., *Phase I study of SU5416, a small molecule inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) in refractory pediatric central nervous system tumors.* Pediatr Blood Cancer, 2009. **52**(2): p. 169-76.
71. Sung, S.H., et al., *Blockade of vascular endothelial growth factor signaling ameliorates diabetic albuminuria in mice.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(11): p. 3093-104.

## 7.5. Veröffentlichungen

### Originalarbeiten:

Extrazellulär RNA promotes leukocyte recruitment in the vascular system by mobilising proinflammatory cytokines

Thrombosis and Haemostasis, 2012 October, 108(4):730-41

S. Fischer \*, **T. Grantzow** \*, J. I. Pagel , M. Tschernatsch , M. Sperandio, K. T. Preissner, E. Deindl

\* gleichwertige Erstautorenschaft

Ribonuclease (RNase) Prolongs Survival of Grafts in Experimental Heart Transplantation

Journal of the American Heart Association, zur Publikation akzeptiert 03/2016

E. Deindl, E. Kleinert, M. Langenmayer, B. Reichart, J. Kindermann, B. Griemert, A. Blutke, K. Troidl, T. Mayr, **T. Grantzow**, F. Noyan, J-M. Abicht, S. Fischer, K.T. Preissner, R. Wanke, S. Guethoff

### Kongressbeiträge:

25<sup>th</sup> Conference of the European Society for Microcirculation, Budapest, Ungarn, 26.-29. August 2008:

Role of extracellular RNA in Arteriogenesis

S. Fischer, **T. Grantzow**, J.I. Pagel, U. Schuber, K. T. Preissner, E. Deindl

Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research (ECCR), Nizza, Frankreich, 10.-12. Oktober 2008:

Extracellular RNA, a pro-inflammatory factor promoting arteriogenesis

**T. Grantzow**, S. Fischer, J.I. Pagel, U. Schuber, K.T. Preissner, E. Deindl

1<sup>st</sup> International Symposium- Infection of the Endothelium, Dresden, 27.-30. August 2009:

Role of extracellular RNA in inflammatory Processes

S. Fischer, **T. Grantzow**, M. Sperandio, J. Gansler, K.T. Preissner

XXIII. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 57<sup>th</sup> Annual SSC Meeting,  
23.-28. Juli 2011, ICC Kyoto, Kyoto, Japan

The role of the extracellular RNA/RNase system in cardiovascular disease an inflammation

K.T. Preissner, S. Fischer, C. Thoelen, **T. Grantzow**, N. Kral, J. Gansler, T. Weimer, M. Sperandio, E.  
Deindl, D. Sedding

## 8. Danksagungen

Frau PD Dr. rer. nat. Elisabeth Deindl danke ich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Überlassung des spannenden Themas, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die wertvolle Unterstützung während der gesamten Arbeit und nicht zuletzt für das unermüdliche Korrekturlesen in der Schlussphase.

Herrn Prof. Ulrich Pohl danke ich für die Aufnahme im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der LMU München und die Möglichkeit, an seinem Institut den experimentellen Teil der Arbeit durchführen zu können.

Herrn Prof. Markus Sperandio danke ich für die Einführung in das Entzündungsmodell des *M. cremaster* und die wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen in der Umsetzung der Versuche und bei der Auswertung der Ergebnisse.

Meinen promovierenden KollegInnen Frau Julia Borgolte, Frau Judith Pagel, Frau Teresa Trenkwalder und Herrn Phillip Dusswald danke ich für die gute Zusammenarbeit im Team.

Bei den technischen Assistenten des Institutes Frau Christine Csapo, Frau Mai Ping Wu und Frau Susanne Bierschenk bedanke ich mich für die wertvolle Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Herrn Prof. Klaus T. Preissner und Frau Dr. rer. nat. Silvia Fischer vom biochemischen Institut der Justus-Liebig-Universität Giessen danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit bei allen Fragen um das Feld der RNA/RNase-Forschung und bei der Erstellung der Veröffentlichung.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht und mich bei allem immer unterstützt haben.

## 9. Eidesstattliche Versicherung

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

**„Nachweis pro-inflammatorischer Eigenschaften extrazellulärer RNA *in vivo*“**

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

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

Altötting, den 02.02.2017

Tobias Grantzow