

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK I
KLINIK DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor:

Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Rekrutierungsmechanismen von Monozyten bei der sterilen Inflammation

DISSERTATION ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN AN DER
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von

Maria Katharina Köhne

aus Hamburg

2018

MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

BERICHTERSTATTER:

PROF. DR. MED. STEFFEN MASSBERG

MITBERICHTERSTATTER:

PROF. DR. GEORG ENDRES

PROF. DR. HELMUT OSTERMANN

PROF. DR. PETER BARTENSTEIN

BETREUUNG DURCH DEN PROMOVIERTEN MITARBEITER:

DR. MED. KONSTANTIN STARK

DEKAN:

PROF. DR. MED. DENT. REINHARD HICKEL

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG:

01.03.2018

'Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.'

Maria Curie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	vii
1 Abkürzungsverzeichnis	ix
2 Einleitung	1
3 Literaturübersicht	3
3.1 Die Pathophysiologie der sterilen Inflammation	3
3.2 Die Rolle von Leukozyten bei der sterilen Inflammation	6
3.2.1 Die Entstehung der myeloiden Zellreihe	6
3.2.2 Abläufe der Immunzellrekrutierung	8
3.2.3 Phasen der Extravasation	8
3.2.4 Mechanismen der Migration im Gewebe	11
3.3 Die Rolle von Monozyten bei der sterilen Inflammation	13
3.3.1 Das Mononukleäre Phagozytensystem	13
3.3.2 Monozytensubpopulationen	16
3.3.3 Die Rekrutierung von Monozyten bei der sterilen Inflammation	17
3.4 Die Rolle von Chemokinen bei der sterilen Inflammation	20
3.4.1 Funktion und Wirkung von Chemokinen bei der sterilen Inflammation	20
3.4.2 Funktion und Wirkung von Fractalkine bei der sterilen Inflammation	21
3.5 Mausmodelle der sterilen Inflammation	23
3.6 Problemstellungen	24

4	Material und Methoden	27
4.1	Versuchsplan	27
4.2	Versuchstiere	28
4.2.1	Zucht und Haltung	28
4.2.2	Wahl von Tierstamm und Genotyp	29
4.3	Präparation der Versuchstiere	30
4.3.1	Anästhesie	30
4.3.2	Legen eines Zugangs und Applikation von Farbstoffen	32
4.3.3	Präparation des Ohrmodells	36
4.4	Intravital Multiphoton Imaging	37
4.4.1	Das Zwei-Photonen-Mikroskop	37
4.4.2	Aufbau und Funktion des Zwei-Photonen-Mikroskops	40
4.4.3	Versuchsdurchführung: Der Laserschaden	42
4.5	Methoden der Datenauswertung	42
4.5.1	Erstellung von Videos aus den Rohdaten	42
4.5.2	Auswertung der Daten mithilfe von Volocity Tools	43
4.5.3	Statistische Auswertung	46
5	Ergebnisse	49
5.1	Mechanismen der Rekrutierung von Monozyten im interstitiellen Gewebe 49	
5.1.1	Rekrutierung von Monozyten ohne Differenzierung in Subpopu- lationen	49
5.1.2	Charakterisierung der Monozytensubpopulationen	53
5.1.3	Rekrutierung von Monozyten mit Differenzierung in zwei Sub- populationen	56
5.2	Auswirkung von Fractalkine auf die Rekrutierung von Monozyten . . .	58
5.2.1	Rekrutierung von Monozyten ohne Differenzierung in Subpopu- lationen	58
5.2.2	Rekrutierung von Monozyten mit Differenzierung in zwei Sub- populationen	62

6	Diskussion	67
6.1	Diskussion der Methoden	67
6.1.1	Wahl von Tierstamm und Versuchstier	67
6.1.2	Wahl des Ohrmodells	68
6.1.3	Methode der GFP-Fluoreszenzmessung	68
6.2	Diskussion der Ergebnisse	70
6.2.1	Das Migrationsverhalten von Monozyten bei der sterilen Inflammation	70
6.2.2	Das Migrationsverhalten von Monozytensubpopulationen bei der sterilen Inflammation	73
6.2.3	Die Rolle von Fractalkine bei der Rekrutierung von Monozyten	74
6.3	Ausblick	77
7	Zusammenfassung	79
8	Summary	81
	Literaturverzeichnis	xv
9	Danksagung	xxxi

Abbildungsverzeichnis

3.1	Initiierungsmechanismen der sterilen Inflammation	4
3.2	Differenzierungsschritte der myeloiden Zellreihe	7
3.3	Adhäsionskaskade der Leukozyten	10
3.4	Formen der interstitiellen Migration	12
3.5	Entwicklungsschritte des Mononukleären Phagozytensystems	14
3.6	Darstellung der vier Rekrutierungsphasen während einer Entzündung .	19
3.7	Die Wirkung von Fractalkine auf Fractalkine-Rezeptor-exprimierende Zellen	22
4.1	Platzierung des Femoraliskatheters mit Darstellung der einzelnen Operationsschritte	34
4.2	Darstellung des Ohrmodells	36
4.3	Darstellung der Ein-Photonen- und Zwei-Photonen-Fluoreszenzanregung	39
4.4	Schematischer Aufbau eines Zwei-Photonen Mikroskops	41
4.5	Schritte der Datenanalyse und Generierung	43
4.6	Darstellung eines Track-Plots	44
4.7	Darstellung von den Migrationsparametern Displacement rate und Meandering Index	45
5.1	Migrationsverhalten von Monozyten zu verschiedenen Zeitpunkten des sterilen Entzündungsgeschehens	51
5.2	Migrationsverhalten von Monozyten an unterschiedlichen Lokalisationen im Gewebe auf dem Weg zum Fokus der Verletzung	52

5.3	Darstellung der hell und schwach fluoreszierenden Zellpopulationen mittels eines Dotplots in Abhängigkeit von der maximalen Zellfluoreszenzintensität in heterozygoten CX3CR1-GFP-Mäusen	53
5.4	Darstellung von hell und schwach fluoreszierenden Monozyten unter dem 2-Photonen-Mikroskop	54
5.5	Darstellung der hell und schwach fluoreszierenden Zellpopulationen mittels eines Dotplots in Abhängigkeit von der maximalen Zellfluoreszenzintensität in homozygoten CX3CR1-GFP-Mäusen	55
5.6	Migrationsverhalten von inflammatorischen CX3CR1 ^{low} - und residenten CX3CR1 ^{high} -Monozyten im interstitiellen Gewebe	56
5.7	Ausrichtung der CX3CR1 ^{high} - und CX3CR1 ^{low} -Monozytenpopulation zum Laserschaden im Raum	57
5.8	Auswirkung von Fractalkine auf das Migrationsverhalten von Monozyten im Interstitium	59
5.9	Verschiedene Migrationszonen von Monozyten im interstitiellen Gewebe auf dem Weg zu der Gewebeverletzung	61
5.10	Anzahl der rekrutierten Zellen in homozygoten und heterozygoten CX3CR1-GFP-Tieren über die Zeit	63
5.11	Auswirkung von Fractalkine auf das Migrationsverhalten der CX3CR1 ^{high} - und CX3CR1 ^{low} -Monozytensubpopulation im Interstitium	66

Tabellenverzeichnis

4.1	Allgemeiner Versuchsplan, Laserverletzung am Ohrmodell	27
4.2	Versuchsplan Auswertung mit Volocity, Heterozygote Tiere	27
4.3	Versuchsplan Auswertung mit Volocity, Homozygote Tiere	27

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad celcius
3D	Dreidimensional
A.	Arteria (lat.)
AAALAC	Association for Assessment and Accreditation of Laboratory animal care International
Abb.	Abbildung
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein
AK	Antikörper
APC	Antigen-presenting-cell
BM	Basalmembran
bspw.	Beispielsweise
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CCL	C-C-motif-chemokine-ligand
CCR	C-C-motif-chemokine-receptor
CD	Cluster-of-differentiation
cm	Zentimeter
CSF1	Colony-stimulating-factor
CCL	C-C-motif-chemokine-ligand
CCR	C-C-motif-chemokin-rezeptor
CXCL	C-X-C-motif-chemokine-ligand
CX3CL1	Fractalkine
CX3CR1	Fractalkine-Rezeptor
CX3CR1-GFP	Fractalkine-Mausstamm
CXCR1	C-X-C-motif-chemokine rezeptor
DAMP	Damage-associated-molecular-pattern

DNA	Deoxyribonucleic acid
DC	Dendritic-cell
d.h.	Das heißt
Fa.	Firma
FELASA	Federation of Laboratory Animal Science Associations
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
g	Gramm
GFP	Green-fluorescent-protein
GMP	Granulozyt-monozyt-progenitor
GR1	Myeloid-differentiation-antigen-Gr-1
h	Stunde
HEPA	High-Efficiency-Particulate-Air
HMGB1	High-mobility-group-box 1
HSC	Hematopoietic-stem-cell
ICAM-1	Intercellular-adhesion-molecule 1
IL	Interkeukin
i.p	intraperitoneal
I.v.	intravenös
IVC	Individually-ventilated-cages
IVM	Intravital-Mikroskopie
JAM	Junctional-adhesion-molecule
kg	Kilogramm
ki	knock-in
KM	Knochenmark
LFA-1	Lymphocyte-function-associated-antigen 1
LPS	Lipopolysaccharide
LY6C	Lymphocyte-antigen 6-complex
M.	Musculus (lat.)
Mac-1	Macrophage-1antigen

MCP-1	Monocyte-chemoattractant-protein 1
MDP	Monocyte and dendritic cell-progenitor
mg	Milligramm
MI	Index für Zielgerichtetheit (Meandering Index)
min	Minuten
mind.	Mindestens
mL	Milliliter
mM	millimolar
mm/s	Millimeter pro Sekunde
MP	Myeloid-progenitor
MPS	Mononukleäres-phagozyten-system
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
N.	Nervus (lat.)
NaCl	Natriumchlorid
NIR	Nod-like-rezeptor
NK-cell	Natural-killer-cell
NOD-like-Rezeptor	Nucleotide-binding oligomerization domain receptor
PAMP	Pattern associated molecular pattern
PSGL1	P-selektin-glykoprotein-ligand 1
s	Sekunde
s.c.	Subcutan
SD	Standardabweichung (Standard derivation)
SPF	Spezifisch-pathogen-frei
Tab.	Tabelle
TACE	TNF-alpha-converting-enzyme
TGF- β	Transforming-growth-factor-beta
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha

TRITC-Dextran	Tetramethylrhodamine-isothiocyanate-dextran
V.	Vena (lat.)
VCAM-1	Vascular-cell-adhesion-molecule 1
vs.	versus
wt	wildtyp
YFP	Yellow-fluorescent-protein
z.B.	Zum Beispiel
μm	Mikrometer
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

2 Einleitung

Die sterile Entzündung unterscheidet sich von der infekt-assoziierten Entzündung in ihren zellulären Abläufen und Mechanismen und ist Ausgangspunkt für die Pathophysiologie vieler Erkrankungen (1). Nach der „Gefahren-Hypothese“ von Polly Matzinger registriert das Immunsystem eine Bedrohung für den Organismus nicht nur in Form von infektiösen körperfremden Reizen, sondern auch durch sterile endogene Stimuli, wie sie infolge von unphysiologischem Zelltod, Zellstress oder bei Gewebeschädigung freiwerden (2). Über die Interaktion beteiligter Immunzellen und deren Rekrutierung in interstitielles Gewebe ist bezüglich der sterilen Entzündung bisher wenig bekannt. Monozyten beinhalten bei der infekt-assoziierten Entzündung eine wichtige Funktion und unterscheiden sich bezüglich des Auftretens ihrer Subpopulationen. Die Rolle von Monozyten und deren Subpopulationen bei der sterilen Entzündung ist dahingegen kaum erforscht. Auch die einflussnehmenden Faktoren bei der Rekrutierung und Steuerung von Monozyten sind bei der sterilen Inflammation nicht vollends verstanden. Diese Arbeit fokussiert die zellulären Abläufe der sterilen Entzündung in der Mikrozirkulation der Haut, die mittels 2-Photonen-Mikroskopie *in vivo* visualisiert werden sollen. Mithilfe transgener Mäuse soll die Rekrutierung und interstitielle Migration von zwei Monozytensubpopulationen am Modell der sterilen Inflammation erforscht werden. Zusätzlich soll die regulatorische Auswirkung des Chemokins Fractalkine in diesem Kontext untersucht werden. Die ermittelten Daten können Anhaltspunkte für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte bezüglich spezifischer Krankheitsbilder, wie dem Reperfusionsschaden/Ischämie, der Atherosklerose oder auch der Abstoßungsreaktion von Transplantaten, sein.

3 Literaturübersicht

3.1 Die Pathophysiologie der sterilen Inflammation

Unter einer Entzündung im Allgemeinen wird die Reaktion des Immunsystems auf eine endogen oder exogen bedingte Infektion oder Verletzung gesehen, die dazu dient, den Organismus gegen pathogene Faktoren zu schützen und den Wiederaufbau des verwundeten Gewebes zu gewährleisten (3)(4). Nach der „Gefahren-Hypothese“ von Matzinger et al. können auch Gewebsschaden, Zellstress oder der Zelltod ohne das Vorhandensein eines Erregers eine Immunantwort auslösen. Demnach unterscheidet das Immunsystem nicht zwischen „eigen“ und „fremd“, sondern wird durch die Registrierung von bestimmten Signalen, sogenannten „Gefahren-Signalen“, welche entweder durch die Registrierung von Pathogenen oder bei Gewebeschaden und Zellstress freigesetzt werden, definiert (2)(5).

Eine Infektion kann auf einem sterilen oder infektiösen erregerbedingten Weg geschehen. Die sterile Entzündung wird durch eine Schädigung mit dem nekrotischen Untergang von Gewebe ausgelöst. Sie lässt sich nicht durch die Anwesenheit von Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien oder Viren, begründen (1). Beide Entzündungsformen ähneln sich in ihrem pathophysiologischen Ablauf und nutzen ähnliche Mechanismen und Rezeptoren. Im Wesentlichen kennzeichnet beide Formen die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten, wobei sie sich in der Produktion von entzündungsstimulierenden Zytokinen, wie regulatorischen Chemokinen und deren spezifischen Wirkung auf Rezeptoren, unterscheiden (6).

Mögliche Ursachen für eine sterile Entzündung sind chemische oder physikali-

sche Traumata, wie bspw. Verbrennungen. Auch ischämisch bedingte Schäden infolge einer Minderperfusion von Gewebe, wie sie beim Herzinfarkt oder Schlaganfall auftreten, können der Auslöser eines sterilen Entzündungsgeschehens sein. Weiterhin ist die sterile Entzündung Ursache vieler autoimmun bedingter Erkrankungen. Dies

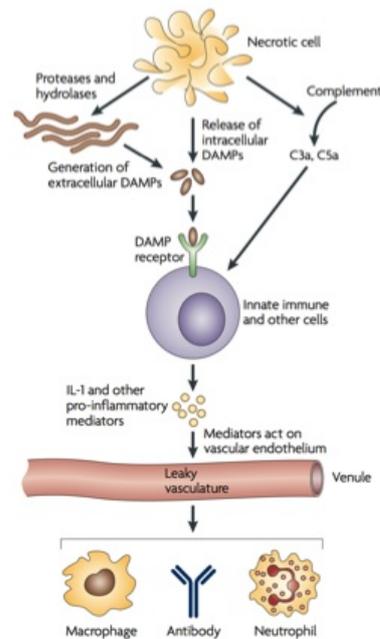


Abbildung 3.1: Initiierungsmechanismen der sterilen Inflammation

Quelle: Kono et al, 2008, S. 283

Der nekrotische Zelltod führt zur Freisetzung von DAMPs, die durch PRRs, die sich auf der Oberfläche von Immunzellen befinden, registriert werden. Diese Registrierung von Entzündungsmediatoren führt zu der Produktion von Zytokinen wie IL-1, die eine Entzündungskaskade in Gang setzen, wodurch sich die Permeabilität der Gefäße für Leukozyten erhöht.

liegt in der Tatsache begründet, dass es bei der überschießenden Immunantwort nicht nur zu der Abräumung der nekrotischen, sondern auch zu einer Schädigung der gesunden Gewebsanteile durch die Freisetzung von hydrolytischen, oxidativen und porenbildenden Molekülen aus den Granula neutrophiler Granulozyten kommt, wodurch wiederum ein Entzündungsreiz gesetzt wird (1). Somit kann eine sterile Entzündung chronifizieren und zur Immunpathologie von Autoimmunerkrankungen, wie bspw. der Gicht, beitragen. Der nekrotische Zelltod als Ursache für die sterile Entzündung definiert sich durch den Verlust der Zellintegrität mit dem unkontrol-

lierten Freiwerden von Zellbestandteilen, welche in Form von „Gefahren-Signalen“ die Entzündungskaskade auslösen. Diese freiwerdenden Zellbestandteile werden als „damage associated molecular patterns“ (DAMPs) bezeichnet und liegen unter physiologischen Bedingungen meist intrazellulär vor. In diesem Zustand sind sie durch das Immunsystem nicht registrierbar. Kommt es zu einer sterilen Entzündung mit Gewebsschädigung und unphysiologischem Zelltod, werden diese Bestandteile unkontrolliert in den extrazellulären Raum freigesetzt und initiieren eine spezifische Entzündungskaskade (2)(7). Im Gegensatz hierzu wird die erregerbedingte Entzündung durch Bestandteile von Mikroorganismen initiiert, den sogenannten „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) (8)(9).

Es gibt eine große Bandbreite an sterilen Entzündungsmediatoren. Hierbei kann man, ausgehend von dem Ort der Entstehung und den Mechanismus der Wirkung, allgemein zwei Klassen von DAMPs unterscheiden (2). Die eine Klasse von DAMPs liegt, wie in dem zuvor genannten Beispiel unter physiologischen Umständen intrazellulär vor und ist zellulären Ursprungs. Bei nekrotischen Zelltod infolge von sterilen Entzündungsreizen stimulieren die freiwerdenden Moleküle Zellen des angeborenen Immunsystems über die Wirkung an spezifischen Rezeptoren (siehe **Abb. 3.1**). Ein gut untersuchtes intrazelluläres DAMP, das in vielen sterilen Entzündungen eine wichtige Rolle spielt, ist high mobility group box 1 (HMGB1). Dieses Protein ist unter physiologischen Umständen an die DNA gebunden und erfüllt regulatorische Funktionen, wie die Stabilisierung von Nukleosomen (10). Die andere Klasse von DAMPs fungiert auf einem eher indirekten Weg. Diese Bestandteile können Proteasen oder Hydrolasen sein, welche beim nekrotischen Zelltod freigesetzt werden und extrazelluläre Matrixbestandteile, wie Hyaluronsäure, spalten. Die dabei entstehenden Spaltprodukte wiederum können dann als extrazellulär generierte DAMPs an Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems binden und wie die intrazellulären DAMPs eine spezifische Entzündungskaskade in Gang setzen (siehe **Abb. 3.1**) (2)(1). Es gibt viele weitere Beispiele für das Wirken von extrazellulären und intrazellulären DAMPs sowie anderer entzündungsstimulierender

Faktoren, wie bestimmte Zytokine. Das Zytokin tumor nekrosis faktor α (TNF α) ist bpsw. an der Entstehung vieler Entzündungen beteiligt und kann ein steriles Entzündungsgeschehen auslösen (8).

In einer mikrobiell induzierten Entzündung werden Anteile von pathogenen Strukturen von spezifischen Rezeptoren, sogenannten „pattern recognition receptors“ (PRRs), gebunden und aktivieren hierüber Leukozyten zur Antigenpräsentation für Lymphozyten (9). Weitergehende Experimente haben ergeben, dass auch DAMPs an einige dieser Rezeptoren binden können, die sich vor allem auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems befinden, um ihre Zielzellen zu aktivieren. Diese Aktivierung von Leukozyten führt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wie Interleukin 1 (IL-1), was eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität zur Folge hat und wodurch weitere Immunzellen durch gerichtete Migration zum Ort der Entzündung rekrutiert werden (siehe **Kapitel 3.2**) (2). Es gibt verschiedene Rezeptorklassen von PRRs, die sowohl intra- als auch extrazellulär vorliegen können. Die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sind vor allem auf der Zelloberfläche lokalisierte transmembranöse Strukturen, wohingegen die NOD-like-Rezeptoren (NLRs) als lösliche Proteine im Zytosol vorliegen (11)(12)(2).

3.2 Die Rolle von Leukozyten bei der sterilen Inflammation

3.2.1 Die Entstehung der myeloiden Zellreihe

Intensive Forschung innerhalb der letzten Jahrzehnte konnte das Verständnis bezüglich der Herkunft und Differenzierung von Leukozyten sowie der Komplexität und Heterogenität von myeloiden Zellen vertiefen. Infolgedessen wurden mehrere Subpopulationen charakterisiert, die alle Teil des angeborenen Immunsystems sind, sich jedoch in ihren einzelnen Funktionen unterscheiden. Die Entstehung der myeloiden Zellen beginnt mit der Ursprungsstammzelle im Knochenmark, welche sich zu der Vorläuferzelle der myeloiden und lymphatischen Stammzelle differenziert. Aus der myeloiden Stammzelle geht über mehrere Entwicklungszwischenschritte nach der Abspaltung der

Vorläuferzellen für Erythrozyten und Thrombozyten schließlich eine gemeinsame Vorläuferzelle für Blutleukozyten, die Granulozyten-Monozyten Progenitorzelle (GMP), hervor. Aus dieser Vorläuferzelle entwickeln sich die neutrophilen Granulozyten und über einen weiteren Zwischenschritt die Monozyten als Vorläuferzellen des mononukleären Phagozyten-Systems (MPS). Sowohl die Monozyten als auch die neutrophilen Granulozyten werden jeweils als zirkulierende Leukozyten aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf abgegeben (siehe **Abb.3.2**). Einige Zellen des MPS können sich auch direkt aus der hämatopoetischen Stammzelle differenzieren. Einen genaueren Einblick in die Funktion und Entstehung von Zellen des MPS gibt Kapitel 3.3.1 (13).

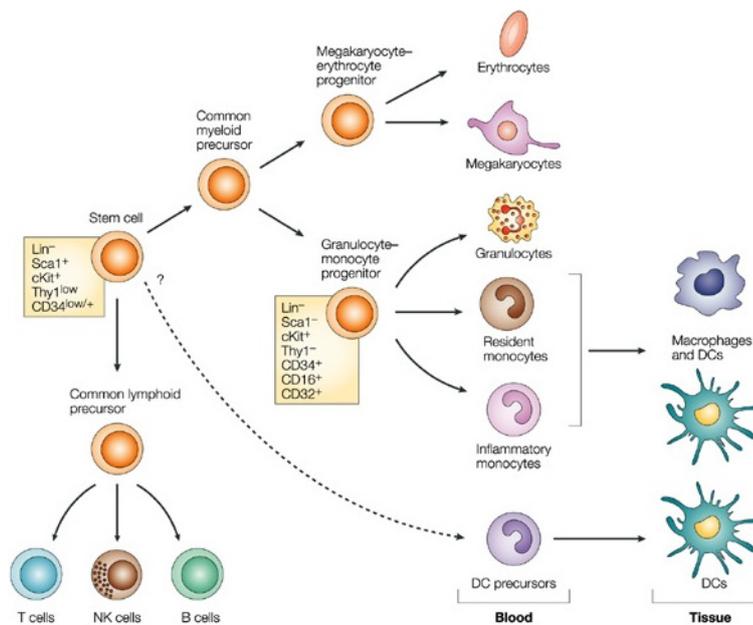


Abbildung 3.2: Differenzierungsschritte der myeloiden Zellreihe

Quelle: Imhof et al, 2004, S. 233

Darstellung der Hämatopoese im Knochenmark. Aus einer gemeinsamen Ursprungsstammzelle entwickelt sich die myeloide (common myeloid precursor) und lymphoide (common lymphoid precursor) Vorläuferstammzelle. Über mehrere Differenzierungsschritte gehen aus der myeloiden Stammzelle die einzelnen Blutzellpopulationen hervor.

3.2.2 Abläufe der Immunzellrekrutierung

Die schnelle Mobilisation von Leukozyten aus dem Blutkreislauf und deren gezielte Fortbewegung im Gewebe sind von fundamentaler Bedeutung für eine effiziente Immunantwort auf einen Entzündungsreiz. Wie in **Kapitel 3.1** erwähnt, werden als Reaktion auf einen sterilen Entzündungsreiz pro-inflammatorische Zytokine produziert, die eine Entzündungskaskade initiieren, wodurch Leukozyten aus postkapillären Venolen in das Gewebe rekrutiert werden. Dies geschieht in drei grundlegenden Schritten. In einem ersten Schritt werden Leukozyten innerhalb des Gefäßes rekrutiert, um dann über einige Zwischenschritte fest an einem aktivierten Endothel zu binden. Der zweite Schritt beinhaltet die Transmigration durch die Wand des venösen Gefäßes in das Interstitium, von wo aus die Leukozyten in einem dritten Schritt durch das interstitielle Gewebe zum Fokus des Entzündungsgeschehens migrieren (14).

3.2.3 Phasen der Extravasation

Die Transmigration von Leukozyten durch die Gefäßwand in den interstitiellen Raum stellt einen wichtigen Schritt bei der Immunzellrekrutierung dar (14). Zuvor müssen die Zellen jedoch fest an die luminale Seite des Gefäßes binden, um durch das Endothel migrieren zu können. Die infolge einer sterilen Entzündung freigesetzten pro-inflammatorischen Zytokine, wie tumor necrosis factor (TNF) und Interleukin-1 β (IL-1 β), oder die bei einer nicht-sterilen Entzündung freiwerdenden Endotoxine von Bakterien initiieren die Adhäsionskaskade (siehe **Abb. 3.3**) (15).

In einem ersten Schritt beginnen die Leukozyten Selectin-vermittelt entlang der luminalen Seite des Endothels zu rollen. Selectine sind transmembranöse Glykoproteine und gehören zur Klasse der Zelladhäsionsmoleküle (16). Die Leukozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche Selectine, wie L-Selectin. E- und P-Selectin werden wiederum vor allem vom aktivierten Endothel exprimiert. Durch die Interaktion der Selectine mit P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL1) und anderen glykosylierten Liganden, die auf der Oberfläche von Leukozyten oder dem aktivierten Endothel vorzufinden sind, kommt es zu einer lockeren Bindung an die Gefäßwand. Zudem

interagieren die Zellen auch untereinander über die Bindung von Selectinen an ihre Liganden (15)(17).

In einem weiteren Schritt wird das Endothel Chemokin-vermittelt aktiviert. Infolgedessen werden vermehrt Adhäsionsmoleküle, wie vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) oder intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), auf der luminalen Seite des Endothels an die Zelloberfläche mobilisiert (18)(15). Zudem aktivieren die Chemokine Integrine und bewirken somit eine nachfolgende feste Bindung der Leukozyten über die zuvor genannten Adhäsionsmoleküle an das Endothel. Integrine fungieren hauptsächlich als transmembranöse Adhäsionsrezeptoren und vermitteln die Bindung von Zellen an extrazelluläre Matrixproteine oder auch die Adhäsion von Zellen untereinander (19). Die von den Leukozyten exprimierten β 1- und β 2-Integrine, wie bspw. Mac-1 und LFA-1, binden hierbei an ihre Liganden am aktivierten Endothel (20).

Nach der festen Adhäsion führt ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Chemokin-vermittelten Vorgängen zu einer kriechenden Fortbewegung der Zellen entlang des Endothels (21). Hierbei kommt es durch intrazelluläre Signalkaskaden zur Bindung von aktivierten Integrinen an Adhäsionsmoleküle im vorderen und hinteren Teil der Zelle und somit zu einer Reorganisation der Aktinfasern des Zytoskeletts der Leukozyten, die in einer phänotypischen Veränderung der Zellen resultiert (13). Die Zelle verändert sich dabei von einer annähernd sphärischen zu einer abgeflachteren planen Form. Des Weiteren kommt es zu einer Polarisierung der Zelle mit einem flacheren vorderen Teil, genannt Lamellopodium, und einem kontraktile hinteren Anteil, genannt Uropod (22)(23). Diese Formveränderung der Zellen vereinfacht nach der festen Adhäsion die Migration durch die schmalen Spalträume des Endothels (14).

In einem weiterführenden Schritt migrieren die Zellen entlang eines Chemokin-Gradienten transendothelial durch die Gefäßwand. Hierbei muss von luminal nach apikal eine Schicht, bestehend aus Endothelzellen, Basalmembran, Perizyten, perivaskulären Makrophagen und Mastzellen, überwunden werden. Dies kann entweder

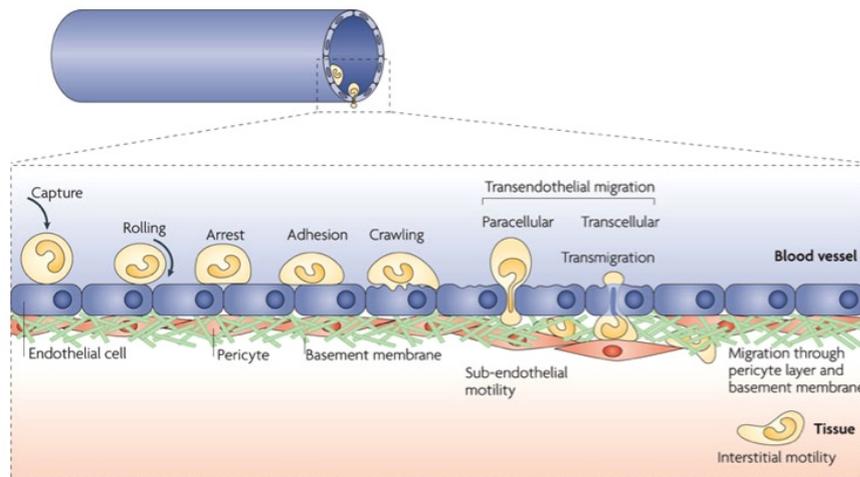


Abbildung 3.3: Adhäsionskaskade der Leukozyten

Quelle: Nourshargh et al, 2010, S. 367

Darstellung der Adhäsionskaskade anhand eines intraluminalen Ausschnitts einer postkapillären Venole. In einem ersten Schritt werden die Leukozyten Selektin-vermittelt eingefangen (Capture) und beginnen entlang des Endothels zu rollen (Rolling). Anschließend kommt es zu der Chemokin-vermittelten Aktivierung des Endothels, und die Zellen gehen über die Wirkung von Integrinen eine stärkere Bindung mit dem Endothel ein (Arrest), bis sie schließlich fest daran binden (Adhesion). In einem nächsten Schritt beginnt die Zelle entlang des Gefäßes zu kriechen (Crawling) und migriert trans- oder parazellulär durch die Gefäßwand in das Gewebe (Transendothelial migration).

parazellulär durch die Zwischenräume der Endothelzellen oder transzellulär durch die Endothelzellen geschehen (24)(25). Die Transmigration erfolgt jedoch vor allem parazellulär (14). Die Gefäßbarriere ist dabei so konstruiert, dass sie bestimmte Domänen mit einer erhöhten Durchlässigkeit für Leukozyten aufweist. Diese Bereiche sind mit einer geringeren Dichte an Matrixproteinen ausgestattet, sodass ein Hindurchtreten der Leukozyten an diesen Stellen erleichtert ist (26). Zusätzlich findet dort eine vermehrte Interaktion zwischen Integrinen und Adhäsionsproteinen statt, sodass eine feste Adhäsion an das Endothel und somit eine transendotheliale Migration erleichtert ist (14). Um die schmalen Spalträume zwischen den Endothelzellen überwinden zu können, müssen hierfür einige transmembranöse Endothelverbindungen, sogenannte „endothelial junctions“, gelöst werden, welche sowohl die Zellintegrität erhalten als auch die vaskuläre Permeabilität regulieren (14)(27). Zudem erleichtern Proteasen, die auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert werden, den Durchtritt der Zellen

durch die Gefäßbarriere, indem bestimmte Matrixkomponenten gespalten werden (15).

3.2.4 Mechanismen der Migration im Gewebe

Nach der Extravasation müssen die Immunzellen zunächst einen Weg durch das Gewebe zum Geschehen des sterilen Reizes finden, um vor Ort ihre Funktion erfüllen zu können. Die Wanderung von Immunzellen durch das Gewebe wird interstitielle Migration genannt und ist essenziell für den Ablauf einer Entzündungsreaktion (28).

Es gibt verschiedene Formen der interstitiellen Fortbewegung (29). Die interstitielle Migration von Leukozyten kann durch einen amöboiden Bewegungsablauf oder durch die Interaktion von Adhäsionsrezeptoren, wie Integrinen, mit ihren Liganden geschehen (29). Die amöboide Bewegung kommt durch eine sich zyklisch wiederholende Formveränderung der Zelle, genannt Polarisierung, und der aktiven Betätigung kontraktiler Fasern in bestimmten Regionen der Zelle zustande (30)(29). Im Gegensatz zu anderen Migrationsformen können die Zellen hierbei sehr schnell (5-25 $\mu\text{m}/\text{min}$) und mittels weniger adhäsiver Interaktionen durch das Gewebe wandern. Zudem bleibt die Gewebestruktur bei dieser Fortbewegungsart weitgehend intakt. Die Leukozyten können somit schnell und effektiv auf spezifische Reize reagieren (31).

Die Bewegung einer Zelle im Gewebe kann entweder in eine bestimmte Richtung tendierend (gerichtet) oder zufällig ohne eine ausschlaggebende Fokussierung (ungerichtet) erfolgen (29). Die ungerichtete Migration von Leukozyten wird Haptokinese genannt. Die Zellen orientieren sich dabei anhand von bestimmten Leitstrukturen im Gewebe (29). Man unterscheidet zwischen der drei- und zweidimensionalen Haptokinese (siehe **Abb. 3.4 a und b**) (28). Entlang von zweidimensionalen Leitstrukturen, wie bspw. der Innenoberfläche von Gefäßen, der Pleura oder dem Peritoneum, migrieren die Leukozyten vor allem adhäsionsabhängig über die Interaktion von Zelladhäsionsrezeptoren mit ihren Liganden (28). Ein Netzwerk aus extrazellulären Fasern, wie es im interstitiellen Gewebe vorliegt, stellt im Gegensatz dazu eine

dreidimensionale Oberfläche dar. In einem solchen Medium migrieren die Zellen vor allem amöboid, wie zuvor beschrieben (28)(29). Folgen die Zellen im Gewebe jedoch einer Sequenz unterschiedlicher Gradienten aus Chemokinen und Mediatoren der sterilen Inflammation, ist die Migration nicht weiter zufällig. Die gerichtete Migration von Leukozyten entlang eines Gradienten von immobilisierten, strukturgebundenen chemotaktischen Wirkstoffen wird Haptotaxis genannt (siehe **Abb. 3.4 d**). Folgen die Zellen im Gegensatz dazu einem Gradienten aus Botenstoffen, die gelöst und ungebunden im Gewebe vorliegen, wie bspw. bestimmten Chemokinen, spricht man von Chemotaxis (siehe **Abb. 3.4 c**). Generell erfolgt die Migration in Richtung eines bestimmten Chemokins so lange, wie es unbesetzte Rezeptoren gibt. Ist die Sättigungskonzentration mit Chemokinen erreicht, orientiert sich die Zelle erneut anhand von chemotaktischen Signalen im Gewebe (32).

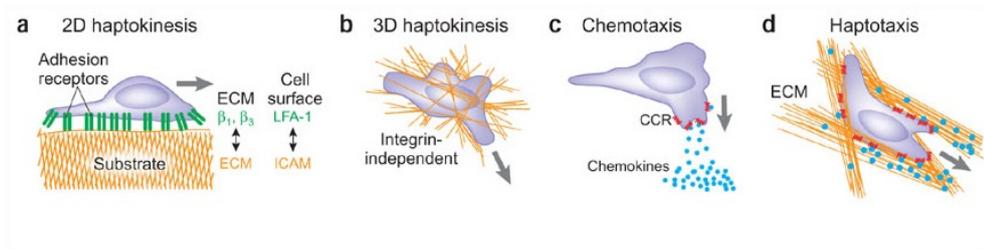


Abbildung 3.4: Formen der interstitiellen Migration

Quelle: Friedl et al, 2008, S. 962

Darstellung der unterschiedlichen Migrationsformen von Leukozyten in Abhängigkeit von den Umgebungsfaktoren a) 2-D-Haptokinese b) 3-D-Haptokinese c) Chemotaxis d) Haptotaxis

Die Geschwindigkeit von Leukozyten ist neben der regulatorischen Einwirkung durch chemotaktische Wirkstoffe und der Art des Gewebes auch durch zellspezifische Funktionen und Interaktionen beeinflusst. Beispielsweise kommt es zu einer Verringerung der Zellgeschwindigkeit durch die Interaktion mit anderen Zellen (29). Zusammenfassend ist die Geschwindigkeit einer Zelle im interstitiellen Gewebe von vielen Faktoren beeinflusst und nicht kontinuierlich gleichbleibend. Generell können drei kinetische Grundstadien unterschieden werden, die alle während der Migration der Zellen zum Infektfokus auftreten können. Die schnelle Migration ($5\text{-}25\mu\text{m}/\text{min}$), die

eingeschränkte Geschwindigkeit ($2-5\mu\text{m}/\text{min}$) und der adhäsive Arrest der Zelle, bei der es zu einem Stillstand der Zellbewegung durch adhäsionsbedingte Interaktionen kommt (29)(33).

3.3 Die Rolle von Monozyten bei der sterilen Inflammation

3.3.1 Das Mononukleäre Phagozytensystem

Das Mononukleäre Phagozytensystem (MPS) ist nach Van Furths Postulation aus dem Jahr 1968 als eine Gruppe von Zellpopulationen myeloiden Ursprungs definiert, denen ein einzelner mononukleärer Zellkern gemein ist und die sich von den polymorphonukleären Granulozyten abheben. Das MPS beinhaltet drei große Zellpopulationen: die Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs), welche durch das Zusammenspiel ihrer unterschiedlichen Funktionen sowohl als Teil des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase unter physiologischen und inflammatorischen Bedingungen haben. Da diese Zelltypen in vielen pathologischen Prozessen einen entscheidenden Beitrag leisten, ist es von besonderem Interesse, das Zusammenspiel und die Funktion der unterschiedlichen Populationen genauer zu erforschen, um gezielt in die Abläufe der Immunzellrekrutierung eingreifen zu können (34)(35). Ursprünglich wurde das MPS als eine Population von Zellen definiert, die ausschließlich monozytären Ursprungs sind und sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle im Knochenmark entwickeln. Neuere Arbeiten konnten aber zeigen, dass das MPS nicht als eine einfache Familie von Zellen monozytären Ursprungs definiert werden kann, sondern ein komplexes zelluläres System darstellt, da hämatopoetische Stammzellen (HSCs) auch ohne eine vorherige Differenzierung das Knochenmark verlassen können, um im extramedullären Gewebe zu reifen und zu differenzieren (36)(34). Die Entwicklung aller Zellpopulationen des MPS beginnt mit der HSC und deren Differenzierung zu der Stammzelle der myeloiden Zellreihe (MP) (siehe **Abb. 3.5**) (13).

Monozyten entwickeln sich unter der Steuerung von Wachstumsfaktoren von der HSC im Knochenmark über verschiedene Zwischenstufen zu einer gemeinsamen Vorläuferzelle für DCs und einigen Subpopulationen von Makrophagen, der MDP (monocyte and dendritic cell progenitor) Zelle. Diese Vorläuferzellen haben die Eigenschaft verloren, sich zu granulozytären Zellen zu differenzieren (37). Die MDP-Zelle differenziert sich über einen weiteren Zwischenschritt zu Monozyten, die an das Blut abgegeben werden und dort ein bis drei Tage zirkulieren (siehe **Abb. 3.5**) (38). Sie können bei Bedarf den Blutstrom verlassen und in das Gewebe

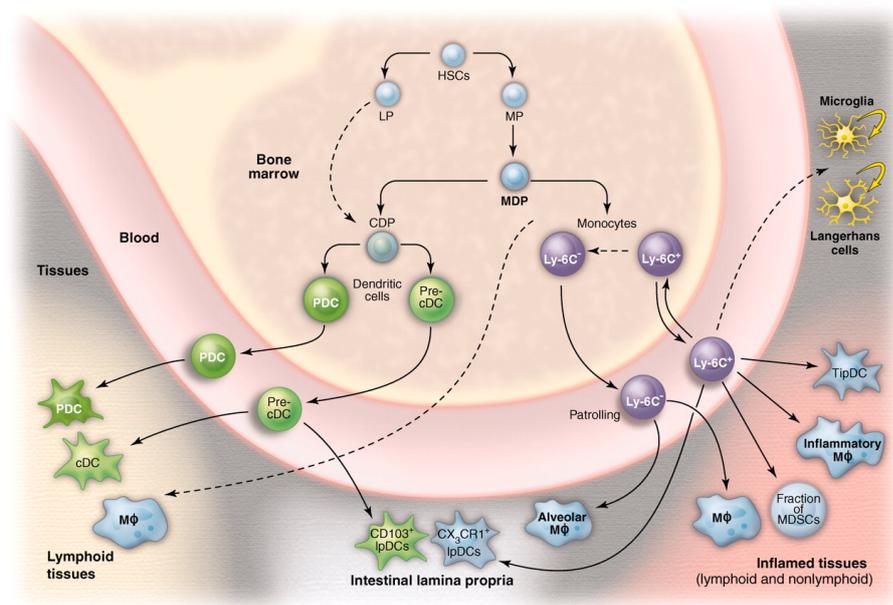


Abbildung 3.5: Entwicklungsschritte des Mononukleären Phagozytensystems

Quelle: Geissmann et al, 2010, S. 657

Darstellung der verschiedenen Differenzierungsschritte von Vorläuferzellen des MPS im Knochenmark. Über verschiedene Zwischenschritte geht aus der Ursprungszelle der HSC die MDP-Zelle hervor, aus der sich die Populationen des MPS auf unterschiedlichen Wegen differenzieren.

migrieren, um dort als gewebständige Makrophagen zu fungieren oder zu DCs zu differenzieren. In der Maus haben die Monozyten einen Anteil von vier Prozent aller kernhaltigen Zellen im Blut, im Menschen weisen sie im Gegensatz dazu einen Anteil von zehn Prozent auf (39)(34). Es gibt zwei große Subpopulationen von Monozyten, auf die im nachfolgenden Kapitel ausführlich eingegangen wird. Monozyten und

Makrophagen sind eng verwandt und stellen wichtige Effektoren und Regulatoren der Entzündung sowie des angeborenen Immunsystems dar (38). Monozyten können proinflammatorische Zytokine sezernieren, um Immunzellen zu rekrutieren und Toxine sowie Zellbestandteile phagozytieren. Sie können unter bestimmten Bedingungen den Blutstrom verlassen und sich zu DCs oder Makrophagen differenzieren. Somit sind sie Teil des erworbenen und angeborenen Immunsystems. Unter physiologisch homöostatischen Bedingungen, dem sogenannten „steady-state“, tragen zirkulierende Monozyten nur wenig zu der Differenzierung von Gewebsmakrophagen und Dendritischen Zellen bei. Sie können jedoch den Blutstrom verlassen und für mehrere Wochen im Gewebe als residente Zellen verweilen (40)(34). Kommt es zu einer Entzündungsreaktion, werden Monozyten in hoher Anzahl aus der Zirkulation in das betroffene Gewebe rekrutiert und haben einen hohen Anteil an der Differenzierung zu antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und aktiven Gewebsmakrophagen (34).

Makrophagen sind in lymphoiden oder nicht lymphoiden Gewebe residierende Zellen und bei der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase involviert (37). Diese Zellen des MPS beinhalten viele Subpopulationen und können grob anhand ihrer anatomischen Lage und ihres Phänotyps charakterisiert werden. Zudem sind sie als Gewebsmakrophagen zur Phagozytose und Sequestrierung von Pathogenen befähigt und regulieren die Aktivierung sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems (41)(42). Makrophagen sind unter anderem auch unter physiologischen Bedingungen in der Dermis der Haut vorhanden. Ein Pool von Makrophagen entsteht aus embryonalen Vorläuferzellen bereits vor der Geburt, während sich ein anderer Pool von Makrophagen nach der Geburt aus zirkulierenden Blutmonozyten differenziert (35).

Dendritische Zellen sind eine spezialisierte und komplexe Untergruppe des MPS, die Antigene prozessieren und präsentieren können und somit auch dem angeborenen Immunsystem angehören. Sie haben ebenfalls eine ausgeprägte Fähigkeit zur Phagozytose und können Zytokine ausschütten, um mit anderen Zellen des Immunsystems

zu kooperieren. Als APCs können sie entweder direkt aus myeloiden Vorläuferzellen, welche während der Embryonalperiode in das Gewebe ausgewandert sind, generiert werden oder sich aus zirkulierenden Vorläuferzellen im Blut differenzieren, zu denen die Monozyten und spezielle dendritische Vorläuferzellen gehören (34)(35). Der Anteil an DCs, der unter physiologischen Bedingungen aus Blutmonozyten generiert wird, ist jedoch vergleichsweise gering (35)(40).

3.3.2 Monozytensubpopulationen

Die Heterogenität bzgl. Funktion und Phänotyp von Blutmonozyten wurde erstmals von einer Anzahl von unabhängigen Forschungsgruppen in den frühen 1980er Jahren beschrieben. Demnach sind Monozyten eine heterogene Gruppe von Blutleukozyten, welche mehrere Subpopulationen beinhaltet (43). Die Unterscheidung von zwei großen Monozytensubpopulationen im peripheren humanen Blut, welche sich morphologisch und funktionell unterscheiden, gelang erstmals einem Forschungsteam in dem Jahr 1989 anhand des unterschiedlichen Expressionsmusters der Oberflächenmarker CD14 und CD16 (44)(45).

Im Menschen lassen sich nach aktuellem Stand, definiert anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD14 und CD16, zwei Hauptmonozytenpopulationen unterscheiden. Demnach gibt es eine Untergruppe, die den Oberflächenmarker CD14 in hohen Mengen und den Marker CD16 nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren, die $CD14^{++}CD16^{-}$ -Monozyten. Sie werden auch klassische Monozyten genannt. Die zweite Gruppe exprimiert den Oberflächenmarker CD14 nur in geringen Mengen auf der Oberfläche und weist eine Koexpression des Markers CD16 auf, die $CD14^{low}CD16^{+}$ Monozyten, auch nicht-klassische Monozyten genannt (34). Des Weiteren gibt es noch eine intermediäre Gruppe von Monozyten im Menschen, auf die hier aber nicht weiter eingegangen wird, da der Fokus der Arbeit auf der funktionellen Differenzierung der beiden zuvor genannten Untergruppen liegt (34)(43). Diese beiden Monozytenpopulationen im Menschen ähneln in ihrem Genexpressions- und Verhaltensmuster jeweils einer entsprechenden Population von Monozyten in der

Maus (46).

In der Maus gibt es zwei zirkulierende Populationen von Monozyten im peripheren Blut. Die humanen klassischen Monozyten weisen dabei Ähnlichkeiten mit der größeren Untergruppe von Blutmonozyten in der Maus auf, die auf ihrer Oberfläche den Marker Ly6C exprimiert. An dieses Molekül kann der Antikörper GR1 binden. Des Weiteren exprimieren sie den Marker CD11b sowie den Chemokinrezeptor CC-chemokine receptor 2 (CCR2) und in geringen Mengen den Rezeptor des Chemokins Fractalkine (CX3CR1). Sie werden entsprechend der Eigenschaft bei einer Entzündung schnell rekrutiert zu werden auch als inflammatorische Ly6C^{high}-Monozyten bezeichnet (47)(48). Die bereits erwähnten humanen nicht-klassischen Monozyten sind vergleichbar mit den murinen Blutmonozyten, die den Oberflächenmarker Ly6C nur in geringer Menge aufweisen. Sie bilden zudem nur eine geringe Menge von CCR2. Ein für diese Arbeit wichtiges Merkmal ist jedoch, dass sie CX3CR1 im Gegensatz zu der inflammatorischen murinen Monozytensubpopulation in großen Mengen auf ihrer Oberfläche aufweisen. Diese Monozyten definieren sich aufgrund ihrer vor allem im Gefäß verweilenden Schutz- und Reparaturfunktion als patrollierende oder auch residierende Ly6C^{low}-Monozyten (48)(49). Vor Ort können sie die Wundheilung und Angiogenese am Endothel fördern und haben eine entscheidende Funktion bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Falle eines inflammatorischen Reizes (49)(50). Monozyten werden kontinuierlich aus myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark generiert und an das Blut abgegeben.

3.3.3 Die Rekrutierung von Monozyten bei der sterilen Inflammation

Der Ablauf einer Entzündungsreaktion beruht auf einem streng regulierten Zusammenspiel phagozytotischer Zellen mit dem Ziel, das Pathogen zu entfernen oder den auslösenden Schaden zu beseitigen und die Gewebshomöostase wiederherzustellen (51). Monozyten spielen eine wichtige Rolle während dieses Prozesses (52). Dies trifft auch auf viele Beispiele von sterilen Entzündungsgeschehen zu, wie beim ischämischen Schlaganfall (53), der Atherosklerose (54), der rheumatoiden Arthritis (55) oder dem

Myokardinfarkt (56). Sie können in Monozytensubpopulationen unterteilt werden, die unterschiedliche Funktionen unter inflammatorischen und homöostatischen Bedingungen erfüllen (siehe **Kapitel 3.3.2**) (43)(34). Zudem werden sie in verschiedenen Phasen zum Ort des Entzündungsgeschehens rekrutiert (51)(55).

Abb. 3.5 zeigt die interaktive Rolle phagozytotischer Zellen während der verschiedenen Phasen einer Entzündungsreaktion. Es lassen sich vier Phasen der Immunzellrekrutierung differenzieren (51). Die Rekrutierungsabläufe von Monozyten bei der sterilen und infektiös bedingten Entzündung weisen Ähnlichkeiten auf, unterscheiden sich jedoch auch in einigen Punkten, wie der Reparatur- und Wundheilungsfunktion, die bei der sterilen Entzündung vermutlich eine größere Rolle spielt (52).

Bisherige Daten lassen die Annahme zu, dass in einer ersten Phase (siehe **Abb. 3.7 a**) sowohl ein steriler als auch ein infektiöser Stimulus über die Wirkung von DAMPs, wie in **Kapitel 3.1** beschrieben, die Migration von residenten Monozyten aus lokalen venösen Gefäßen zum Fokus des Entzündungsgeschehens bewirkt (51). Dort differenzieren sie sich zu Makrophagen, die entzündungsstimulierende Zytokine produzieren (57)(56)(55)(52). Weitere Untersuchungen der Gruppe Kreisel et al. mit intravitaler 2-Photonen-Mikroskopie lassen die Vermutung zu, dass sie durch die Produktion von spezifischen Zytokinen zudem entscheidend für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sind, wodurch die zweite Phase der Entzündung eingeleitet wird (58). In der zweiten Phase (siehe **Abb. 3.7 b**) kreisen neutrophile Granulozyten den Entzündungsherd zunächst ein und bilden ein „Cluster“. Vor Ort entleeren sie ihre zytolytischen Granula, die Matrix degradierende und antimikrobielle Proteine beinhalten (59). Nach neueren Untersuchungen sind sie zudem entscheidend für einen Einstrom von inflammatorischen Monozyten zum Fokus des Entzündungsgeschehens, die sich vor Ort möglicherweise zu antiinflammatorischen Makrophagen differenzieren (55)(60)(61). Die Rekrutierung der inflammatorischen Monozyten erfolgt erst nach mehreren Stunden und kann sogar Tage andauern (51). In Phase drei (siehe **Abb.**

3.7 c) der Entzündungsreaktion interagieren unterschiedliche phagozytische Zellen gemeinsam, wodurch es zu einer Umstrukturierung der Gewebematrix kommt (55)(60)(61). Um einen übermäßigen Abbau von Gewebe zu verhindern, initiieren schließlich bestimmte Signale, die zum Teil von Makrophagen vermittelt werden, den vermehrten Zelltod der neutrophilen Granulozyten durch Apoptose (51). Zudem verhindert die veränderte Gewebematrix das Vordringen von weiteren Immunzellen zum Entzündungsfokus (59). Mit dem vermehrten Zelltod von neutrophilen Granulozyten werden Signale, wie Lipidmediatoren, freigesetzt, die Gewebsmakrophagen animieren, die apoptotischen Zellen abzuräumen (51). Die letzte Phase (siehe **Abb. 3.7 d)** ist eine Stabilisierungs- und Umstrukturierungsphase, die durch die Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen dominiert wird (51).

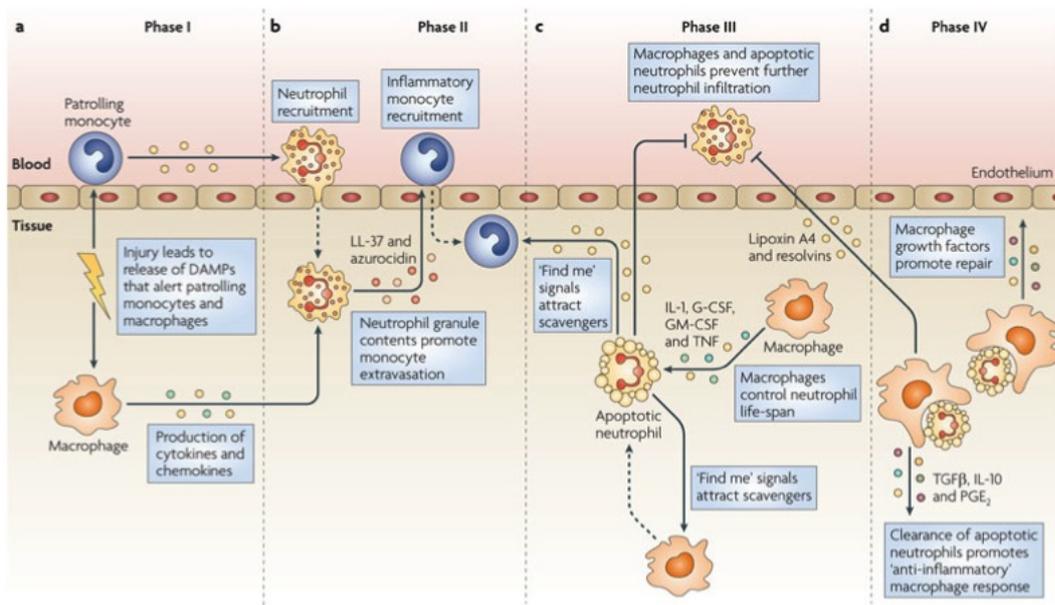


Abbildung 3.6: Darstellung der vier Rekrutierungsphasen während einer Entzündung

Quelle: Soehnlein et al, 2010, S. 429

- a) Phase I: Registrierung der Entzündung durch patrollierende, residente Monozyten, Initiierungsphase
 b) Phase II: Neutrophilen-vermittelte Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten, Verstärkungsphase
 c) Phase III: Beendigung der Neutrophilen-Rekrutierung, Stabilisierungsphase
 d) Phase IV: Beendigung der inflammatorischen Reaktion, Auflösungs- und Reparaturphase

3.4 Die Rolle von Chemokinen bei der sterilen Inflammation

3.4.1 Funktion und Wirkung von Chemokinen bei der sterilen Inflammation

Chemokine sind chemotaktisch wirkende Moleküle, die unter anderem Leukozyten aktivieren und deren gerichtete Migration im Gewebe unter entzündlichen und homöostatischen Bedingungen koordinieren (62)(63). Zudem spielen Chemokine eine entscheidende Rolle bei der Initiierung der Entzündungskaskade und der Integrin-vermittelten Adhäsion von Leukozyten an das Endothel (15). Sie wirken über die Interaktion mit spezifischen G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptoren, die sich auf der Oberfläche ihrer Zielzellen befinden (64).

Chemokine gehören zu den Zytokinen und können anhand ihres strukturellen Aufbaus in vier Untergruppen eingeteilt werden (65)(66). Die einzelnen Untergruppen unterscheiden sich hierbei durch die Anzahl und die Position eines konservierten Musters an Cysteinresten am Ende des Moleküls. Strukturell lassen sich daraus die zwei großen Gruppen CXC und CC sowie die zwei kleinen Gruppen C und CX3C ableiten. Das C steht jeweils für die Aminosäure Cystein. Das X für die Anzahl der dazwischenliegenden Aminosäuren. Die Anzahl und die Position des Cysteins sind somit aus der Strukturformel ersichtlich (67)(68).

Des Weiteren können Chemokine auch anhand ihrer Funktion unterschieden werden. Hierbei kann zwischen inflammatorischen Chemokinen, die bei einem Entzündungsreiz die Immunzellrekrutierung regulieren, und homöostatischen Chemokinen, die unter physiologischen Bedingungen die Migration von Immunzellen steuern, differenziert werden (69). Die Produktion von inflammatorischen Chemokine wird z.B. durch die Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen, wie verschiedenen Interleukinen oder $\text{TNF-}\alpha$, stimuliert (70)(71). Diese Chemokine koordinieren an erster Stelle die Rekrutierung von Effektorzellen, wie Monozyten, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen, in entzündetes Gewebe (69). Homöostatische Chemokine regulieren dahingegen unter

anderem unter physiologischen Bedingungen die Migration von APCs in regionale Lymphknoten (62). Einige Chemokine können funktionell nicht strikt unterschieden werden und spielen unter inflammatorischen und homöostatischen Bedingungen eine Rolle (69).

Chemokine interagieren mit Oberflächenrezeptoren von Leukozyten. Jede Leukozytensubpopulation bindet dabei spezifisch bestimmte Chemokine, entsprechend der Ausstattung mit Rezeptoren. Die CXC-Chemokine, wie Interleukin 8 (CXCL8), interagieren dabei vor allem mit Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten, wohingegen die CC-Chemokine, wie MCP-1 (CCL2) und die CX3C-Chemokine (CX3CL), in erster Linie die Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten regulieren. Somit hat jeder Leukozytensubtyp ein eigenes Interaktionsmuster (62)(72).

3.4.2 Funktion und Wirkung von Fractalkine bei der sterilen Inflammation

In den späten 1990er Jahren entdeckten einige Forscher ein einzigartiges Chemokin, genannt Fractalkine (CX3CL1), das den bisher alleinigen Vertreter der Chemokin Subgruppe CX3C darstellt und sich strukturell und funktionell von den anderen Chemokinen unterscheidet (73)(74). CX3CL1 wird als transmembranöses Molekül synthetisiert und ist das Einzige unter den Chemokinen, welches sowohl in membran-gebundener Form als Adhäsionsmolekül als auch in gelöster Form als Chemokin die Rekrutierung von Immunzellen koordiniert (siehe **Abb. 3.7**) (62).

Die gelöste Form wird durch proteolytische Spaltung aus dem transmembranösen Molekül generiert, sodass die chemotaktisch wirkende Domäne frei wird. Die Katalyse dieser Reaktion geschieht durch bestimmte Metalloproteasen, wie ADAM 10 oder ADAM 17, auch TNF α Converting Enzyme genannt (75)(76). Bestimmte aktivierende Reize, wie sie bei einer Entzündung generiert werden, können diese Reaktion verstärken, sodass die ungebundene Form von CX3CL1 in erhöhter Anzahl vorliegt und es zu einer lokalen Anreicherung kommt (77). Die gelöst vorliegende Form von CX3CL1 wirkt stark chemotaktisch auf Monozyten, Natürliche Killerzellen

(NKs) und T-Zellen und koordiniert über die Bildung eines Gradienten deren Migration (73)(62). Die membrangebundene Form dient der Integrin-unabhängigen Adhäsion von Fractalkine-Rezeptor-exprimierenden Zellen an das Endothel und wird Zytokin-vermittelt vermehrt auf aktivierten Endothelzellen präsentiert (62). Diese Form der Bindung ist nicht auf die Interaktion mit Oberflächen-Proteoglykanen und anderen Adhäsionsmolekülen angewiesen (77)(62). Der hochspezifische, G-Protein-

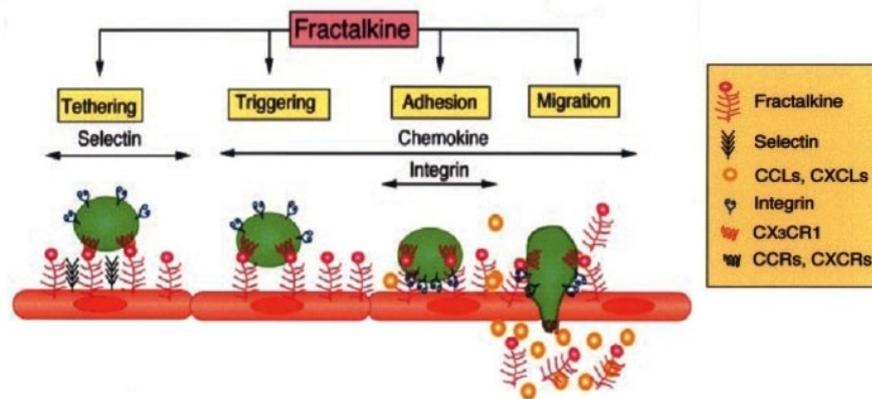


Abbildung 3.7: Die Wirkung von Fractalkine auf Fractalkine-Rezeptor-exprimierende Zellen

Quelle: Umehara et al, 2004, S. 35

Schematische Darstellung der Wirkung von Fractalkine auf die Immunzellrekrutierung. In membrangebundener Form vermittelt Fractalkine neben den Integrinen die feste Adhäsion von Fractalkine-Rezeptor-exprimierenden Zellen an das Endothel. Die ungebundene Form wirkt gemeinsam mit anderen Chemokinen chemotaktisch auf die Zellen und trägt durch die Bildung eines Konzentrationsgradienten zu deren gerichteten Migration im Gewebe bei.

gekoppelte Transmembranrezeptor des Chemokins Fractalkine (CX3CR1), welcher auf der Oberfläche von Immunzellen wie Monozyten, Lymphozyten oder Makrophagen exprimiert wird, hat eine hohe Affinität, an die membrangebundene Form von CX3CL1 sowohl unter physiologischen als auch unter inflammatorischen Bedingungen zu binden (77)(75). Die residenten LY6C^{low}- Monozyten exprimieren höhere Mengen von CX3CR1 als die inflammatorischen Ly6C^{high}- Monozyten und unterliegen demnach womöglich einer vermehrten Koordination durch Fractalkine (72)(78). Eine übermäßige Anhäufung von residenten Monozyten konnte in vielen Erkrankungen,

wie der Sepsis oder dem Asthma bronchiale, beobachtet werden (79). Da sie als patrollierende Monozyten im Gefäß unter anderem an der Reparatur von Gefäßen und somit auch dem Remodelling beteiligt sind, kann es durch eine übermäßige Aktivität zur Hyperplasie der Gefäßwand und zu Störungen des Blutflusses durch Okklusion kommen. Dieser Mechanismus spielt möglicherweise auch eine Rolle bei der Abstoßung von Transplantaten durch eine lokale Minderdurchblutung (78). Der gezielten Eingriff in die CX3CL1-CX3CR1-Interaktion könnte demnach einen therapeutischen Nutzen bringen (62).

3.5 Mausmodelle der sterilen Inflammation

Die Entwicklung der 2-Photonen-Mikroskopie hat es ermöglicht, die Zelldynamik von Immunzellen in ihrer natürlichen Umgebung *in vivo* mit dreidimensionaler Auflösung zu visualisieren und auch tiefer liegende Gewebe detailliert darzustellen (80). Um die Immunzellrekrutierung während der sterilen Inflammation mit der 2-Photonen-Mikroskopie wiedergeben zu können, sind zwei anerkannte Modelle etabliert: das Cremastermodell nach Baez et al. (81) und das Ohrmodell nach Ng et al. (82) und Roedinger et al. (80). Beide Modelle ermöglichen die Visualisierung der Mikrozirkulation während einer sterilen Entzündung in Echtzeit.

Bei dem Cremastermodell nach Baez et al. wird der sterile Reiz durch die Injektion einer chemotaktisch wirkenden Substanz induziert, die spezifisch auf die einzelnen Leukozytensubtypen wirkt und somit deren isolierte Untersuchung ermöglicht. Die Migration im Gewebe ist hierbei nicht auf einen definierten Fokus gerichtet (81).

Das Ohrmodell nach Ng et al. und Roediger et al. (80) ist besonders geeignet, um die gerichtete Migration von Immunzellen zum Inflammationsfokus darzustellen. Hierbei kommt es nicht zu einer Ablenkung der Zellen von einer definierten Migrationsroute durch zusätzlich im Gewebe verteilte sterile Reize, wie es bei dem zuvor genannten Cremastermodell nach Baez et al. der Fall ist (81)(80). Zudem ermöglicht

dieses Modell Bildaufnahmen über einen Zeitraum von mehreren Stunden (über 4h), sodass die Darstellung von verschiedenen Rekrutierungsphasen während einer Entzündung möglich wird (80). Das sterile Entzündungsgeschehen entsteht dabei durch die Verwendung eines gepulsten Lasers. Hierfür wird ein definierter Schaden auf der ventralen Fläche des Ohrs der Maus gesetzt. Durch diesen physikalische Schaden kommt es zum nekrotischen Untergang von Gewebe, und eine sterile Inflammation wird initiiert (83). Das Ohrmodell wurde bereits in mehreren wissenschaftlich anerkannten Versuchen erfolgreich verwendet und ist aufgrund der schnellen Präparation gut reproduzierbar (82). Das präparierte Ohr eignet sich in diesem Zusammenhang besonders als stabiles und planes Gewebe für das 3D-Imaging mittels der 2-Photonen-*in vivo*-Mikroskopie und das fokussierte Platzieren eines Laserschadens. Gewebestrukturen, wie Gefäße und Kollagenfasern, sind reichlich vorhanden und können detailliert dargestellt werden, sodass die Migration von Leukozyten aus dem Gefäß in das Gewebe und zum Fokus der Entzündung visualisierbar wird (82)(84)(85).

3.6 Problemstellungen

Die sterile Inflammation ist der Ausgangspunkt vieler Stoffwechsel- und Autoimmunerkrankungen, wie der Gicht, der rheumatoiden Arthritis oder der Atherosklerose. Zudem entsteht sie als reaktive Antwort auf ischämisch bedingte Durchblutungsschäden oder auf physikalisch bedingte Traumata, wie Verbrennungen oder auch Schäden durch Bestrahlung (84)(1). Die Regulatoren und Initiatoren der sterilen Entzündungsantwort sind im Gegensatz zu der mikrobiell induzierten Entzündung noch nicht vollends verstanden. Insbesondere die Mechanismen der Rekrutierung von Monozyten und die Rolle von grundlegenden Signalwegen sind in diesem Zusammenhang nicht ausreichend untersucht (6). Zudem ist bisher wenig über die gerichtete Migration von Leukozyten im entzündeten „nicht lymphoiden“ Gewebe bekannt (81)(80). Diese Arbeit fokussiert sich daher auf die Erforschung der Mechanismen der Immunzellrekrutierung von Monozyten bei der sterilen Inflammation. Die Vorgänge sollen mithilfe der 2-Photonen-Mikroskopie in der Dermis der Haut *in vivo* am Mausmodell dargestellt werden. In der Maus gibt es zwei Monozytensubpopulationen,

die jeweils einer Population im Menschen entsprechen und deren Funktionen bei der infekt-assoziierten Entzündung grundlegend analysiert werden konnten. Die Rolle der einzelnen Monozytensubpopulationen bei der sterilen Inflammation ist im Gegensatz dazu nur teilweise bekannt. Insbesondere die Funktion der residenten LY6C^{low}-Monozyten muss noch nähergehend betrachtet werden (55)(52). Da die Auswirkungen dieser Zellpopulationen nicht nur protektive, sondern auch pathologische Faktoren mit sich bringen, ist es von Interesse, die Abläufe der Immunzellrekrutierung von Monozyten zu untersuchen und die Differenzen der Subpopulationen aufzuzeigen (55). Das Chemokin Fractalkine nimmt bei der sterilen Inflammation eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten ein und ist an der Extravasation von Monozyten aus dem Gefäß in das interstitielle Gewebe beteiligt (77). Zudem lassen mehrere Studien eine Auswirkung der CX3CR1-CX3CL1-Achse auf das Migrationsverhalten von Monozyten im interstitiellen Gewebe vermuten (52)(86). Ziel dieser Arbeit ist es, mittels der 2-Photonen-Mikroskopie das Migrationsverhalten von Monozyten bei der sterilen Inflammation *in vivo* im interstitiellen Gewebe zu untersuchen. Zudem sollen die einzelnen Phasen der Immunzellrekrutierung von zwei Monozytensubpopulationen visualisiert und differenziert werden. Weiterhin soll die Rolle des Chemokins Fractalkine in diesem Zusammenhang als regulatorischer Faktor bei der Monozytenrekrutierung analysiert werden.

Daraus ergeben sich folgende zentrale Schwerpunktthemen für diese Arbeit:

- **Untersuchung der Immunzellrekrutierung von Monozyten bei der sterilen Inflammation**

Der Fokus der Arbeit liegt auf der Untersuchung der Mechanismen der Immunzellrekrutierung von Monozyten bei der sterilen Inflammation. Die Monozyten sollen hierbei durch die Verwendung eines transgenen Mausstamms mittels 2-Photonen-Mikroskopie in der Dermis des Mausohrs *in vivo* visualisiert werden, um das Migrationsverhalten der Zellen im Gewebe analysieren zu können.

- **Darstellung der Rekrutierungsphasen von zwei Monozyten-subpopulationen**

Zusätzlich sollen die Abläufe der Rekrutierung von zwei murinen Monozyten-subpopulationen bei der sterilen Inflammation charakterisiert und gegenübergestellt werden. Inflammatorische Ly6C^{high}-Monozyten exprimieren niedrige Mengen von CX3CR1 auf ihrer Zelloberfläche, wohingegen residente LY6C^{low}-Monozyten hohe Mengen des Rezeptors auf ihrer Oberfläche aufweisen (49)(87). In CX3CR1-GFP-Mäusen leuchten die residenten Monozyten aus diesem Grund heller als die inflammatorischen Monozyten. Eine Unterscheidung der Subpopulationen soll daher anhand der unterschiedlichen GFP-Fluoreszenzintensität gelingen.

- **Analyse der Rolle des Chemokins Fractalkine im Bezug auf die Rekrutierung von Monozyten bei der sterilen Inflammation**

Weiterhin soll an CX3CR1-GFP-Mäusen durch die Verwendung von zwei Genotypen untersucht werden, ob das Chemokin Fractalkine einen Einfluss auf die interstitielle Migration von Monozyten hat. Dabei sollen Änderungen des Migrationsverhaltens der Monozyten Rückschlüsse auf mögliche lokale Ansammlungen des Chemokins im Gewebe ergeben.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchsplan

Im den folgenden Tabellen wird die Versuchsplanung der für diese Arbeit verwerteten *in vivo*-Versuche mittels der 2-Photonen-Mikroskopie dargestellt.

Tabelle 4.1: Allgemeiner Versuchsplan, Laserverletzung am Ohrmodell

	Tierstamm	Genotyp	Geschlecht	Alter (Wochen)	Anzahl (n)
1.	CX3CR1eGFP	ki/wt	m	10-16	mind. 3
2.	CX3CR1eGFP	ki/ki	m	10-16	mind. 3

Tabelle 4.2: Versuchsplan Auswertung mit Volocity, Heterozygote Tiere

	Methode	Ziel
1.	Messung der Fluoreszenzintensität	Charakterisierung der Subpopulationen
2.	Zelltracking und Analyse von Trackingparametern	Analyse des Migrationsmusters
3.	Messung der Distanz vom Fokus der Verletzung	Differenzierung von Rekrutierungsphasen

Tabelle 4.3: Versuchsplan Auswertung mit Volocity, Homozygote Tiere

	Methode	Ziel
1.	Messung der Fluoreszenzintensität	Charakterisierung der Subpopulationen
2.	Zelltracking und Analyse von Trackingparametern	Analyse des Migrationsmusters
3.	Messung der Distanz vom Fokus der Verletzung	Differenzierung von Rekrutierungsphasen

4.2 Versuchstiere

Das für diese Arbeit verwendete Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG in der Fassung vom 18.05.2016) genehmigt.

4.2.1 Zucht und Haltung

In dieser Arbeit wird die Maus als Versuchstier verwendet. Die Maus eignet sich besonders durch ihre geringe Körpergröße und geeignete Gewebestrukturen für die in dieser Arbeit verwendeten *in vivo*-Versuche mittels der 2-Photonen-Mikroskopie. Zudem ermöglicht die Verfügbarkeit von transgenen Stämmen eine Untersuchung von myeloiden Zellreihen an dem Modell der sterilen Inflammation. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Mäusen ist die Möglichkeit der schnellen Reproduktion von Versuchen durch eine problemlose Aufzucht, schnelle Generationszeiten und einfache Haltungsbedingungen. Dadurch können genügend Daten in kurzer Zeit gesammelt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Tierstämme stammen aus der Eigenzucht der Tierhaltung der Medizinischen Klinik und Poliklinik I in München. Die Haltung der Tiere erfolgt unter SPF-Bedingungen (spezifisch-pathogen-frei) mit höchsten hygienischen und artgerechten Standards. Diese Bedingungen werden regelmäßig mithilfe von Sentinel-Mäusen überprüft und nach den FELASA-Empfehlungen durchgeführt. Der Tierstall ist von der Aufsichtsbehörde abgenommen und AAALAC-zertifiziert. Dies beinhaltet ein geschlossenes Barriere-System mit Personalschleuse, Materialschleuse, Durchreichautoklav, Wasserstoffperoxid-Schleuse und einer Überdruckbelüftung. Eine Öffnung der Käfige ist nur innerhalb der Umsatzstationen möglich. Die Mäuse werden in einem IVC-System THKB-M2V-M Polysulfonkäfig Typ M II mit einer maximalen Anzahl von drei Versuchstieren pro Käfig gehalten. Dabei findet ein wöchentlicher Käfigwechsel mit einer Reinigung und Sterilisation statt. Die Gestelle werden hierfür mit 80 °C heißem Wasser gewaschen und bei einer Temperatur von 121 °C autoklaviert. Zudem unterliegen Einstreu, Futter und Wasser einem Autoklavierungsprozess.

Trinkwasser erhalten die Tiere aus Tränke-Flaschen in den Käfigen, welche regelmäßig nachgefüllt werden. Auch Futter steht den Mäusen unbegrenzt zur Verfügung. Hierfür wird ein Standardfutter für Labornager (Haltungsfutter V 1536) verwendet. Die Zuchttiere erhalten ein energiereiches, hochkalorisches Futter. Für den Nestbau wird den Nagern ein grobes Einstreu und ein Häuschen aus rotem Kunststoff als Rückzugsort gestellt. Die Raumtemperatur liegt bei 21 °C und die Luftfeuchtigkeit beträgt 68 %, sodass ein ideales Raumklima vorliegt. Der Tag-Nacht-Rhythmus wird über einen 12-h-Zeitschalter mit einer Lichtintensität von 50 bis 100 Lux aufrechterhalten (88).

4.2.2 Wahl von Tierstamm und Genotyp

Für die Erlangung der in dieser Arbeit vorliegenden Daten wurde der transgene Mausstamm CX3CR1-GFP verwendet. Bei dieser Mauslinie kann die Funktion von Fractalkine bei der sterilen Inflammation mittels 2-Photonen-Mikroskopie untersucht werden. Zudem können Monozyten in der Dermis der Haut *in vivo* visualisiert werden. Für die Generierung dieser Mauslinie wird an der Stelle des Fractalkine-Rezeptorgens in der Maus-DNA ein grün-fluoreszierendes (GFP)-Reportergen transfiziert. Anschließend werden durch die Injektion von Stammzellen Chimären generiert. Durch Verpaarung werden schließlich heterozygote und durch Verkreuzung homozygote CX3CR1-GFP-Mäuse gezüchtet. In diesem Mausstamm emittieren alle Fractalkine-Rezeptor-exprimierenden Zellen unter dem 2-Photonen-Mikroskop grünes Licht (87).

Das Chemokin Fractalkine bindet spezifisch an den transmembranösen Fractalkine-Rezeptor. Fractalkine spielt sowohl bei der zellvermittelten Adhäsion als auch bei der Immunzellrekrutierung im Gewebe als ligandenungebundenes Chemokin eine Rolle. Heterozygote Tiere tragen noch ein Allel des Fractalkine-Rezeptors, während in homozygoten Mäusen das Gen gezielt durch ein „knock in“ deaktiviert wurde und beide Allele mit dem Farbstoff GFP besetzt sind. In heterozygoten Tieren wird der Fractalkine-Rezeptor exprimiert und ermöglicht unter anderem die Untersuchung der Fractalkine-abhängigen Rekrutierung von Monozyten *in vivo* (87). Homozygote Tiere exprimieren den Rezeptor im Gegensatz dazu nicht auf ihrer Oberfläche.

Monozyten können in mehrere Subpopulationen unterteilt werden. In dieser Arbeit sollen die Rekrutierungsmechanismen von zwei murinen Subpopulationen untersucht werden, die sich in der Expressionsdichte des Fractalkine-Rezeptors unterscheiden. Residente Ly6C^{low}-Monozyten weisen im Gegensatz zu den inflammatorischen Ly6C^{high}-Monozyten eine hohe Dichte des Rezeptors auf. In CX3CR1-GFP-Mäusen leuchten die CX3CR1^{high}-Monozyten heller als die CX3CR1^{low}-Monozyten (57). Eine Charakterisierung der Monozytensubpopulationen soll in dieser Arbeit anhand der unterschiedlichen GFP-Fluoreszenzintensität gelingen. Gleichzeitig ermöglicht die Fluoreszenz eine Visualisierung der Zellen im Gewebe, wodurch ihre Migrationsrouten- und Phasen analysiert werden können.

4.3 Präparation der Versuchstiere

Um die Mikrozirkulation des Ohrs der Maus unter dem 2-Photonen-Mikroskop visualisieren zu können, muss die Maus für den Versuch zunächst präpariert werden. Dazu gehören das Legen eines Zugangs, um Farbstoffe applizieren zu können, das Narkosemanagement und die Präparation des Ohrs der Maus auf einer vorgefertigten Modellkonstruktion.

4.3.1 Anästhesie

Zu Beginn eines jeden Versuchs und vor der anschließenden Präparation muss das Versuchstier narkotisiert werden. Die Untersuchung der interstitiellen Migration von Monozyten mittels Real-Time-Imaging erfordert Zeiträume von mehreren Stunden, um alle Phasen der Rekrutierung abzudecken. Über diese Zeitspanne muss für ein optimales Versuchsergebnis die Narkose sicher aufrechterhalten bleiben. Zu Beginn wird die Narkose mit einem 2-3% Isofluran-Sauerstoffgemisch eingeleitet. Die Maus wird dafür in eine Plexiglasröhre eingebracht und inhaliert das über einen Verdampfer einströmende Gas. Nach dem Erlöschen der Stellreflexe wird das Versuchstier aus der Plexiglasröhre entfernt und auf einer Wärmematte (ThermoLux-Wärmematte,

Fa. Dehner) fixiert. Somit kann die Körpertemperatur während der Versuchsdurchführung konstant gehalten und eine stabile Kreislauffunktion gewährleistet werden. Zudem wird zum Schutz der Hornhaut eine Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) aufgetragen.

Ziel der Narkose ist es, Bewusstsein und Schmerzempfinden der Tiere auszuschalten. Gleichzeitig muss ein unkompliziertes Narkosemanagement fernab des Ohrs der Maus möglich sein. Hierfür eignet sich besonders eine Injektionsnarkose, die intraperitoneal appliziert werden kann. Für die Versuche dieser Arbeit wird eine Tripelnarkose, bestehend aus dem Sedativum und Hypnotikum Medetomidin (0,5 mg/kg/Körpergewicht), dem Benzodiazepin Midazolam (5,0 mg/kg/Körpergewicht) und dem stark wirkenden Opioid-Analgetikum Fentanyl (0,05 mg/kg/Körpergewicht) verwendet, die in ihrer vollen Wirkung zwischen 45 und 60 Minuten anhält. Die Kombination aus diesen drei Substanzen wird vor der i.p. Injektion in einer Mischspritze dosiert und mit einer sterilen physiologischen isotonischen Kochsalzlösung (NaCl 0.9% Isotonische Kochsalzlösung, Fresenius, Bad Homburg v.d.H.) auf ein Volumen von 0,5 ml verdünnt.

Anschließend wird die Maus umgehend in eine Einschlafbox mit eingebrachten Luftlöchern gebettet. Dies ermöglicht die Abschirmung vor optischen und akustischen Reizen bis zur Erreichung des chirurgischen Toleranzstadiums III nach ca. 10 bis 20 Minuten. Eine Absicherung gewährleistet die Prüfung des Flexorreflexes, der unter physiologischen Bedingungen durch Kneifen in die Zehe, Zehenzwischenhaut oder die Ballen ausgelöst wird. Sobald dieser Reflex erloschen ist, kann von dem chirurgischen Toleranzstadium ausgegangen werden, und das Versuchstier ist für die anschließenden Versuchsschritte ausreichend narkotisiert. Mithilfe der Überprüfung des Flexorreflexes kann auch während der Versuchsdurchführung die Tiefe der Narkose überprüft werden. Sobald die Narkosetiefe sinkt, kann die halbe Dosis nachinjiziert werden, sodass sich die Dauer der Narkose um ca. 45 Minuten verlängert. Zur Kontrolle der Kreislauffunktion und Einschätzung der Narkosetiefe werden während der

Versuchsdurchführung in regelmäßigen Abständen die Atmung und der Flexorreflex kontrolliert sowie eventuell Sauerstoff über einen Verdampfer zugeführt.

4.3.2 Legen eines Zugangs und Applikation von Farbstoffen

Um die venösen Gefäße in der Mikrozirkulation der Haut unter dem 2-Photonen-Mikroskop visualisieren zu können, muss ein spezifischer Farbstoff appliziert werden. Hierfür benötigt man einen Zugang zum Gefäßsystem der Maus. Dieser Zugang kann durch das Platzieren eines intraarteriellen oder intravenösen Katheters erzielt werden, sodass sich zwei Verfahren für diesen Eingriff eignen. Diese werden im Folgenden erörtert. Beide Verfahren wurden in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen verwendet.

Schwanzvenenkatheter

Ein venöser Zugang zum Gefäßsystem der Maus ist durch die Platzierung eines Katheters in einer der beiden lateral verlaufenden Schwanzvenen (Vena coccygea laterales) möglich. Dieses Verfahren ist schnell durchführbar und erspart einen operativen Eingriff.

Für das Verfahren muss zunächst ein Katheter, bestehend aus zwei Kanülen (30G, BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) und einem Polyethylenschlauch (Portex, Polythene Tubing, 0,28 mm ID 0,61 mm OD, Smiths Medical International, Hythe, USA), hergestellt werden. Um diese Apparatur zu bauen, wird von einer ersten Kanüle der Konus entfernt und mit der Spitze auf den Polyethylenschlauch gesetzt. Anschließend wird an das hintere Ende die zweite Kanüle eingefädelt. Für die Applikation von Substanzen wird zusätzlich eine 1-ml-Spritze mit einer Durchgängigkeitskontrolle angebracht. Nach erfolgter Überprüfung der Durchgängigkeit kann die Implantation des Katheters erfolgen. Um eine der Schwanzvenen punktieren zu können, wird die Maus in einer vorgesehenen Vorrichtung (Injektionskäfig, Typ Broome HAR-52-04, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Jugenheim) fixiert. Der freiliegende Schwanz wird anschließend proximal an der Basis mithilfe des

Zeige- und Mittelfingers gestaut. Zusätzlich wird ein Handschuh mit angewärmten Wasser unterhalb des Schwanzes positioniert, um eine Weitstellung der Venen für eine gute Sichtbarkeit zu gewährleisten. Unter Verwendung eines Nadelhalters wird folgend eine der beiden Schwanzvenen punktiert und der Katheter vorgeschoben. Nun kann die Applikation des Farbstoffes erfolgen.

Femoraliskatheter

Der Femoraliskatheter ist ein intraarterieller Verweilkatheter, der somit einen kontinuierlichen Zugang zum Gefäßsystem bietet. Bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen eignet sich diese Methode besonders, da eine wiederholte Applikation auch während der Versuchsdurchführung möglich ist. Die Halbwertszeit der Farbstoffe (2-3 h) liegt zum Teil unter der Versuchsdauer, sodass eine uneingeschränkte Applikationsmöglichkeit einen entscheidenden Vorteil darstellt.

Für die Platzierung des Katheters muss zunächst die Arteria femoralis in einer mikrochirurgischen Operation freipräpariert werden. Für ein geeignetes Sichtfeld wird die Operation unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss, Jena) unter der Durchleuchtung mit einer Schwanenhalslampe (Schott Kaltlichtquelle KL200, Schwanenhals-Lichtleiter, Zeiss, Jena) durchgeführt. Es wird ein steriles, mikrochirurgisches Instrumentarium verwendet. Zunächst wird die Innenseite der oberen Extremität der Maus großflächig enthaart (Plica® extra soft, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Bühl) und desinfiziert (Cutasept®F, Fa.Bode Chemie, Hamburg) (siehe **Abb. 4.1 A**). Es folgt die Platzierung des Hautschnitts 2 cm oberhalb des Kniegelenks und eine stumpf präparierte Entfernung der oberen Faszien, sodass der Nervus femoralis, die Arteria femoralis und die Vena femoralis in genannter Reihenfolge sichtbar werden (siehe **Abb. 4.1 B**). Anschließend wird die Arteria femoralis vorsichtig mit einer Pinzette von den anderen Strukturen getrennt und auf eine Länge von ca. einem Zentimeter freipräpariert (siehe **Abb. 4.1 C-D**). Darauffolgend werden zwei Fäden (Pearsalls Limited, Taunton, England) distal und proximal von dem freipräparierten Anteil unter der Arteria femoralis hindurchgeführt.

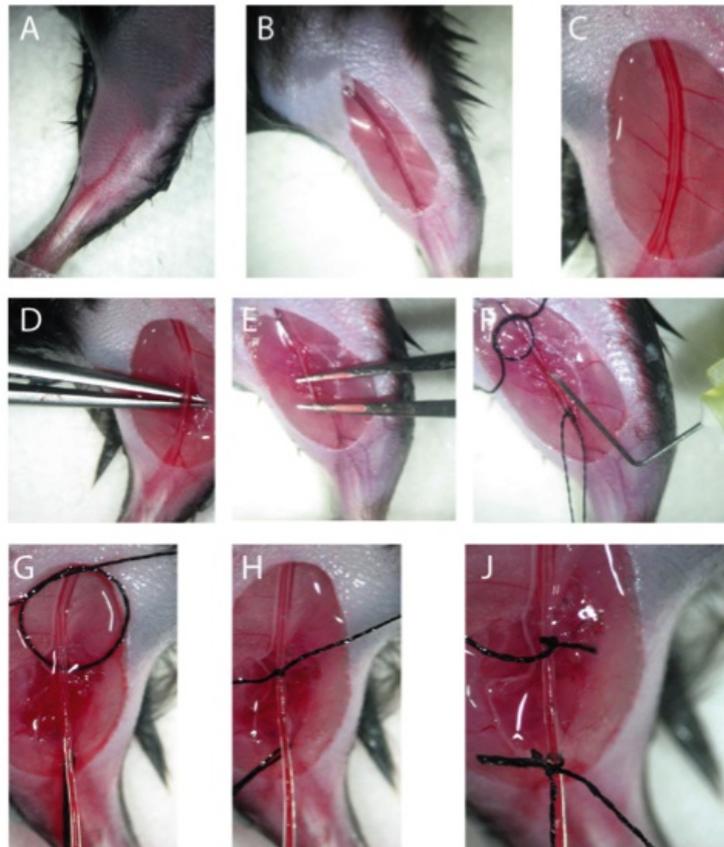


Abbildung 4.1: Platzierung des Femoraliskatheters mit Darstellung der einzelnen Operationsschritte

Der distale Faden wird verknotet, wohingegen bei dem proximalen Faden der Knoten nur vorgelegt wird (siehe **Abb. 4.1 E**). Um das Eindringen der Katheterspitze in das Gefäß zu erleichtern, wird nun ein stumpfes Trauma mit einer Pinzette in der Arterie gesetzt, sodass ein Aneurysma entsteht (siehe **Abb. 4.1 E**). Anschließend wird ein Polyethylen-Katheter (Katheterschlauch Portex®, Polythene Tubing, 0,28mm ID, Smiths Medical, Keene, USA) durch ein kleines Loch in der Wand des Aneurysmas in das Gefäß eingeführt und vorgeschoben (siehe **Abb. 4.1 G**). Das Loch wird hierfür zuvor mit einer im 90° Winkel umgeknickten Nadel positioniert (siehe **Abb. 4.1 F**). Mit dem Verknoten des proximalen und distalen Fadens kann der Katheter nun fixiert werden (siehe **Abb. 4.1 H-J**). Abschließend wird physiologische Kochsalz-

lösung (NaCl) mit einer 1-ml-Spritze injiziert, um eine gelungene Platzierung und Durchgängigkeit des Katheters zu überprüfen. Nach erfolgreicher Durchführung kann der Fluoreszenzfarbstoff appliziert werden.

Applikation von Farbstoffen

Um die venösen Gefäße *in vivo* für die 2-Photonen-Mikroskopie sichtbar zu machen, muss vor der Versuchsdurchführung über einen der zuvor genannten Zugangswege ein Farbstoff appliziert werden. Durch die angefärbten Gefäße wird die Mikrozirkulation in der Dermis der Haut unter dem Mikroskop später sichtbar, und es kann ein geeigneter Platz für die Laserletzung gefunden werden. Für die Versuche dieser Arbeit wurde als Zugangsweg vor allem der Femoraliskatheter gewählt, da die Untersuchung der Immunzellrekrutierung von Monozyten mehrere Stunden andauert und sich, wie bereits erwähnt, diese Methode für Langzeitaufnahmen besonders eignet.

Der applizierte Farbstoff ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der auf Grund seiner Molekülstruktur bei der Verwendung eines Lasers Licht emittiert. Es gibt verschiedene Klassen von Fluoreszenzfarbstoffen, die je nach Molekülstruktur eine unterschiedliche Wellenlänge zur Anregung benötigen und sich in dem Farbspektrum des emittierten Lichts unterscheiden. Bei der Verwendung von mehreren Fluoreszenzstoffen muss darauf geachtet werden, dass sich die emittierten Farbspektren nicht überlappen. Gleichzeitig sollten sie aber ungefähr denselben Wellenlängenbereich zur Anregung benötigen (83). Es gibt drei Klassen von Fluoreszenzfarbstoffen: die Proteine, die Nanokristalle und die Quantum dots. In dieser Arbeit wurden zwei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Zum einen wurde das grün fluoreszierende Protein GFP als Reporter gen in den Genlokus des Fractalkine-Rezeptors eingebracht, sodass CX3CR1⁺-Zellen unter dem 2-Photonen-Mikroskop grünes Licht emittieren. Zum anderen wurde für das Anfärben der Gefäße *in vivo* der Farbstoff TRITC Dextran verwendet. TRITC gehört dabei zu der Fluoreszenzstoffklasse der Nanokristalle und kann an Proteine und Makromoleküle gekoppelt werden. Markierte Dextrane sind hydrophile Polysaccharide, die vor allem in mikroskopischen Studien angewendet werden, um Zellen

zu untersuchen. Das Anregungsmaximum des Farbstoffs liegt bei 555 nm mit einem Emissionsmaximum bei 580 nm. Nanokristalle sind Fluoreszenzfarbstoffe mit einer recht langen Halbwertszeit, sodass sie sich für Langzeitaufnahmen *in vivo* eignen. TRITC Dextran hat jedoch eine relativ hohe Fotosensibilität und muss während der Versuchsdurchführung mehrmals nachinjiziert werden. Da aber der spektrale Überlappungsbereich mit GFP gering ist, eignet sich dieser Farbstoff für die Versuche mit CX3CR1-GFP-Mäusen.

4.3.3 Präparation des Ohrmodells

Für die *in vivo*-Aufnahmen mit dem 2-Photonen-Mikroskop wird das Ohr der Maus auf einer Modellkonstruktion nach Ng et al. (84) und Roediger et al. (80) präpariert (siehe **Abb. 4.2**).



Abbildung 4.2: Darstellung des Ohrmodells

Diese Methode ermöglicht die *in vivo*-Darstellung der Mikrozirkulation in der Dermis der Haut über mehrere Stunden (>4h). Die Ventralseite des Ohrs der Maus ist auf

Grund der leichten Zugänglichkeit besonders geeignet für die Präparation. Zudem ist dieser Teil der Maus relativ unbeeinflusst von Atemexkursionen, sodass weniger Artefakte durch Bewegung entstehen. Des Weiteren verläuft die Präparation beinahe atraumatisch, sodass keine zusätzliche Entzündungsreaktion in der Umgebung der Laserverletzung entsteht (80)(84).

Nach erfolgter Narkotisierung und Implantation eines geeigneten Zugangs zum Gefäßsystem (siehe **Kapitel 4.3.1**) wird die Maus in Rückenlage auf einer speziellen Plattform (Stage) platziert und an Gliedmaßen und Schwanz mit Klebeband (Transpore 3M, Health Care, Neuss) fixiert. Anschließend wird das Mausohr mobilisiert und unter Durchleuchtung mit einer Stereolupe möglichst planar auf einem Silikonring fixiert. Dies geschieht mit umgeknickten Kanülnadeln, die am Rand des Ohrs kreisförmig platziert werden. Der freigebliebene Bereich des Silikonrings wird nun mit Silikongel abgedichtet, sodass die Fläche mit 0.9% NaCL-Lösung oder destilliertem Wasser als Immersionsflüssigkeit für das Objektiv aufgefüllt werden kann. Nach der Präparation wird die Stage mit dem präparierten Ohr unter dem Objektiv des Mikroskops positioniert und die entsprechende Vergrößerung eingestellt. Die Plattform mit der Maus wird an einen Wärmeinkubator angeschlossen, um die Körpertemperatur der Maus während der Versuchsdurchführung konstant zu halten. Zusätzlich wird NaCL oder destilliertes Wasser während des Imagings bereitgehalten, um gegebenenfalls die Stage neu zu befüllen.

4.4 Intravital Multiphoton Imaging

4.4.1 Das Zwei-Photonen-Mikroskop

Die 2-Photonen-Mikroskopie ermöglicht die dreidimensionale *in vivo*-Darstellung von Fluoreszenz-markierten Zellen, der Extrazellulären Matrix und Gefäßen in verschiedenen Geweben. Ein Vorteil gegenüber anderen Fluoreszenzmikroskopen ist dabei die hohe räumliche und zeitliche Auflösung und die weitreichende Eindringtiefe bei geringer Fototoxizität, sodass auch tiefer liegende Gewebestrukturen, wie bspw.

die Mikrozirkulation in der Dermis der Haut, visualisiert werden können (83). Somit ermöglicht die Anwendung der 2-Photonen-Mikroskopie wichtige Einblicke in die Pathophysiologie von entzündlichen Hauterkrankungen (89).

Der Effekt der 2-Photonen-Absorption ist ein relativ neues Konzept und konnte erst in den 90er Jahren in der biologische Forschung mittels der 2-Photonen-Mikroskopie genutzt werden (90). Für eine Bilddarstellung wird bei der 2-Photonen-Mikroskopie unter anderem das physikalische Phänomen der 2-Photonenabsorption zur Fluoreszenzanregung genutzt. Wird Lichtenergie einer definierten Wellenlänge gezielt von einem Fluoreszenzmolekül absorbiert, emittieren diese Moleküle Licht. Bei den genannten Molekülen handelt es sich um Farbstoffe, sogenannte Fluorochrome, die an bestimmte Proteine gekoppelt sein können und diese somit visualisierbar machen (91). Bei der konventionellen Fluoreszenzanregung, wie sie bspw. bei der konfokalen Mikroskopie genutzt wird, absorbiert ein Fluorochrom dabei die Energie von einem Photon, wodurch ein Elektron auf ein höheres Energieniveau befördert wird. Nach wenigen Nanosekunden fällt das Elektron wieder in den Grundzustand zurück, und der Farbstoff emittiert die zuvor absorbierte Energie in Form eines Photons fast vollständig. Da ein Teil der Energie dabei in Form von Schwingungsenergie verloren geht, ist die Wellenlänge des emittierten Photons länger und somit energieärmer als die des absorbierten (siehe **Abb. 4.3 a**). Dies wird auch als Stoke's Shift bezeichnet (92). Im Gegensatz dazu benötigt die 2-Photonen-Anregung die nahezu simultane Absorption der Energie von zwei Photonen, wobei jedes Photon die Hälfte der Energie beinhaltet, die für eine Fluoreszenzanregung notwendig ist. Das von dem Fluorochrom emittierte Fluoreszenzlicht hat somit eine kürzere Wellenlänge als die des absorbierten Lichts und ist energiereicher (siehe **Abb. 4.4 b**). Da die Anregung des Fluorochroms auf der simultanen Absorption von zwei Photonen beruht, steigt die resultierende Fluoreszenzenergie proportional zu der Quadratwurzel der Anregungsenergie (92)(93).

Um den Effekt der 2-Photonen-Absorption zu generieren, benötigt man eine extrem hohe Dichte an Photonen im Brennpunkt. Dies kann nur mit einem ul-

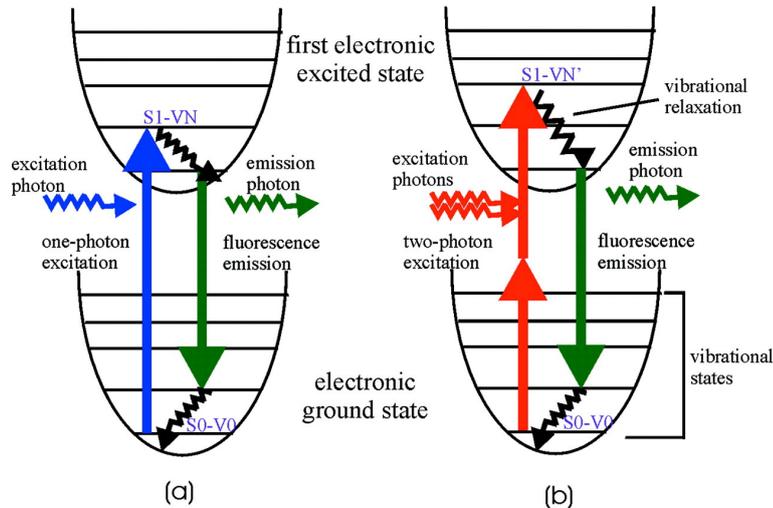


Abbildung 4.3: Darstellung der Ein-Photonen- und Zwei-Photonen-Fluoreszenzanregung

Quelle: So et al, 2003, S. 402

Darstellung der a) Ein-Photonen- und b) Zwei-Photonen-Fluoreszenzanregung mithilfe eines Jablonski Diagramms. Bei der Ein-Photonen-Anregung ist die Energie des emittierten Photons energieärmer als die Energie des absorbierten Photons. Bei der 2-Photonen-Anregung werden nahezu simultan zwei Photonen absorbiert, sodass die Wellenlänge des emittierten Lichts energiereicher ist als die des absorbierten Lichts.

traschnellen gepulsten Laser (Titanium-Saphir-Laser) erreicht werden, der extrem kurze (< 1 Picosekunde) und intensive Pulse von Lichtenergie im Infrarot-Bereich generiert (92). Die dabei entstehende Energiedichte wird nur im Fokus erzeugt, sodass eine Fluoreszenzemission vor allem im Brennpunktbereich stattfindet. Über und unter der Fokusebene fällt die Photonendichte rapide ab, sodass kaum Streustrahlung zustande kommt. Dies ermöglicht eine kontrastreiche Erzeugung von Schnittbildern mit einer hohen Auflösung (94).

Die Vorteile des 2-Photonen-Mikroskops gegenüber anderen Fluoreszenzmikroskopen beruhen auf dem Effekt der 2-Photonen-Absorption. Somit ist die Fototoxizität im Gewebe gering, da die Anregungsenergie der gekoppelten zwei Photonen jeweils niedrig ist. Zudem bleibt die Fluoreszenzintensität der Farbstoffe über einen längeren Zeitraum erhalten, da das Ausbleichen der Farbstoffe durch das vergleichsweise niedrigerenergetische Infrarotlicht langsamer geschieht. Des Weiteren können tiefer

liegende Gewebeschichten von teilweise bis zu $1000\mu\text{m}$ visualisiert werden (95).

Ein weiteres wichtiges physikalisches Phänomen, welches ebenfalls die dreidimensionale Bilddarstellung mittels der 2-Photonen-Mikroskopie ermöglicht, ist die Frequenzverdopplung, auch Higher Harmonic- bzw. Second Harmonic-Generation (SHG) genannt. Bestimmte gruppiert angeordnete Strukturproteine im Gewebe, aus denen unter anderem Kollagen besteht, haben die Eigenschaft, auf Grund ihrer nicht zentrosymmetrischen Form die Frequenz der Laserstrahlung beim Durchtritt durch diese Moleküle zu verdoppeln und Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung abzugeben. Diese kann in Form des Second Harmonic Signals registriert werden. Die Wellenlänge der emittierten Strahlung entspricht dabei genau der Hälfte der Wellenlänge der anregenden Strahlung. Da die anregende Wellenlänge des Infrarotlaserlichts ungefähr bei 800 nm liegt, befindet sich die Wellenlänge des Second Harmonic Signals demnach in einem Bereich von 400 nm. Diese Wellenlänge entspricht im Farbspektrum dem blauen Licht und kann im entsprechenden Kanal sichtbar gemacht werden (96)(97).

4.4.2 Aufbau und Funktion des Zwei-Photonen-Mikroskops

Die 2-Photonen-Mikroskopie ähnelt in der technischen Umsetzung der Konfokalen Mikroskopie. Bei beiden Verfahren wird Lichtenergie mittels eines Lasers durch eine Objektivlinse auf eine fluoreszenzmarkierte Probe fokussiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird anschließend durch dieselbe Linse gesammelt und von einem PMT-Detektor registriert. Somit werden digitale *in vivo*-Schnittbilder erzeugt, die anschließend mittels einer speziellen Software zusammengesetzt und in Form eines 3-D-Videos am Computer visualisiert werden können (98)(92). Das für diese Arbeit verwendete 2-Photonen-Mikroskop ist ein Gerät der Firma La Vision Biotech GmbH. Es handelt sich um ein TrimScope-Mikroskop mit einem eingebauten optischen Mikroskop der Firma Olympus.

Ein typisches 2-Photonen-Mikroskop kennzeichnen drei grundlegende Komponenten.

Eine Anregungslichtquelle, ein Laser-Scanning-Mikroskop und ein hochempfindliches Detektionssystem (99). **Abb. 4.4** illustriert den schematischen Aufbau eines 2-Photonen-Mikroskops. Die Anregungslichtquelle ist hierbei ein ultraschneller gepulster Titanium-Saphire-Laser (Ti-Sa Laser) mit einem Wellenlängen-Abstimmungsbereich zwischen 700-1000 nm. Die Frequenz und Wellenlänge des Lasers werden vor den Versuchen festgelegt. Für die Versuche dieser Arbeit wurde eine Anregungswellenlänge von 800 nm gewählt. Größere Wellenlängen können mit einem optisch-parametrischen Oszillator (OPO) generiert werden, wenn Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die Licht einer höheren Wellenlänge zur Anregung benötigen. Der generierte Laserstrahl (in **Abb. 4.4** in Rot dargestellt) wird anschließend durch ein Wasserimmersions-Objektiv (Olympus, 16-fache Vergrößerung, Numerische Apertur 0.95) auf der Probe fokussiert. Dabei passiert er ein im Strahlengang befindliches Scanning-System mit

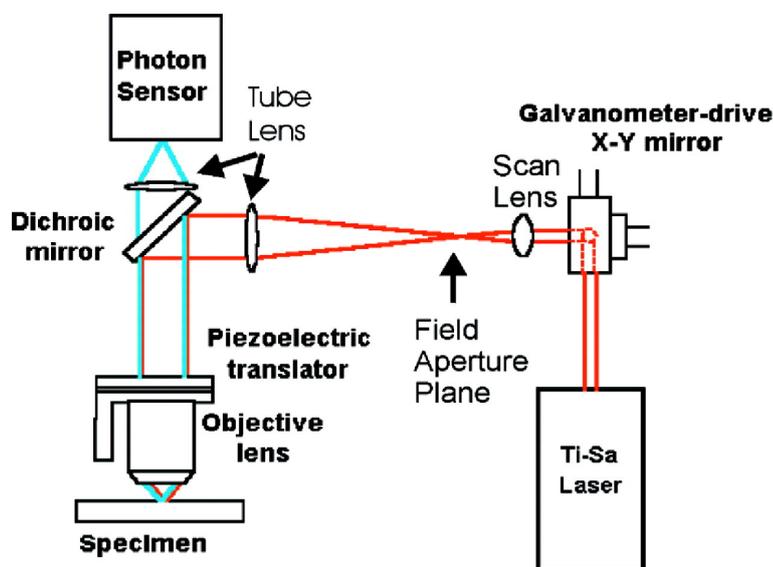


Abbildung 4.4: Schematischer Aufbau eines Zwei-Photonen Mikroskops
 Quelle: So et al., 2003, S. 404

Spiegeln (in **Abb. 4.4** Scan Lens) die die Achse der Laserstrahlen so brechen, dass sich der Fokuspunkt des Lasers durch das Präparat bewegt und die Probe somit abtastet. Durch dieses Raster-Scanning entstehen mehrere Schnittbilder. Nach dem Auftreten des Laserstrahls auf die Probe wird die dabei emittierte Fluoreszenz wieder von dem Objektiv aufgefangen und über einen dichroitischen Strahlteiler (in **Abb.**

4.4 Dichroic mirror) spektral aufgetrennt. Die von der Probe emittierte Strahlung wird in **Abb. 4.4** in Blau dargestellt. Über ein hochsensitives Detektorsystem (in **Abb. 4.4** Photon Sensor) werden die einzelnen Strahlen schließlich detektiert und nach Helligkeit sortiert (99).

4.4.3 Versuchsdurchführung: Der Laserschaden

Die Laserverletzung eignet sich besonders, um eine sterile Entzündung in einer räumlich und zeitlich kontrollierten Weise zu induzieren und wurde bereits in anderen immunologischen Studien erfolgreich angewendet (83). Zunächst muss eine geeignete Lokalisation für die Platzierung des Schadens gefunden werden. Dafür wird der gesamte Scanbereich ($588\mu\text{m} \times 588\mu\text{m}$) sorgfältig nach einer Stelle in der Nähe einer geeigneten postkapillären Venole abgesucht. Die für diese Arbeit verwendeten Mäuse sind normal pigmentiert. Erfahrungsgemäß kann eine Stelle mit leichter Pigmentierung im Gewebe, die anhand von Autofluoreszenz erkennbar ist, die Induktion einer Verletzung mit dem Laser erleichtern. Die Laserverletzung kann durch eine kurzfristige Fokussierung (30 Sekunden) des Lasers auf einen definierten Bereich ($40\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$) in der Dermis des Mausohrs induziert werden. Dadurch entsteht bei richtiger Anwendung ein definierter Schaden, der durch Autofluoreszenz lokalisierbar ist. Anschließend kann die Immunzellrekrutierung zum Entzündungsfokus über die Zeit beobachtet werden.

4.5 Methoden der Datenauswertung

4.5.1 Erstellung von Videos aus den Rohdaten

Wie bereits in **Kapitel 4.4.2** erwähnt, entstehen durch die Raster-Scan-Methode des 2-Photonen-Mikroskops *in vivo*-Schnittbilder des Gewebes. Der Scanbereich und die Anzahl der Pixel sowie der Abstand zwischen den einzelnen Schnittbildern werden zuvor eingestellt. Für die Anfertigung der Bilder in dieser Arbeit wurden ein Bildausschnitt von $588 \times 588 \mu\text{m}$, eine Pixelzahl von 515×515 und ein Schnittbildabstand von $3 \mu\text{m}$ in der Z-Achse gewählt. Der Laser tastet das Gewebe dabei in der Z-Achse in einem gewählten Bereich von $30\text{-}50 \mu\text{m}$ ab, sodass mehrere horizontale Schnittbilder

generiert werden. Nach der Generation eines Schnittbildstapels wird 30 s gewartet, bevor ein neuer Schnittbildstapel entsteht. Ein Stapel dieser Schnittbilder (z-Stacks) kann später in Form von Rohdaten auf einen Computer übertragen und mit einem speziellen Software-Programm (Velocity) zu einem dreidimensionalen Bild verarbeitet werden. Dabei kann aus mehreren z-Stacks ein 3-D-Video generiert werden, welches die Prozesse der Immunzellrekrutierung über einen bestimmten Zeitraum *in vivo* darstellt (siehe **Abb. 4.5**) (100).

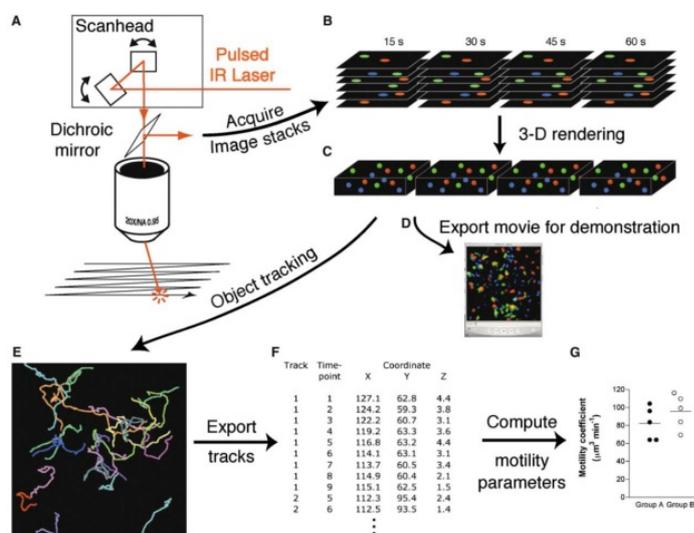


Abbildung 4.5: Schritte der Datenanalyse und Generierung

Quelle: Sumen et al, 2004, S. 319

A-B) In einem ersten Schritt entstehen durch die Raster-Scan-Methode des 2-Photonen-Lasers mehrere horizontale Schnittbildstapel. C) Anschließend werden die Schnittbildstapel zu einem 3-D-Bild zusammengesetzt. D) Durch den Export der Rohdaten auf einen Computer können mithilfe eines Software-Programms 3-D-Videos erstellt werden. E-F) Aus den Videos können mit dem Programm Zells-Tracks generiert und spezifische Migrationsparameter berechnet werden. G) Die Daten werden anschließend statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt.

4.5.2 Auswertung der Daten mithilfe von Velocity Tools

Nach der Herstellung der Videos muss das Migrationsverhalten der zu untersuchenden Zellpopulationen quantifiziert werden, um Rückschlüsse auf ihre Funktion während der Immunzellrekrutierung ziehen zu können. Um diese entscheidenden Daten zu

gewinnen, wird ebenfalls mit dem speziellen Software-Programm Velocity (PerkinElmer) gearbeitet, das über eine große Bandbreite an Imaging Tools verfügt und durch die Berechnung von so genannten Tracking-Parametern eine Quantifizierung ermöglicht.

Zunächst muss der Weg einer jeden einzelnen Zelle verfolgt (getrackt) werden, indem die Lokalisation der Zelle zu jedem Zeitpunkt markiert wird. Hierbei können viele Artefakte entstehen, sodass auch das Tracking der Zellen geschult sein sollte. Zum Beispiel muss darauf geachtet werden, dass eine Zelle nicht doppelt getrackt oder nach einer Interaktion auf einem falschen Weg weiterverfolgt wird. Die Erstellung eines sogenannten Track-Plots, kann Informationen über die generelle Ausrichtung der Zellen im Raum geben. Dabei wird die Startposition einer jeden Zelle zu demselben Punkt im Raum verschoben, während die Orientierung der Zellen beibehalten wird (siehe **Abb. 4.6.**) (101).

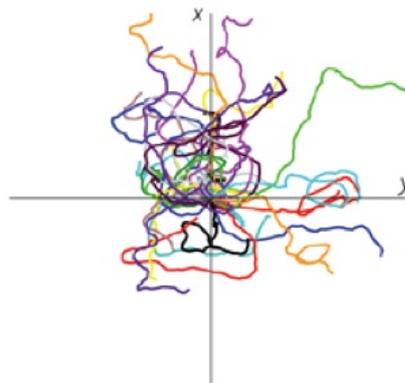


Abbildung 4.6: Darstellung eines Track-Plots

Quelle: Beltman et al, 2009, S. 790

Durch die Darstellung eines Track-Plots kann die allgemeine Ausrichtung der Zellen im Raum dargestellt werden. Die Startposition eines jeden Zelltracks wurde zum Koordinatenursprung verschoben. Die einzelnen Zell-Tracks werden in unterschiedlichen Farben markiert und behalten ihre ursprüngliche Orientierung im Raum bei.

Die Tracking Parameter, die für die Auswertung der Daten dieser Arbeit berechnet und verwendet worden sind, beinhalten die Zellgeschwindigkeit (speed), den Me-

andering Index und die Displacement rate. Letztere geben Auskunft über die Art der Migration im Gewebe und werden im Folgenden beschrieben. Da Zellen, die gerichtet entlang eines Chemokin-Gradienten migrieren, eine höhere Geschwindigkeit aufweisen, stellt die Migrationsgeschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{sec}$) einen wichtigen Parameter dar. Die Hauptgeschwindigkeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten kann berechnet werden, indem man die Distanz, die die Zelle zurückgelegt hat, durch die Zeit zwischen diesen beiden Zeitpunkten teilt. Da diese Strecke in der Realität nicht vollständig gerade ist, handelt es sich nur um eine Annäherung an die tatsächliche Zellgeschwindigkeit. Die Berechnung wird umso genauer, je kürzer dieses Zeitintervall gewählt wird. Das Displacement einer Zelle ist die kürzeste Distanz zwischen zwei

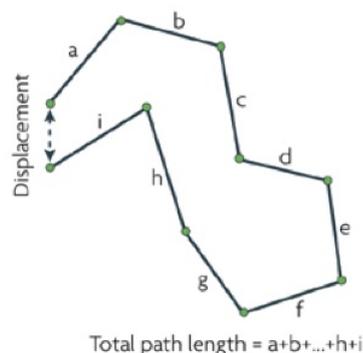


Abbildung 4.7: Darstellung von den Migrationsparametern Displacement rate und Meandering Index

Quelle: Beltman et al, 2009, S. 790

Die Displacement-Distanz ist die kürzeste Strecke zwischen einem Startpunkt eines Zell-Tracks und einem Endpunkt (gestrichelter Pfeil). Setzt man diese Distanz in Relation zu der Zeit, die eine Zelle für den kompletten Migrationsweg benötigt, erhält man die Displacement rate. Wird die Displacement-Distanz durch den totalen Migrationsweg ($a+b+\dots+h+i$) einer Zelle geteilt, erhält man den Meandering Index.

Positionen an zwei verschiedenen Zeitpunkten (siehe **Abb. 4.7**). Dabei wird eine virtuelle gerade Linie zwischen diesen beiden Punkten gezogen. Die tatsächliche Distanz, die eine Zelle zwischen diesen beiden Positionen zurücklegt, ist jedoch länger, da die Zelle unter physiologischen Bedingungen nicht exakt auf gerader Strecke migriert. Wird die Displacement-Distanz in Relation zu der Zeit gesetzt, die eine Zelle für den tatsächlichen Migrationsweg zwischen den beiden Zeitpunkten benötigt, erhält man

die Displacement rate ($\mu\text{m}/\text{sec}$) und somit eine Aussage darüber, wie schnell die Zelle Strecken im interstitiellen Gewebe zurücklegt (siehe **Abb. 4.7**). Zellen, die gerichtet migrieren und sich bspw. entlang eines Chemokin-Gradienten durch das Gewebe bewegen, nehmen weniger Umwege und nähren sich der virtuellen Migrationslinie. Sie benötigen für die tatsächliche Strecke weniger Zeit als ungerichtet migrierende oder interagierende Zellen. Der Meandering Index (auch chemotaktischer Index genannt) ist ein Maß für die Zielgerichtetheit, mit der eine Zelle zum Fokus der Entzündung migriert (siehe **Abb. 4.7**). Dabei wird die Displacement-Distanz eines Zell-Tracks in Relation zu dem totalen Weg, den eine Zelle zurückgelegt hat, gesetzt. Dieser Wert kann zwischen 0, einem zirkulären Migrationsweg, sodass die Zelle exakt zur Startposition zurückkehrt, und 1, einem exakt geraden Migrationsweg, variieren (101).

Die rekrutierten Monozyten wurden in dieser Arbeit anhand der Fluoreszenzintensität in Subpopulationen unterteilt. Diese wurde mit einem Imaging-Tool des Volocity Software-Programms gemessen. Hierfür wird die Zelle in der befindlichen Ebene definiert dargestellt und vergrößert. Anschließend wird die Zelle in dem Modus des entsprechenden Image-Tools umkreist und die Fluoreszenz der Zelle gemessen. Das Programm generiert dabei die maximal und minimal gemessene Fluoreszenzintensität der Zelle. In dieser Arbeit wurde jeweils die maximale Fluoreszenzintensität verwendet. Zudem wurden die Zellen in dieser Arbeit nach Abständen vom Fokus der Laserletzung in nah und fern migrierende Zellen unterteilt. Die Messung der Distanz in μm gelingt ebenfalls mit Hilfe eines Volocity-Tools. Dazu wird die Zelle in der entsprechenden Ebene klar dargestellt und mithilfe des Tools eine gerade Linie von der Zelle bis zum Fokus der Verletzung gezogen. Das Programm berechnet anschließend die entsprechende Distanz.

4.5.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der quantitativ zu erfassenden Daten gelingt mithilfe des Programms SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc.(SSI), San Jose, California, USA). Dabei werden jeweils zwei Gruppen gegenübergestellt und auf einen signifikanten Un-

terschied untersucht. Zunächst führt das Programm einen Shapiro-Wilk-Test durch, um zu ermitteln, ob eine Normalverteilung vorliegt. Anschließend werden die Varianzen in den zu untersuchenden Gruppen auf Gleichheit untersucht (Varianzhomogenität). Wenn beide Tests positiv ausfallen, wird der t-Test angewendet. Wenn der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung negativ ausfällt, wird der Mann-Whitney ausgeführt. Die ermittelten Einzelwerte werden als Streudiagramme in Form von Dotplots mithilfe des Software-Programms SigmaPlot erstellt und in dem Grafik- und Zeichenprogramm Adobe Illustrator grafisch dargestellt. Als statistisch signifikant wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ ($p < 0.05$) angesetzt.

5 Ergebnisse

In dieser Arbeit liegt das Augenmerk auf der Betrachtung der Rekrutierungsmechanismen von Monozyten *in vivo* an dem Modell der sterilen Inflammation. Zusätzlich wird die Auswirkung des Chemokins Fractalkine auf die Rekrutierung von Monozyten anhand von transgenen Mäusen untersucht. Hierbei wird vor allem deren Migrationsverhalten im interstitiellen Gewebe vom Zeitpunkt des Austritts aus der postkapillären Vene bis zum Erreichen des Fokus der Laserverletzung analysiert. Während die Rolle von Monozyten in der infekt-assoziierten Entzündung weitreichend untersucht wurde, ist über die Rolle und Koordination von Monozyten während der sterilen Inflammation und deren Migrationsmechanismen in nicht-lymphoiden Gewebe wenig bekannt (86)(55). Eine Quantifizierung des Migrationsverhaltens gelang in dieser Arbeit anhand von Zelltracking und der Berechnung von spezifischen Tracking-Parametern (siehe **Kapitel 4.5.2**). Durch Langzeit-Imaging-Aufnahmen mit dem 2-Photonen-Mikroskop konnten drei verschiedene Rekrutierungsphasen aufgedeckt und die Rekrutierung von Monozyten auf zellulärer Ebene in der Mikrozirkulation der Haut visualisiert werden.

5.1 Mechanismen der Rekrutierung von Monozyten im interstitiellen Gewebe

5.1.1 Rekrutierung von Monozyten ohne Differenzierung in Subpopulationen

Monozyten nehmen in der infektiös bedingten Entzündung eine wichtige Rolle bei der Induktion, der Koordination und Auflösung des Geschehens ein und werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten zum Ort der Entzündung rekrutiert (51). Die

Rolle von Monozyten bei der sterilen Inflammation ist dahingegen noch nicht ausreichend erforscht. Auf dem Weg durch nicht-lymphoides interstitielles Gewebe werden Leukozyten von unterschiedlichen Chemokinrezeptor-Achsen koordiniert und weisen ein spezifisches Migrationsmuster auf (86). Die einflussnehmenden Faktoren auf die Koordination von Monozyten im entzündeten Gewebe sind jedoch noch nicht ausreichend verstanden. Fokus dieser Arbeit ist es, die Migrationsmechanismen von Monozyten in der sterilen Entzündung zu untersuchen. Hierfür wurden für die aus den generierten Videos erfassten Zell-Tracks bestimmte Migrationsparameter berechnet. Dadurch gelang eine Quantifizierung des Migrationsverhaltens, und es konnten Aussagen über die Art der Zellmigration bezüglich der Geschwindigkeit oder der Zielgerichtetheit im Gewebe getroffen werden.

Zunächst sollen in diesem Zusammenhang die Versuche mit heterozygoten Tieren betrachtet werden. Hier konnte das Zellmigrationsverhalten zu einem frühen (nach 3 bis 4 h), einem mittleren (nach 4 bis 5 h) und einem späten (nach 5 bis 6 h) Zeitpunkt nach der Platzierung des Laserschadens quantifiziert werden, sodass mehrere Zellrekrutierungsphasen während der sterilen Entzündung betrachtet werden konnten. In einem ersten Schritt wurde das Augenmerk nur auf die Rekrutierung von Monozyten ohne eine Differenzierung in Subpopulationen gelegt. **Abb. 5.1** zeigt das Migrationsverhalten von Monozyten zu verschiedenen Zeitpunkten der sterilen Entzündung auf. Aus den gewonnenen Daten wird ersichtlich, dass die Zellen vor allem in den ersten drei bis vier Stunden nach der Platzierung des Laserschadens ein sehr zielgerichtetes Migrationsverhalten aufwiesen. Dies wird anhand der signifikanten Unterschiede bezüglich der Parameter Meandering Index ($p = 0.002$) und Displacement rate ($p = 0.018$) ersichtlich, die für eine erhöhte Mobilität und Zielorientierung der Zellen im Gewebe stehen. In den späteren Phasen der sterilen Entzündungsreaktion war das Migrationsverhalten der Zellen im Vergleich zu den ersten drei bis vier Stunden weniger zielgerichtet, es konnten für diesen Zeitraum keine signifikanten Veränderungen für die erwähnten Parameter ermittelt werden (siehe **Abb. 5.1 a und c**). Die Geschwindigkeit der getrackten Monozyten wurde vor

allem in der Endphase und im Verlauf des Entzündungsgeschehens signifikant höher.

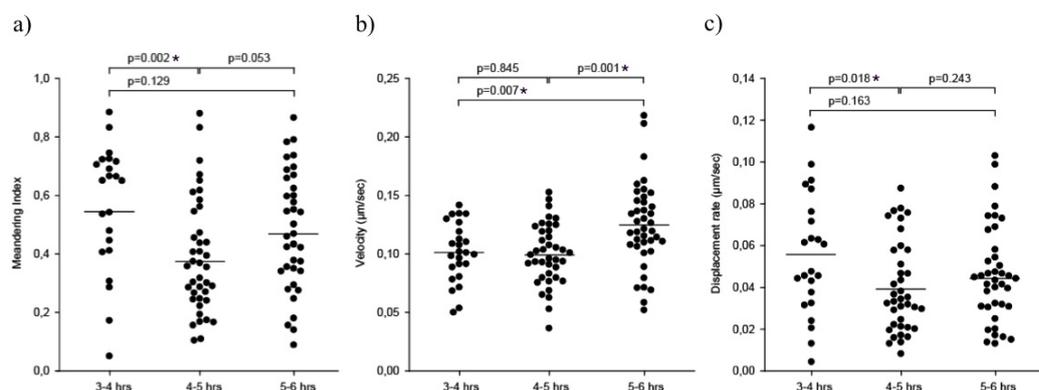


Abbildung 5.1: Migrationsverhalten von Monozyten zu verschiedenen Zeitpunkten des sterilen Entzündungsgeschehens

Darstellung verschiedener Zeitpunkte des sterilen Entzündungsgeschehens in Abhängigkeit von den Tracking-Parametern a) Meandering Index, b) Velocity (Geschwindigkeit) und c) Displacement rate in heterozygoten CX3CR1-GFP-Mäusen. Die einzelnen Punkte stehen für die getrackten Zellen. Die schwarz markierte Linie entspricht dem errechneten Mittelwert. Signifikante Werte ($p < 0.05$) sind mit * markiert. Versuchsgruppenanzahl $n = 3$.

Innerhalb der ersten drei bis vier Stunden verzeichnete die Geschwindigkeit dahingegen keine statistisch signifikanten Unterschiede (Siehe **Abb. 5.1 b**).

Zusammenfassend kann aus den Daten für die Versuche an heterozygoten CX3CR1-GFP-Tieren somit gezeigt werden, dass eine zielgerichtete Zellmigration der Monozyten vor allem zu Beginn der Entzündungsreaktion beobachtet werden konnte, wohingegen die Zellgeschwindigkeit in diesem Zeitraum nicht signifikant erhöht war. Das zielorientierte Migrationsverhalten der Zellen wurde zu späteren Zeitpunkten der Entzündungsreaktion geringer, während die Migrationsgeschwindigkeit im Verlauf der Zeit zunahm.

Immunzellen unterliegen im Gewebe dem Einfluss von verschiedenen Chemokinrezeptor-Achsen und weisen je nach Sättigungsgrad ihrer Rezeptoren ein gerichtetes oder ungerichtetes Migrationsverhalten auf (29). Um in einem weiteren

Schritt eine Aussage über einflussnehmende Faktoren bei der Immunzellrekrutierung treffen zu können, wurde das Migrationsverhalten der Monozyten an unterschiedlichen Positionen im Gewebe in Relation zu der Entfernung vom Fokus der Entzündung quantifiziert. Hierfür wurden die Zellen in zwei Gruppen eingeteilt: Monozyten, die in der Nähe ($< 100 \mu\text{m}$) der Laserverletzung migrieren, und Zellen, die sich in einem weiterem Abstand ($>100 \mu\text{m}$) vom Fokus des Entzündungsgeschehens aufhalten. Die für die getrackten Zellen berechneten Migrationsparameter wurden bezüglich der beiden Gruppen miteinander verglichen (siehe **Abb. 5.2**).

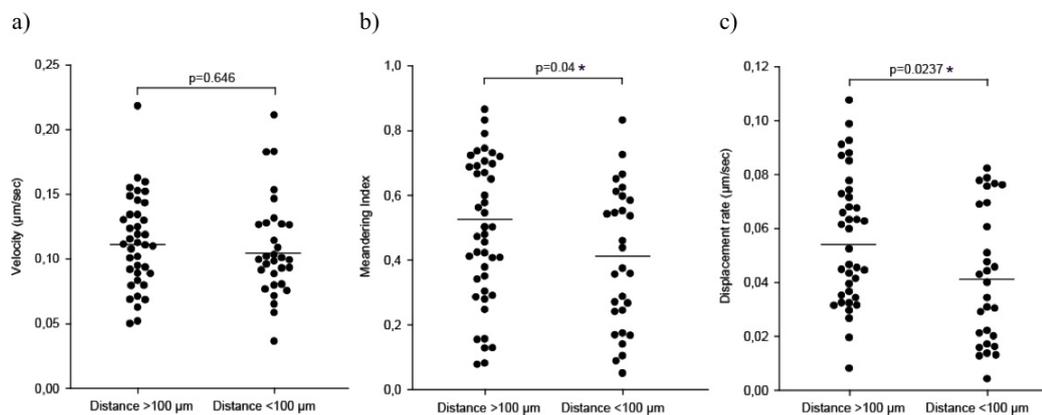


Abbildung 5.2: Migrationsverhalten von Monozyten an unterschiedlichen Lokalisationen im Gewebe auf dem Weg zum Fokus der Verletzung

Darstellung von zwei verschiedenen Abständen (Distanz $> 100 \mu\text{m}$ und Distanz $< 100 \mu\text{m}$) der Monozyten vom Fokus des sterilen Entzündungsgeschehens in Abhängigkeit von den Tracking-Parametern a) Velocity (Geschwindigkeit), b) Meandering Index und c) Displacement rate in heterozygoten CX3CR1-GFP-Mäusen. Die einzelnen Punkte stehen für die getrackten Zellen. Die schwarz markierte Linie entspricht dem errechneten Mittelwert. Signifikante Werte ($p < 0.05$) sind mit * markiert. Versuchsgruppenanzahl $n = 3$.

Aus der in **Abb. 5.2** dargestellten Grafik wird ersichtlich, dass Zellen, die in einem entfernteren Bereich von dem Fokus der Verletzung migrierten, ein zielgerichteteres Migrationsverhalten aufwiesen als Zellen, die sich in unmittelbarer Nähe des Schadens befanden. Dieser Rückschluss begründet sich durch signifikante Veränderungen der Parameter Meandering Index ($p = 0.04$) und Displacement rate ($p = 0.0237$) in einem Migrationsbereich von $> 100 \mu\text{m}$ Abstand von der Laserverletzung. Die Zellgeschwin-

digkeit war dagegen für die Versuche mit heterozygoten CX3CR1-GFP-Mäusen nicht abhängig von der Lokalisation der Zellen zum Schaden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es vor allem bei den Zellen, die sich in einem größeren Abstand zum Laserschaden befanden, zu einer vermehrt zielgerichteten Orientierung kam, während die Geschwindigkeit der Zellen nicht abhängig von der Position der Zellen im Gewebe auf dem Weg zum Schaden war.

5.1.2 Charakterisierung der Monozytensubpopulationen

In der Maus können zwei Subpopulationen von Blutmonozyten differenziert werden, die jeweils einer Population im Menschen entsprechen. Sie lassen sich anhand ihres unterschiedlichen Expressionsmusters von Oberflächenmarkern differenzieren. Zudem

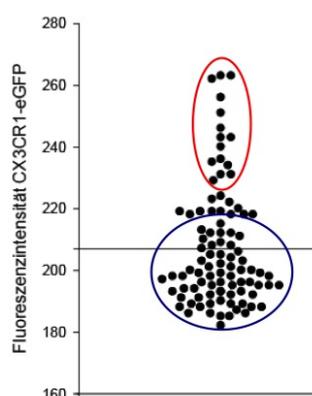


Abbildung 5.3: Darstellung der hell und schwach fluoreszierenden Zellpopulationen mittels eines Dotplots in Abhängigkeit von der maximalen Zellfluoreszenzintensität in heterozygoten CX3CR1-GFP-Mäusen

Die dargestellten Punkte entsprechen den einzelnen getrackten Zellen, wobei die hell fluoreszierenden CX3CR1^{high}-Monozyten (rote Umrandung) sich oberhalb der Mittelwertlinie des gesamt gemessenen Zellfluoreszenzintervalls (schwarze Markierung) und die schwach fluoreszierenden CX3CR1^{low}-Monozyten (dunkelblaue Umrandung) sich unterhalb dieses Wertes befinden. Versuchsgruppenanzahl n = 3.

erfüllen sie unterschiedliche Funktionen unter physiologischen und inflammatorischen Bedingungen (38)(48). Für eine Differenzierungsmöglichkeit zwischen den beiden Subpopulationen wurden diese zunächst charakterisiert. Wie bereits in **Kapitel 4.2.2**

erwähnt, wurden für die Versuche dieser Arbeit CX3CR1-GFP-Mäuse verwendet, sodass unter dem 2-Photonen-Mikroskop alle Fractalkine-Rezeptor-exprimierenden Zellen grünes Licht emittierten. Die Blutmonozyten konnten somit in der Mikrozirkulation und im interstitiellen Gewebe der Haut visualisiert werden. Die Untersuchung ihrer Rekrutierung in interstitielles Gewebe und zum Fokus der sterilen Entzündung wurde dadurch möglich. Die residenten Ly6C^{low}-Monozyten, die CX3CR1 in hohen Mengen exprimieren, weisen eine höhere Fluoreszenzintensität auf als die inflammatorischen Ly6C^{high}-Monozyten, die den Rezeptor nur in geringen Mengen aufweisen (siehe **Abb. 5.4**) (57). Aus diesem Grund wurden die Monozyten in dieser Arbeit

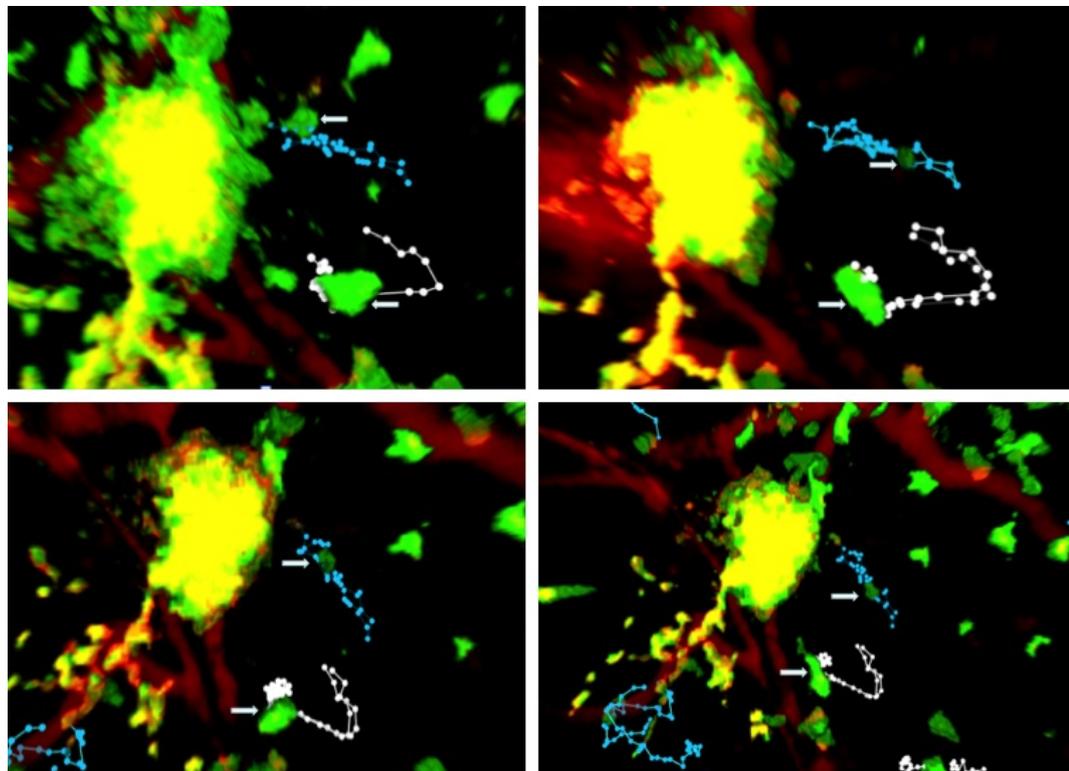


Abbildung 5.4: Darstellung von hell und schwach fluoreszierenden Monozyten unter dem 2-Photonen-Mikroskop

Die vier Bilder zeigen Monozyten (grün) in der Haut einer CX3CR1-GFP-Maus, die in unmittelbarer Nähe zur Laserverletzung (gelber autofluoreszierender Bereich) getrackt wurden. Die Zellen sind mit einem weißen Pfeil markiert. Die Tracking-Linien der hell fluoreszierenden CX3CR1^{high}-Monozyten sind weiß markiert. Die Tracking-Linien der schwach fluoreszierenden CX3CR1^{low}-Monozyten sind in Blau dargestellt. Die Gefäße sind mit TRITC Dextran in Rot dargestellt. Maßstab = 50 μ m.

anhand ihrer GFP-Fluoreszenzintensität in Subpopulationen unterteilt, um deren Rekrutierungsmechanismen zu analysieren und zu vergleichen.

Zunächst wurden aus den generierten Videos geeignete Monozyten getrackt und deren Fluoreszenzintensität mithilfe des Software-Programms Volocity ermittelt (Siehe **Kapitel 4.5.2**). Anschließend wurden die Zellen anhand der Fluoreszenzintensität in zwei Gruppen unterteilt. Um zusätzlich die Auswirkung des Fractalkine-Rezeptors auf die Rekrutierung der Monozyten zu untersuchen, wurde neben der Versuchsgruppe mit heterozygoten CX3CR1-GFP-ki/wt-Tieren auch eine Vergleichsgruppe mit homozygoten CX3CR1-GFP-ki/ki-Tieren durchgeführt. Anhand der GFP-Fluoreszenzintensität können zwei Populationen unterschieden werden: In **Abb. 5.3** ist die Gesamtheit der Zellanzahl aller Versuchsreihen in Form eines Dotplots in heterozygoten Tieren in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität dargestellt. Die Unterscheidung in CX3CR1^{low}- und CX3CR1^{high}-Monozyten gelang anhand der Orientierung am Mittelwert der maximalen Fluoreszenzintensität. Ein ähnliches

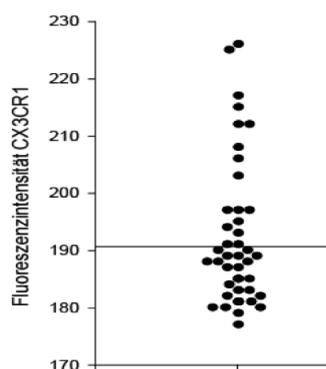


Abbildung 5.5: Darstellung der hell und schwach fluoreszierenden Zellpopulationen mittels eines Dotplots in Abhängigkeit von der maximalen Zellfluoreszenzintensität in homozygoten CX3CR1-GFP-Mäusen

Die dargestellten Punkte entsprechen den einzelnen getrackten Zellen, wobei die hell fluoreszierenden CX3CR1^{high}-Zellen sich oberhalb der Mittelwertlinie des gesamt gemessenen Zellfluoreszenzintervalls (schwarze Markierung) und die schwach fluoreszierenden CX3CR1^{low}-Zellen sich unterhalb dieses Wertes befinden. Versuchsgruppenanzahl $n = 3$.

Verteilungsmuster von hell und schwach fluoreszierenden Zellen lässt sich auch in den

Versuchen mit homozygoten CX3CR1-GFP-Mäusen darstellen (siehe **Abb. 5.5**). In allen drei Versuchsreihen konnten mehr dunkel als hell fluoreszierende Zellen ermittelt werden.

5.1.3 Rekrutierung von Monozyten mit Differenzierung in zwei Subpopulationen

Die in dieser Arbeit untersuchten Monozyten-Subpopulationen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Rekrutierungszeitpunkte und bezüglich der einflussnehmenden Faktoren im Gewebe während einer Entzündungsreaktion infektiöser Genese (51).

Zunächst wurden die beiden Subpopulationen anhand ihres Migrationsverhaltens gegenübergestellt. Die Daten in **Abb. 5.6** zeigen, dass die beiden Monozytensubpopulationen ein unterschiedliches Migrationstionsverhalten im interstitiellen Gewebe während der Entzündungsreaktion aufwiesen.

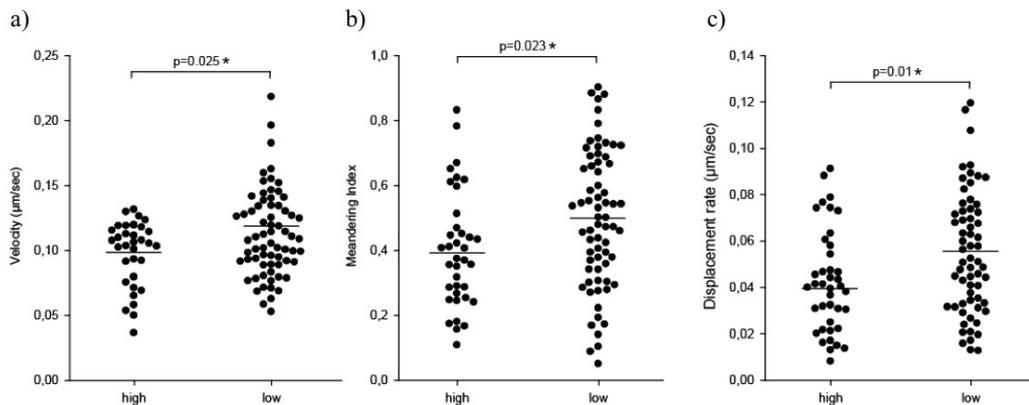


Abbildung 5.6: Migrationsverhalten von inflammatorischen CX3CR1^{low}- und residenten CX3CR1^{high}-Monozyten im interstitiellen Gewebe

Darstellung der zwei Monozytensubpopulationen CX3CR1^{high} und CX3CR1^{low} in Abhängigkeit von den Tracking-Parametern a) Velocity (Geschwindigkeit), b) Meandering Index und c) Displacement rate. Die einzelnen Punkte stehen für die getrackten Zellen. Die schwarz markierte Linie entspricht dem errechneten Mittelwert. Signifikante Werte ($p < 0.05$) sind mit * markiert.

Alle drei berechneten Zellmigrationsparameter unterschieden sich signifikant zwi-

schen den beiden untersuchten Zellpopulationen $CX3CR1^{low}$ und $CX3CR1^{high}$. Die inflammatorischen $CX3CR1^{low}$ -Monozyten migrierten insgesamt schneller durch das Gewebe als die residenten $CX3CR1^{high}$ -Monozyten, wie es der signifikante p-Wert von $= 0.025$ belegt. Zudem wanderten die $CX3CR1^{low}$ -Zellen zielorientierter auf ihrem Weg zu der Verletzung und konnten schneller mobilisiert werden (siehe **Abb. 5.6 b und c**). Die residenten $CX3CR1^{high}$ -Zellen waren dahingegen langsamer und weniger zielorientiert auf ihrem Weg zum Fokus des Schadens. Um eine generelle Ausrichtung der Zellen im Raum zu veranschaulichen, wurde jeweils ein Trackplot für die $CX3CR1^{low}$ - und $CX3CR1^{high}$ -Zellpopulation generiert. Dieser ist für die jeweilige Population in **Abb. 5.7** dargestellt und veranschaulicht die Ausrichtung der Zellen zur Laserverletzung. Die Zellen sind durch ihre farblich unterschiedlich markierten Migrationsrouten gekennzeichnet. Aus den beiden Grafiken wird eben-

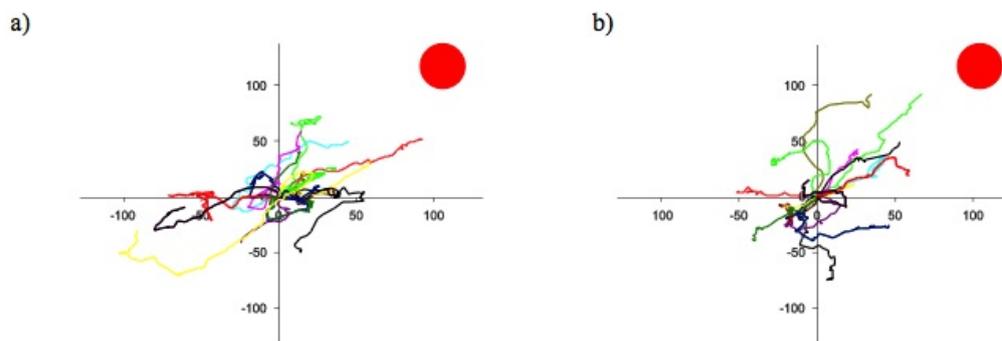


Abbildung 5.7: Ausrichtung der $CX3CR1^{high}$ - und $CX3CR1^{low}$ -Monozytenpopulation zum Laser Schaden im Raum

Darstellung der Zellorientierung im Raum anhand eines Track Plots a) high (residente) Monozytenpopulation vs b) low (inflammatorische) Monozytenpopulation. Die Laserverletzung ist durch einen roten Kreis gekennzeichnet. Die einzelnen Migrationswege der Zellen werden in Form von Linien dargestellt und sind farblich unterschiedlich markiert.

falls ersichtlich, dass die inflammatorischen $CX3CR1^{low}$ -Monozyten eine gezieltere Ausrichtung zu dem Laserschaden hatten als die residenten $CX3CR1^{high}$ -Monozyten deren Zell-Tracks eine weniger koordinierte Orientierung im Raum aufzeigten.

Zusammenfassend wiesen die inflammatorischen $CX3CR1^{low}$ -Monozyten ein ziel-

gerichteteres Migrationsverhalten im interstitiellen Gewebe auf als die residenten CX3CR1^{high}-Monozyten und wanderten schneller durch das Gewebe.

5.2 Auswirkung von Fractalkine auf die Rekrutierung von Monozyten

Wie in **Kapitel 4.2.2** beschrieben, wurden für die Versuche dieser Arbeit transgene CX3CR1-GFP-Mäuse verwendet. Dabei wurden zwei Versuchsgruppen angefertigt. Eine Versuchsgruppe wurde an Mäusen mit einem knock-in in heterozygoter und eine mit einem knock-in in homozygoter Form durchgeführt. Die heterozygoten Tiere verfügen noch über den Fractalkine-Rezeptor, wohingegen die homozygoten Tiere keinen Fractalkine-Rezeptor mehr aufweisen. Die Versuchsergebnisse, die aus den Versuchen mit heterozygoten Tieren gewonnen wurden, sind bereits in den vorherigen Kapiteln veranschaulicht worden. Im Folgenden sollen nun auch die Daten aus den Untersuchungen an homozygoten Tieren dargestellt und mit den Ergebnissen aus den Versuchen an heterozygoten Tieren verglichen werden. Durch das Gegenüberstellen dieser zwei Versuchsgruppen kann ein Rückschluss auf die Auswirkungen des Chemokins Fractalkine bei der interstitiellen Rekrutierung von Monozyten gezogen werden.

5.2.1 Rekrutierung von Monozyten ohne Differenzierung in Subpopulationen

Das Chemokin Fractalkine ist ein vielseitiges Chemokin, das bei der Immunzellrekrutierung sowohl bei der zellvermittelten Adhäsion als auch bei der Koordination von Zellen im entzündeten und nicht entzündeten Gewebe eine große Rolle spielt (77). Für die Rekrutierung von Monozyten in entzündetes Gewebe und die Navigation der Zellen im Interstitium ist dieses Chemokin von großer Bedeutung (86). Um den Effekt von Fractalkine auf die Rekrutierung von Monozyten bei der sterilen Entzündung zu untersuchen, wurden, wie zuvor beschrieben, zwei Versuchsreihen an transgenen Mäusen durchgeführt.

In der folgenden Grafik wird das Migrationsverhalten von Zellen in homozygoten und heterozygoten CX3CR1-GFP-Tieren gegeneinander aufgetragen. **Abb. 5.8 a** zeigt das Migrationsverhalten der homozygoten Tiere, die nicht über den Fractalkine-Rezeptor verfügen. Das Migrationsverhalten wurde hierbei wie bereits für die heterozygoten Versuche in verschiedenen Zeiträumen des Entzündungsprozesses untersucht, sodass mehrere Rekrutierungsphasen während der sterilen Entzündung betrachtet werden konnten. Die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen in homozygoten

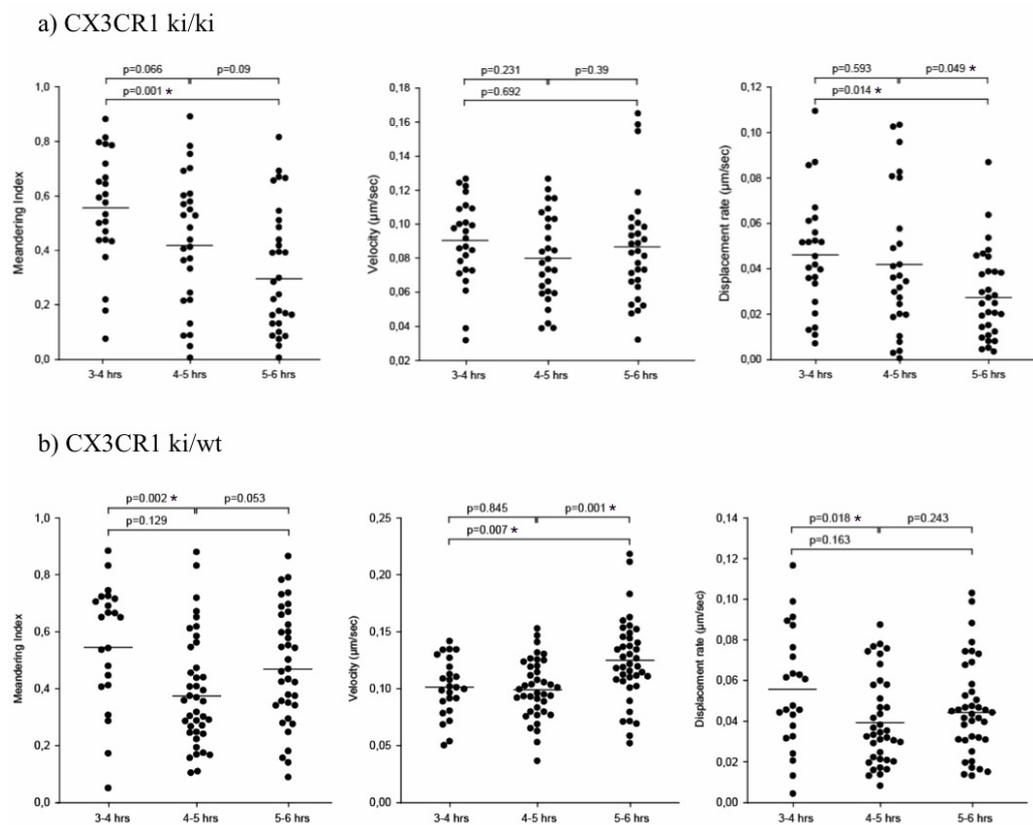


Abbildung 5.8: Auswirkung von Fractalkine auf das Migrationsverhalten von Monozyten im Interstitium

Darstellung von unterschiedlichen Zellrekrutierungsphasen in Anhängigkeit von dem Migrationsparametern Meandering Index, Geschwindigkeit (Velocity) und Displacement rate in a) homozygoten CX3CR1-Mäusen (ki/ki), exprimieren den Fractalkine-Rezeptor nicht b) heterozygoten CX3CR1-Mäusen (ki/wt), exprimieren den Fractalkine-Rezeptor. Die einzelnen getrackten Zellwege sind durch schwarze Punkte markiert. Signifikante Werte ($p < 0.05$) sind mit * gekennzeichnet.

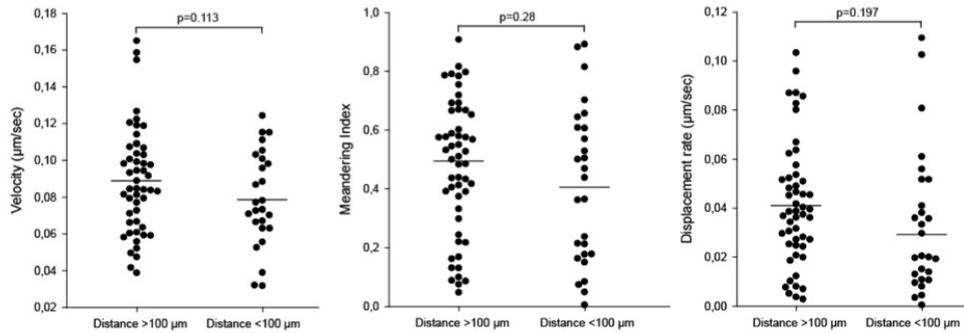
Mäusen zeigte sich über einen Verlauf von sechs Stunden nicht signifikant verändert.

In heterozygoten Mäusen dahingegen wanderten die Zellen vor allem im Verlauf nach vier bis sechs Stunden signifikant schneller durch das Gewebe. Das Chemokin Fractalkine hatte demnach eine Auswirkung auf die Geschwindigkeit der Monozyten im interstitiellen Gewebe. Zellen der heterozygoten Versuchsgruppe migrierten zudem vor allem in den ersten drei bis vier Stunden zielorientierter durch das Gewebe als in der homozygoten Versuchsgruppe und konnten schneller mobilisiert werden. Die Abwesenheit des Fractalkine-Rezeptors in homozygoten Mäusen wirkte sich somit auf die Zielorientiertheit und Mobilisierbarkeit der Zellen signifikant aus. Im Verlauf der Zeit migrierten die Zellen weniger zielorientiert durch das Gewebe, wie es die signifikanten p-Werte in **Abb. 5.8 a** bezüglich der Parameter Displacement rate und Meandering Index darlegen. Die Abwesenheit des Rezeptors hatte somit Auswirkungen auf die Zellgeschwindigkeit und auf die Zielorientierung der Monozyten auf dem Weg durch interstitielles Gewebe zum Fokus des Entzündungsgeschehens.

In einem weiteren Schritt wurden nun wie zuvor für die heterozygote Versuchsgruppe in **Kapitel 5.1** zwei Zellabstände vom Fokus des Entzündungsgeschehens gewählt, um das Migrationsverhalten der Monozyten in einem fernerem ($>100 \mu\text{m}$) und einem näheren ($<100 \mu\text{m}$) Migrationsbereich von der Laserverletzung zu untersuchen. In **Abb. 5.9** wird das Migrationsverhalten der Monozyten in Abhängigkeit von den beiden gewählten Migrationsbereichen dargestellt. Aus den dargestellten Daten wird ersichtlich, dass Zellen, die in verschiedenen Abständen um die zentrale Entzündungsstelle in homozygoten CX3CR1-Mäusen migrierten, keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Migrationsverhaltens untereinander aufzuweisen hatten (**Abb. 5.9 a**).

In heterozygoten Mäusen kam es dahingegen zu signifikanten Unterschieden zwischen der Zellgruppe, die unmittelbar in der Nähe der Verletzung migrierte, und der Zellgruppe, die weiter entfernt von diesem Fokuspunkt durch das Gewebe wanderte. Zellen, die in einem fernerem Radius vom Entzündungsfokus getrackt wurden, migrierten zielgerichteter durch das Gewebe, als Zellen die sich in unmittelbarer Nähe zu der Laserverletzung befanden. Das Chemokin Fractalkine hatte somit vor

a) CX3CR1 ki/ki



b) CX3CR1 ki/wt

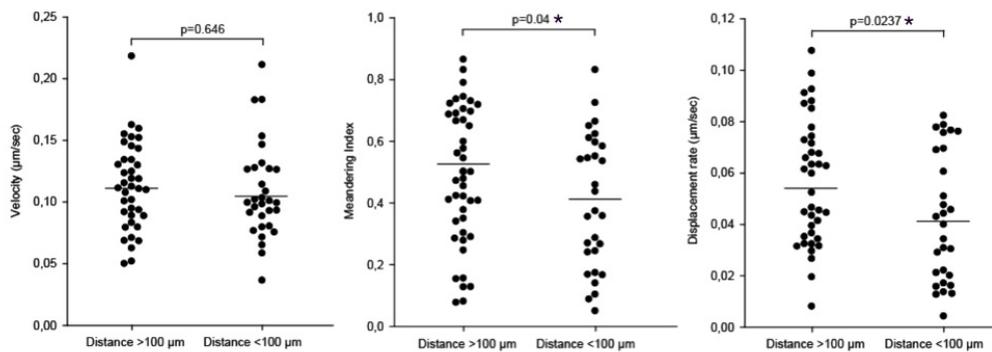


Abbildung 5.9: Verschiedene Migrationszonen von Monozyten im interstitiellen Gewebe auf dem Weg zu der Gewebeverletzung

Darstellung von zwei unterschiedlichen Migrationsabständen nah (<100 µm) und fern (>100 µm) vom Fokus der Laserverletzung in Anhängigkeit von dem Migrationsparametern Geschwindigkeit (Velocity), Meandering Index und Displacement rate in a) homozygoten CX3CR1-Mäusen (ki/ki) und b) heterozygoten CX3CR1-Mäusen (ki/wt). Die einzelnen getrackten Zellwege sind durch schwarze Punkte markiert. Signifikante Werte ($p < 0.05$) sind mit * gekennzeichnet.

allem unmittelbar nach dem Austritt der Monozyten aus dem Gefäß im interstitiellen Gewebe einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen und wirkte vermehrt in dieser entfernteren Zone vom Entzündungsfokus auf die entsprechenden Zielzellen ein.

Zusammenfassend kann hier gezeigt werden, dass der Fractalkine-Rezeptor eine Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten im interstitiellen Gewebe bei der sterilen Inflammation spielte. Er wirkte sich auf die Gerichtetheit und Geschwindigkeit der

Zellen im Gewebe aus und war vor allem in einem entfernteren Bereich von der Verletzung von Bedeutung für die Zielorientierung der Zellen.

5.2.2 Rekrutierung von Monozyten mit Differenzierung in zwei Subpopulationen

In einem weiteren Schritt wurde die Auswirkung von Fractalkine auf die Rekrutierung der beiden Subpopulationen, die in **Kapitel 5.1.2** charakterisiert wurden, untersucht. Zunächst wurde anhand des ausgewerteten Videomaterials analysiert, wie viele Zellen der jeweiligen Subpopulation über einen Zeitverlauf von sieben Stunden rekrutiert wurden. Hierfür wurde die homozygote Versuchsgruppe erneut der heterozygoten Versuchsgruppe gegenübergestellt, um eine CX3CR1-abhängige Rekrutierung zu untersuchen.

In der Versuchsgruppe mit homozygoten CX3CR1-GFP-ki/ki-Mäusen war sowohl die Anzahl der rekrutierten residenten CX3CR1^{high}-Monozyten als auch die Anzahl der rekrutierten inflammatorischen CX3CR1^{low}-Monozyten im Vergleich zu der Versuchsgruppe mit heterozygoten CX3CR1-GFP-ki/wt-Mäusen vermindert (siehe **Abb. 5.10**). Vor allem die residenten CX3CR1^{high}-Monozyten wurden hierbei deutlich weniger rekrutiert. Die Abwesenheit des Fractalkine-Rezeptors wirkte sich somit auf die Rekrutierung beider Subpopulationen aus, vor allem aber auf die residenten CX3CR1^{high}-Monozyten. Der Graf für die Versuchsgruppe mit heterozygoten CX3CR1-GFP-ki/wt-Mäusen in **Abb. 5.10** zeigt für beide Monozytenpopulationen einen kontinuierlichen Anstieg über die Zeit. Die Gesamtzellzahl nahm somit in der Versuchsgruppe, die über den Fractalkine-Rezeptor verfügte, über einen Zeitraum von sieben Stunden kontinuierlich zu. Beide Populationen erlangten innerhalb der ersten zwei Stunden einen schnellen Zuwachs an Zellen. Die Zellzahl der residenten CX3CR1^{high}-Monozyten stieg dabei auch nach diesen zwei Stunden weiter an und erreichte nach circa 200 Minuten ein kurzes Plateau. Erst nach weiteren 40 Minuten nahm die Anzahl der rekrutierten Monozyten weiter zu. Nach ungefähr 300 Minuten kann ein weiteres Plateau verzeichnet werden. Innerhalb eines Zeitraums von 60

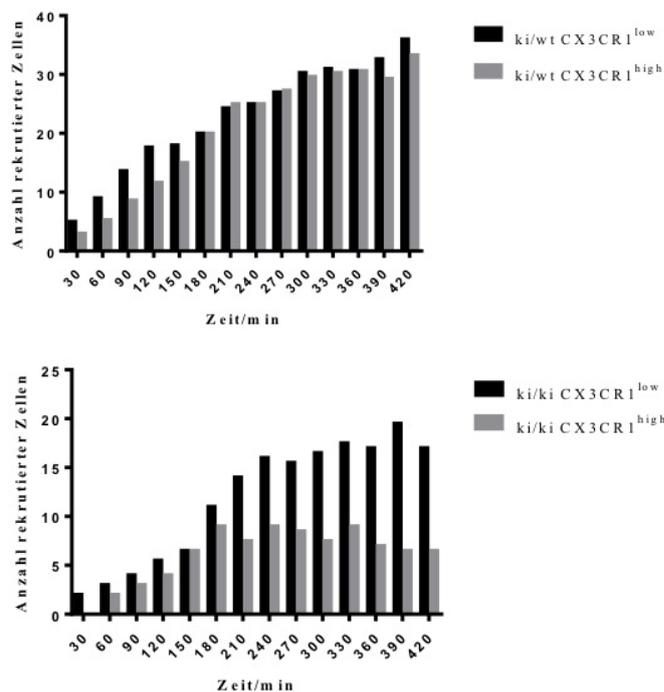


Abbildung 5.10: Anzahl der rekrutierten Zellen in homozygoten und heterozygoten CX3CR1-GFP-Tieren über die Zeit

Darstellung der rekrutierten Zellen in heterozygoten (ki/wt) und homozygoten (ki/ki) Tieren über die Zeit. Es wurden jeweils beide Subpopulationen abgebildet. Die graue Markierung entspricht der residenten CX3CR1^{high}-Monozytenpopulation. Die schwarze Markierung entspricht der inflammatorischen CX3CR1^{low}-Monozytenpopulation. Die x-Achse zeigt den Zeitverlauf des Imagings. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen die rekrutiert wurden aufgeführt.

Minuten wurden kaum zusätzliche Zellen detektiert. In der Endphase innerhalb der letzten Stunde des Imagings kam es zu einer erneuten Steigerung der rekrutierten Zellzahl an residenten CX3CR1^{high}-Monozyten in heterozygoten Mäusen. In der Versuchsgruppe mit inflammatorischen CX3CR1^{low}-Monozyten in heterozygoten Mäusen stagnierte die Anzahl der rekrutierten Zellen nach 120 Minuten für 30 Minuten. Anschließend kam es innerhalb der folgenden Stunden zu einer stetigen Zunahme der Zellzahl.

In der Versuchsgruppe mit homozygoten CX3CR1-GFP-ki/ki-Mäusen kam es dahingegen nur zu einer geringen Erhöhung der Zellzahl innerhalb der ersten drei bis

vier Stunden. Insbesondere die Zellzahl der residenten CX3CR1^{high}-Monozyten blieb vergleichend mit der heterozygoten CX3CR1-GFP-ki/wt-Versuchsgruppe niedrig (siehe **Abb. 5.10**). Nach 200 Minuten wurden für beide Subpopulationen kaum weitere Zellen rekrutiert. Fractalkine hatte somit vor allem eine Auswirkung auf die Rekrutierung während späterer Phasen der Entzündung.

Weiterhin sollte die Auswirkung von Fractalkine auf das Migrationsverhalten der Monozytensubpopulationen im interstitiellen Gewebe untersucht werden. Aus diesem Grund wurden die inflammatorischen CX3CR1^{low}-Monozyten der heterozygoten Versuchsgruppe der entsprechenden Population in homozygoten Mäusen gegenübergestellt und bezüglich des Migrationsverhaltens auf signifikante Unterschiede untersucht. Dies erfolgte ebenso für die residente CX3CR1^{high}-Monozytenpopulation (siehe **Abb. 5.11**). Sowohl die residenten CX3CR1^{high}-Monozyten (p-Wert = 0.006) als auch die inflammatorischen CX3CR1^{low}-Monozyten (p-Wert = < 0.001) wiesen dabei eine signifikant höhere Migrationsgeschwindigkeit in heterozygoten Tieren im Vergleich zu homozygoten Tieren auf. Fractalkine hatte demnach eine Auswirkung auf die Migrationsgeschwindigkeit der Monozyten in beiden Zellpopulationen.

Bezüglich der Zielgerichtetheit der residenten CX3CR1^{high}-Monozyten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der heterozygoten und homozygoten Versuchsgruppe verzeichnet werden. Inflammatorische CX3CR1^{low}-Monozyten migrierten signifikant schneller und mit einer höheren Displacement rate in der Versuchsgruppe, die den Fractalkine-Rezeptor aufwies. Eine CX3CR1-abhängige Auswirkung auf das Migrationsverhalten von Monozyten konnte in diesem Zusammenhang vor allem für die inflammatorischen CX3CR1^{low}-Monozyten festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte eine Auswirkung von Fractalkine auf das Migrationsverhalten der charakterisierten Monozyten Subpopulationen im interstitiellen Gewebe ermittelt werden. Beide Monozytenpopulationen migrierten bei Anwesenheit des Fractalkine-Rezeptors schneller durch das Gewebe als in den Versuchen, in denen die Zellen den Rezeptor nicht exprimierten. Die inflammatorischen CX3CR1^{low}-

Monozyten wiesen zudem bei Anwesenheit des Rezeptors eine höhere Displacement rate auf. Weiterhin wurden in beiden Monozytensubpopulationen bei Abwesenheit des Fractalkine-Rezeptors weniger Zellen in das entzündete Gewebe rekrutiert. Vor allem die residenten CX3CR1^{high}-Monozyten wurden in verminderter Anzahl rekrutiert.

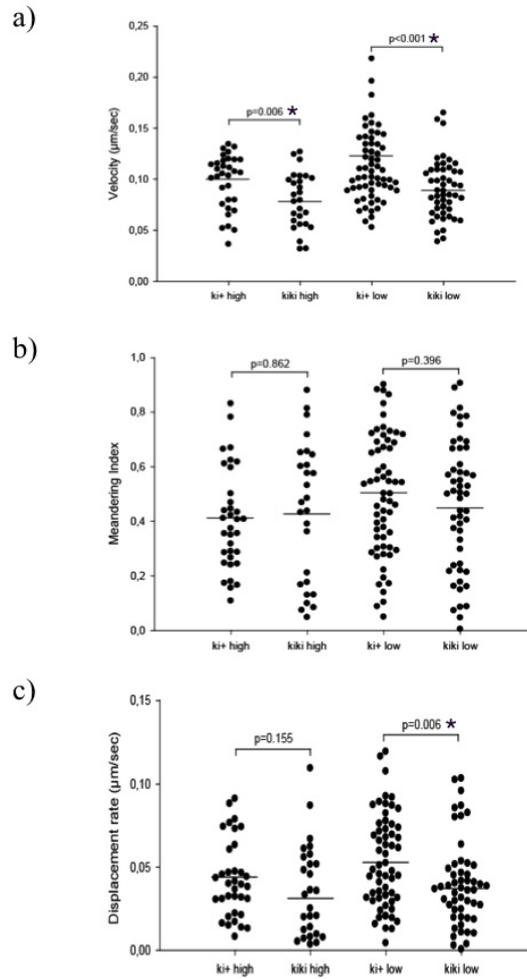


Abbildung 5.11: Auswirkung von Fractalkine auf das Migrationsverhalten der CX3CR1^{high}- und CX3CR1^{low}-Monozytensubpopulation im Intersitium

Darstellung von zwei Monozytensubpopulationen, residenten CX3CR1^{high}- und inflammatorische CX3CR1^{low}-Monozyten, in Abhängigkeit von den Tracking-Parametern a) Velocity (Geschwindigkeit), b) Meandering Index und c) Displacement rate. Das Migrationsverhalten der jeweiligen Zellpopulation in heterozygoten (ki/+) Tieren (verfügen über den Fractalkine-Rezeptor) wurden gegenüber dem Migrationsverhalten der entsprechenden Zellpopulation in homozygoten (ki/ki) Tieren (verfügen nicht über den Fractalkine-Rezeptor) aufgetragen. Die einzelnen Punkte stehen für die getrackten Zellen. Die schwarz markierte Linie entspricht dem errechneten Mittelwert. Signifikante Werte ($p < 0.05$) sind mit * markiert.

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Methoden

6.1.1 Wahl von Tierstamm und Versuchstier

In dieser Arbeit wurde die Maus als Versuchstier gewählt. Die Maus eignet sich vor allem auf Grund einer einfachen und unkompliziert durchzuführenden Aufzucht und Haltung sowie einer hohen Reproduktionsrate. Eine ausreichende Generation von Versuchsmaterial ist dadurch gewährleistet. Zusätzlich können durch die Verfügbarkeit von transgenen Stämmen myeloide Zellpopulationen separat *in vivo* untersucht werden. Dafür wurden transgene Mäuse verwendet, sodass einzelne Zellpopulationen das grün fluoreszierende Protein GFP exprimieren und somit mittels 2-Photonen-Mikroskopie *in vivo* visualisiert werden können. Für die Versuchsdurchführung und Handhabung mit dem 2-Photonen-Mikroskop ist auch die geringe Größe der Maus von Vorteil, sodass die Prozesse der sterilen Inflammation durch die intakte Haut untersucht werden können.

In dieser Arbeit wurden CX3CR1-GFP-Mäuse in heterozygoter und homozygoter Form verwendet. Diese Mauslinie ermöglicht sowohl die Visualisierung von Fractalkine-Rezeptor-exprimierenden Zellen als auch die Untersuchung der Funktion von CX3CR1 *in vivo* durch die Verwendung heterozygoter und homozygoter Tiere (87). Bei der Verwendung dieses Mausstamms emittieren alle Fractalkine-Rezeptor-exprimierenden Zellen unter dem 2-Photonen-Mikroskop grünes Licht. In der Dermis der Haut sind dies vor allem Monozyten (87). Die Mechanismen der Rekrutierung von Monozyten können somit bei dem Gebrauch dieses Mausstamms erforscht werden.

6.1.2 Wahl des Ohrmodells

Als Modell für die sterile Inflammation wurde in dieser Arbeit das Ohrmodell gewählt. Das Ohr der Maus eignet sich als planes und gut mobilisierbares dünnes Gewebe besonders, da die atraumatische Präparation eine begleitende Entzündungsreaktion minimiert. Das ebenfalls für *in vivo*-Untersuchungen geeignete Cremastermodell erfordert dahingegen einen invasiven Eingriff, der die Freilegung und Präparation des M. Cremaster erfordert. Durch diesen Eingriff wird ein zusätzlicher Entzündungsreiz gesetzt, der die Untersuchungsergebnisse verfälschen könnte (102). Zudem ist die Dermis des Mausohrs reichlich durchblutet und eignet sich daher für die Darstellung von Immunzellprozessen unter dem 2-Photonen-Mikroskop. Weiterhin bietet das Ohrmodell eine lange Immobilisierungszeit des Präparats, sodass mehrstündige Aufnahmen möglich werden und verschiedene Phasen der Immunzellrekrutierung untersucht werden können. Durch die Platzierung eines lokal begrenzten Laserschadens konnte zudem die gerichtete Migration der Monozyten im interstitiellen Gewebe untersucht werden. Eine intradermale Injektion chemotaktischer Signalstoffe wäre dahingegen nur geeignet, um die ungerichtete Migration von Monozyten zu untersuchen. Weiterhin konnten durch einen Entzündungsfokus verschiedene Zonen im Gewebe hinsichtlich vorherrschender Chemokin-Gradienten untersucht werden.

6.1.3 Methode der GFP-Fluoreszenzmessung

In der Maus gibt es zwei zirkulierende Populationen von Monozyten im peripheren Blut, die sich morphologisch und funktionell unterscheiden. Diese beiden Monozytenpopulationen ähneln in ihrem Genexpressions- und Verhaltensmuster einer entsprechenden Population von Monozyten im Menschen (46). Die humanen $CD14^{++}CD16^{-}$ -Monozyten weisen dabei Ähnlichkeiten mit der größeren Untergruppe von murinen Blutmonozyten auf, den $Ly6C^{high}$ -Monozyten. Diese Gruppe bezeichnet man als die inflammatorische Monozytenpopulation. Die humanen $CD14^{low}CD16^{+}$ -Monozyten sind vergleichbar mit den $Ly6C^{low}$ -Monozyten in der Maus. Diese Gruppe definiert sich als residente Monozytensubpopulation.

In dieser Arbeit wurden die beiden murinen Monozytensubpopulationen *in vivo* am Modell der sterilen Entzündung untersucht. Um die Subpopulationen charakterisieren zu können, wurden diese anhand ihrer GFP-Fluoreszenzintensität differenziert. Die inflammatorischen Ly6C^{high}-Monozyten exprimieren nur geringe Mengen von CX3CR1 auf ihrer Oberfläche, wohingegen die residenten Ly6C^{low}-Monozyten hohe Mengen des Rezeptors aufweisen (87). Um die Monozyten unter dem 2-Photonen-Mikroskop visualisieren zu können, wurden CX3CR1-GFP-Mäuse verwendet, sodass alle Monozyten in der Mikrozirkulation der Haut grünes Licht emittierten. Die inflammatorischen Ly6C^{high}-Monozyten weisen in diesem Mausstamm eine niedrigere Fluoreszenzintensität als die residenten Ly6C^{low}-Monozyten auf (57). Um die GFP-Fluoreszenz der Zellen zu messen, wurde ein Image Tool des Datenanalyse-Programms Volocity verwendet.

Diese Methode bietet neben der einfachen Handhabung und effizienten Durchführung viele Vorteile. Somit wird eine *in vivo* Visualisierung und Differenzierung der beiden Monozytensubpopulationen ohne die Verwendung von Antikörper-markierten Farbstoffen möglich, bei deren Verwendung noch nicht geklärt ist, inwiefern sich ihre Bindung an Liganden auf das Migrationsverhalten von Immunzellen auswirkt. Zudem kann das Migrationsverhalten der beiden Populationen in ihrem physiologischen Umfeld separat untersucht werden, ohne eine Population gezielt depletieren zu müssen. Eine mögliche Interaktion zwischen den beiden Populationen wird nicht gestört. In diesem Zusammenhang kann auch die Funktion von residenten CX3CR1^{high}-Monozyten analysiert werden, deren separate Untersuchung sich bisher als schwierig erwiesen hat. Durch die Verwendung von CX3CR1-GFP-Mäusen in heterozygoter und homozygoter Form kann gleichzeitig die Funktion des Rezeptors in Bezug auf die einzelnen Subpopulationen ermittelt werden.

Die quantitative Messung der Fluoreszenzintensität von fluoreszenzmarkierten Proteinen gelang mithilfe des Software-Programms Volocity bereits in anderen Studien. Beispielsweise konnte die Fluoreszenzintensität von YFP-markierten Kinetochoren

in einer Studie von Ledesma-Fernandes et al. erfolgreich gemessen und differenziert werden (103). Kritisch zu hinterfragen ist jedoch, inwieweit die GFP-Fluoreszenz, die aus den generierten Videos ermittelt wurde, durch Umgebungsfaktoren und Artefakte beeinflusst wird (104). Ein grundlegendes Problem des quantitativen Fluoreszenz-Imagings ist der Effekt des Photobleachings. Wenn ein Teil des verwendeten Farbstoffs ausgebleicht ist, wird der gemessene Fluoreszenzwert unter dem wahren Fluoreszenzlevel des Fluorochroms liegen (103). Diese Problematik ist vor allem bei der konfokalen Mikroskopie zu bedenken. Bei der Verwendung eines 2-Photonen-Mikroskops ist durch den 2-Photonen-Effekt das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe im Gegensatz dazu stark minimiert.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Das Migrationsverhalten von Monozyten bei der sterilen Inflammation

Monozyten sind Zellen des MPS und spielen als zirkulierende Blutleukozyten eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf einen Entzündungsreiz (34). Die Rolle von Monozyten bei der sterilen Entzündung ist im Gegensatz zu deren Rolle bei der mikrobiell bedingten Entzündung bisher unzureichend erforscht (52). Monozyten sind an der Pathogenese vieler steriler Entzündungsgeschehen, wie der Atherosklerose (36), der rheumatoiden Arthritis (55) oder der Hirnischämie (53) beteiligt. Eine Erforschung der Funktion und Interaktion von Monozyten während der sterilen Inflammation ist daher grundlegend, um die Immunpathogenese verschiedener Krankheitsbilder zu verstehen. Um die grundlegenden Abläufe der sterilen Inflammation auf zellulärer Ebene besser verstehen zu können, wurden in dieser Arbeit die Abläufe der Immunzellrekrutierung von Monozyten am Modell der sterilen Inflammation *in vivo* untersucht.

Die akute Reaktion auf eine Entzündung läuft in unterschiedlichen Phasen ab, die sich hinsichtlich des zeitlichen und funktionellen Auftretens von Immunzellen

unterscheiden (51). Um verschiedene Phasen der Immunzellrekrutierung bei der sterilen Inflammation untersuchen zu können, wurde das Migrationsverhalten der Monozyten innerhalb eines frühen (3-4 h), mittleren (4-5 h) und späten (5-6 h) Zeitraums nach dem Setzen des Laserschadens quantifiziert. Dabei zeigen sich die Zellen in ihrem Bewegungsmuster innerhalb des frühen Zeitraums zielorientierter als in den späteren Phasen. Innerhalb der späten Phase bewegen sich die Zellen jedoch mit einer höheren Geschwindigkeit durch das Gewebe als in der frühen Phase. Bisherige Daten konnten innerhalb der frühen Phase vor allem einen schnellen Einstrom von neutrophilen Granulozyten, gefolgt von einer zweiten Welle an inflammatorischen Monozyten beobachten (105). Es konnte gezeigt werden, dass primär einströmende neutrophile Granulozyten durch das Freiwerden von bestimmten Zytokinen und Chemokinen aus ihren Granula ein chemotaktisches Milieu für inflammatorische Monozyten schaffen (106)(107). Die zielgerichtete Migration der Zellen unserer Daten innerhalb der ersten 3-4 h könnte demnach durch eine im Gewebe vorliegende Ansammlungen an spezifischen Chemokinen bewirkt sein, welche zuvor von neutrophilen Granulozyten produziert wurden. Durch diesen zielgerichteten Einstrom der Zellen entlang eines Gradienten chemotaktischer Stoffe könnten diese schnell zum Ort des Schadens gelangen, um diesen einzukreisen und abzuräumen.

In der mittleren Phase der Entzündung kommt es zu einem vermehrten Absterben der neutrophilen Granulozyten durch Apoptose, um einen übermäßigen Schaden zu verhindern. Dabei werden Signal- und Wachstumsfaktoren frei, die einen weiteren Einstrom von Monozyten und Makrophagen fördern, welche an der Wundheilung und am Remodelling beteiligt sind (51). Eine Arbeitsgruppe um Fadok konnte zeigen, dass apoptotische neutrophile Granulozyten die vermehrte Produktion von antiinflammatorischen Signalstoffen wie IL-10 und TGF β durch Monozyten induzieren (108). Daher könnten Veränderungen des Milieus von pro- zu antiinflammatorischen Signalstoffen zu einem veränderten Bewegungsmuster der Monozyten im Gewebe innerhalb der letzten Phase führen. Es konnte also gezeigt werden, dass das Migrationsverhalten der Monozyten während der sterilen Entzündung über die Zeit

variiert und womöglich von verschiedenen Signalstoffklassen phasenabhängig reguliert wird.

Die transendotheliale Migration von Immunzellen wurde bereits in vorherigen Studien fokussiert, wohingegen die Mechanismen der Migration von Leukozyten im interstitiellen Gewebe noch wenig erforscht sind (29). In dieser Arbeit wird daher vor allem das Migrationsverhalten von Monozyten nach dem Austritt aus dem Gefäß auf dem Weg zum Entzündungsfokus untersucht. Leukozyten, die durch das Gewebe migrieren, treffen an verschiedenen Positionen auf ihrem Weg auf unterschiedliche chemotaktische Signale, die ihre Migration regulieren und sie neu positionieren können (109). Neuere Untersuchungen konnten feststellen, dass neutrophile Granulozyten in der Lage dazu sind, im Gewebe bestimmte Signale gegenüber anderen priorisiert zu folgen, um zu ihrem Ziel zu gelangen. Beispielsweise folgten neutrophile Granulozyten in einem Modell der sterilen Entzündung in der Leber bis zu einer Entfernung von 150 μm von der Verletzung einem Gradienten des Chemokins CXCL2. Anschließend migrierten die Zellen Chemokin-unabhängig weiter in das Zentrum der Entzündung. Die nekrotischen Zellen wirkten in dieser unmittelbaren Entfernung direkt über das Freiwerden von DAMPs chemotaktisch auf die Zellen (110).

Um zu untersuchen, ob an unterschiedlichen Positionen im Gewebe verschiedene chemotaktische Signale auf die Rekrutierung von Monozyten wirken, wurde in dieser Arbeit das Migrationsverhalten der Zellen in einer entzündungsfernen ($> 100 \mu\text{m}$) und einer entzündungsnahen ($> 100 \mu\text{m}$) Zone quantifiziert. In der entfernteren Zone vom Entzündungsfokus zeigt sich das Migrationsverhalten der Monozyten zielgerichteter als in der Zone, die sich unmittelbar um den Schaden befindet. Die eigenen Beobachtungen stimmen demnach mit der Theorie überein, dass Leukozyten an verschiedenen Stellen im Gewebe von unterschiedlichen Signalstoffen beeinflusst werden und zwischen diesen differenzieren können. Somit könnten die Monozyten innerhalb der entfernteren Zone dem Gradienten eines bestimmten Chemokins gefolgt sein, wie die neutrophilen Granulozyten dem Chemokin CXCL2, und wiesen

daher ein sehr zielgerichtetes Migrationsverhalten auf. In der Nähe der Nekrosezone könnte die vermehrte Desorientiertheit der Zellen mit der Reaktion auf einen hohen Sättigungsgrad an DAMPs interpretiert werden.

6.2.2 Das Migrationsverhalten von Monozytensubpopulationen bei der sterilen Inflammation

Die unterschiedlichen Funktionen von inflammatorischen und residenten Monozyten während der sterilen Inflammation sind im Gegensatz zu der Inflammation infektiöser Genese noch nicht vollends verstanden. Vor allem die Funktion der residenten Monozyten ist in diesem Kontext wenig erforscht (57)(55). Dies begründet sich unter anderem in der Tatsache, dass es bisher keine etablierte Methode gibt, die residente Monozytensubpopulation separat zu depletieren, um Rückschlüsse bezüglich ihrer Interaktion und Funktion bei der Immunzellrekrutierung ziehen zu können (111)(112)(55). Des Weiteren wird die Rekrutierung der beiden Monozytensubpopulationen durch unterschiedliche Chemokin-Rezeptorachsen koordiniert (51)(52). Zudem konnten bei beiden Monozytensubpopulationen sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen während verschiedener Entzündungsgeschehen aufgezeigt werden (55)(113). Die Funktion der einzelnen Subpopulationen lässt sich demnach wahrscheinlich nicht anhand eines einzelnen Modells erklären. Für der Entwicklung therapeutischer Strategien sollten daher mehrere Entzündungsmodelle untersucht werden (52)(55).

In dieser Arbeit wurden zwei murine Monozytensubpopulationen hinsichtlich ihrer Rekrutierungsmechanismen und des interstitiellen Migrationsverhaltens *in vivo* am Modell der sterilen Entzündung differenziert. Es zeigt sich, dass die inflammatorischen CX3CR1^{low}-Monozyten vor allem zu Beginn innerhalb der ersten 3 h der Entzündungsreaktion in ansteigender Zellzahl zum Ort der Inflammation rekrutiert werden, wohingegen die residenten CX3CR1^{high}-Monozyten erst nach 3-4 h vermehrt in das entzündete Gewebe einwandern. Zudem bewegen sich die inflammatorischen CX3CR1^{low}-Zellen schneller und zielorientierter im Gewebe als die

CX3CR1^{high}-Zellen.

Eine ähnliche zeitliche Abfolge der Monozytenrekrutierung konnte beim Herzinfarkt im Menschen (114) und am Mausmodell (56) beobachtet werden. Der Myokardinfarkt triggert eine sterile Entzündungsreaktion mit einem biphasischen Verlauf der Monozytenrekrutierung. In einer ersten frühen Welle werden die inflammatorischen CX3CR1^{low}-Monozyten rekrutiert, gefolgt von einem Einstrom an residenten CX3CR1^{high}-Monozyten (114)(56). Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit und der Beobachtungen der Forschungsgruppe um Nahrendorf kann vermutet werden, dass inflammatorische Monozyten in einer ersten Phase schnell und zielgerichtet zum Entzündungsfokus wandern, um nekrotisches Gewebe unmittelbar phagozytotisch abzuräumen. In einer weiteren späteren Welle werden vermehrt residente Monozyten rekrutiert, um die Auflösung der Entzündungsreaktion einzuleiten und am Wiederaufbau des Gewebes mitzuwirken (115).

Dieses Modell lässt sich jedoch nicht auf jedes sterile Entzündungsgeschehen übertragen. Eine Arbeitsgruppe um Misharin konnte bspw. eine prädominante Rolle von residenten Monozyten während der autoimmun bedingten rheumatoiden Arthritis am murinen Modell beobachten (55). Bei anderen Ursachen der Entzündung, wie der bakteriellen Infektion (57)(116) oder der Muskelverletzung (117), spielen vor allem die klassischen Monozyten eine entscheidende Rolle. Die Funktion der Monozytensubpopulationen scheint daher von der anatomischen Lage und der spezifischen Genese eines Entzündungsreizes abzuhängen.

6.2.3 Die Rolle von Fractalkine bei der Rekrutierung von Monozyten

Fractalkine ist ein einzigartiges Chemokin, dass sowohl in membrangebundener Form als Adhäsionsmolekül die transendotheliale Migration von Leukozyten fördert als auch in gelöster Form chemotaktisch auf die Immunzellmigration im Gewebe wirkt (77). CX3CL1 bindet als einziger Ligand spezifisch an den G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptor CX3CR1, welcher vor allem auf der Oberfläche von Mono-

zyten und einigen Untereinheiten von NKs und T-Lymphozyten exprimiert wird (87). Die CX3CR1/CX3CL1-Achse spielt bei einigen sterilen Entzündungsgeschehen eine wichtige Rolle. So konnte bspw. eine vermehrte Expression von CX3CL1 auf Endothelzellen beim ischämisch bedingten akuten Nierenversagen festgestellt werden (118). Durch eine Antikörper-vermittelte Blockade von CX3CR1 konnte eine verlängerte Überlebensdauer von Herztransplantaten in Mäusen erwirkt werden (119).

In dieser Arbeit wurde die Rolle von Fractalkine bei der Rekrutierung von Monozyten bei der sterilen Entzündung *in vivo* erforscht. Zunächst wurde dabei die Auswirkung von CX3CR1 auf drei Phasen der Immunzellrekrutierung untersucht. Die Abwesenheit des Fractalkine Rezeptors wirkt sich auf alle Phasen der Entzündungsreaktion aus. Innerhalb der ersten Phase migrieren Zellen, die CX3CR1 nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren, weniger zielorientiert durch das Gewebe als Zellen, die über den Rezeptor verfügen. Zudem migrieren die Zellen ohne CX3CR1 in der letzten Phase langsamer als die Monozyten, die den Rezeptor aufweisen. Das Chemokin Fractalkine scheint somit die gerichtete Migration von Monozyten während der ersten Phase zum Entzündungsort zu unterstützen. Zudem wirkt es sich auf die Geschwindigkeit der Zellen in der letzten Phase aus. Eine Arbeitsgruppe um Truman konnte zeigen, dass CX3CL1 von apoptotischen Lymphozyten freigesetzt wird, um chemotaktisch auf Phagozyten zu wirken (120). Auch die apoptotischen neutrophilen Granulozyten könnten in der mittleren Phase der Entzündungsreaktion Fractalkine ausschütten, welches chemotaktisch auf Monozyten wirkt. Die vielseitigen Signale von nekrotischen neutrophilen Granulozyten könnten die erhöhte Geschwindigkeit der Zellen und den vermehrten Orientierungsverlust der Monozyten im Gewebe erklären. Zudem konnte eine Arbeitsgruppe um Fahy feststellen, dass Fibroblasten in der Dermis der Haut unter dem Einfluss von TNF α die ungebunden gelöst vorliegende Form von Fractalkine produzieren können und demnach womöglich einen Einfluss auf die Immunzellrekrutierung im Gewebe haben. Die Produktion von Fractalkine fand hierbei im Gegensatz zu der Produktion anderer Chemokine verzögert statt und könnte sich demnach vor allem auf spätere Phasen der Entzündung auswirken

(121). In anderen Studien konnte beobachtet werden, dass Fractalkine eine wichtige Rolle bei der Angiogenese spielt (122). Auch in den Versuchen dieser Arbeit wirkt sich Fractalkine vor allem auf die späten Phasen der Entzündung aus. Fractalkine könnte demnach womöglich eine wichtige Rolle bei der Wundheilung während späterer Phasen der Entzündung haben.

In einem weiteren Schritt wurde, wie in Kapitel 6.2.1 beschrieben, untersucht, welchen Einfluss CX3CR1 auf die Migration von Monozyten innerhalb bestimmter Zonen im Gewebe hat. Die Mobilisierung von Monozyten aus dem Blutstrom und deren Koordination im Gewebe zum Entzündungsfokus wird von unterschiedlichen Chemokin-Rezeptor-Achsen reguliert (113). Vor allem CCR2, CX3CR1, CCR1 und CCR5 scheinen bei der Rekrutierung von Monozyten eine Rolle zu spielen und deren interstitielle Migration im Gewebe zu beeinflussen (86). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Abwesenheit von CX3CR1 zu einem weniger gerichteten Migrationsverhalten der Monozyten innerhalb der entfernteren Zone im interstitiellen Gewebe führt. Diese Beobachtung lässt eine Steuerfunktion von CX3CL1 auf die Migration von Monozyten im Gewebe vermuten, bevor sie eine Zone mit DAMPs in unmittelbarer Nähe zum Entzündungsfokus erreichen. Monozyten könnten demnach ebenso wie die neutrophilen Granulozyten zwischen verschiedenen Signalstoffen im Gewebe differenzieren und bestimmten Leitchemokinen priorisiert folgen, um zu ihrem Ziel zu gelangen (110).

In einem letzten Schritt wurde untersucht, wie sich CX3CR1 auf die einzelnen murinen Monozytensubpopulationen bei der sterilen Inflammation auswirkt. Beide Populationen werden in homozygoten CX3CR1-GFP-Mäusen im Gegensatz zu heterozygoten CX3CR1-GFP-Mäusen in verminderter Anzahl zum Ort des sterilen Entzündungsgeschehens rekrutiert. In anderen Studien der Gruppe Affray et al., in denen das CX3CR1-Gen gezielt deletiert wurde, konnte beobachtet werden, dass CX3CR1 eine wichtige Rolle bei der mikrobiell induzierten Entzündung auf die Rekrutierung von beiden Monozytensubpopulationen hat. Hierbei konnte ein

verminderter patrollierender Charakter der residenten Monozyten *in vivo* bei durch *Listeria monocytogenes* verursachter Peritonitis beobachtet werden (57). An einem weiteren Modell konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass weniger inflammatorische Monozyten zur entzündeten Milz rekrutiert werden konnten (123). Unsere Daten zeigen, dass bei fehlender Wirkung von Fractalkine beide Monozytenpopulationen langsamer durch das Gewebe zum Ort des Entzündungsgeschehens migrieren als Zellen, die den Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Viele Studien gehen davon aus, dass die Rekrutierung von klassischen Monozyten vor allem CCR2-abhängig ist (124)(52). Die Forschungsgruppe um Tacke konnte jedoch am Mausmodell zeigen, dass CCR2 und CX3CR1 für die Migration von klassischen Monozyten in arteriosklerotische Plaques benötigt werden (125).

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die CX3CL1-CX3CR1-Achse das interstitielle Migrationsverhalten von Monozyten abhängig von der Rekrutierungsphase und der Positionierung im Gewebe beeinflusst.

6.3 Ausblick

Es gelang ein Einblick in verschiedene Mechanismen der Rekrutierung von Monozyten bei der sterilen Inflammation *in vivo*. Die einflussnehmenden Faktoren auf die Migration von Monozyten im interstitiellen Gewebe sollten noch weiter analysiert werden. Hierbei sollen noch weitere *in vivo*-Versuche durchgeführt werden, um die Auswirkung anderer Chemokine auf das Migrationsverhalten von inflammatorischen und residenten Monozyten zu untersuchen. Weiterhin wäre es interessant die Wechselwirkung von Makrophagen und Monozyten im Gewebe zu untersuchen und diese Zellpopulationen separat zu depletieren.

7 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Rekrutierungsmechanismen von Monozyten *in vivo* bei der sterilen Inflammation untersucht. Hierbei konnten zwei Monozytensubpopulationen charakterisiert und hinsichtlich ihres interstitiellen Migrationsverhaltens differenziert werden. Zudem wurde die Auswirkung von Fractalkine auf die Rekrutierung von Monozyten untersucht. Durch die Verwendung eines transgenen Mausstamms konnten die Monozyten mithilfe der 2-Photonen-Mikroskopie in der Mikrozirkulation der Haut visualisiert werden. Die sterile Entzündungsreaktion wurde durch das Setzen eines definierten Laserschadens am Ohrmodell induziert. Es konnte gezeigt werden, dass Monozyten in einer zeitlich und räumlich kontrollierten Weise zum Ort des Entzündungsgeschehens in drei Phasen rekrutiert werden. In einer frühen Phase wanderten vor allem inflammatorische Monozyten zielgerichtet in das entzündete Gewebe ein. Während späterer Phasen nahm auch die Anzahl der residenten Monozyten vermehrt zu. In der späten Phase migrierten die Zellen jedoch weniger zielorientiert auf die Entzündung zu. Weiterhin migrierten Monozyten in einer weiten Entfernung vom Fokus der Entzündung zielorientierter als Zellen die sich in unmittelbarer Nähe befanden. Sie können auf ihrem Weg zum Fokus der Entzündung womöglich zwischen verschiedenen Signalstoffen differenzieren. Die CX3CR1-CX3CL1-Achse wirkte sich vor allem auf die Geschwindigkeit der Monozyten bei der zeitlich und räumlich kontrollierten Rekrutierung von Monozyten aus und hatte dabei einen Einfluss auf beide Subpopulationen. Da Monozyten bei einer Vielzahl steriler Entzündungsgeschehen eine prädominante Rolle spielen, können die Ergebnisse dieser Arbeit daher das Verständnis von vielen Krankheitspathologien wie dem Herzinfarkt oder der Atherosklerose erweitern und zu der Entwicklung neuer Therapiekonzepte beitragen.

8 Summary

This thesis investigated the recruiting mechanisms of monocytes during sterile inflammation *in vivo*. Within this work two monocyte subpopulations were characterized and differentiated regarding their interstitial migration pattern. In addition, the influence of fractalkine on the recruitment process was analyzed. The monocytes of interest were visualized using 2-photon-microscopy in a transgenic mouse strain. Sterile inflammation was initiated by a defined laser-induced insult in the mouse ear. It was shown that monocytes are recruited to the site of inflammation in three phases in a spatially and temporally controlled manner. In the early phase, mainly inflammatory monocytes move into the inflamed tissue in a targeted way. In subsequent stages, also the number of resident monocytes was increasing. During the late phase, the monocytes seemed to migrate less target-oriented. Interestingly, cells in close proximity to the site of inflammation showed less directed movement than distant monocytes. It is possible that the distant cells were influenced by different signal substances on their path to the necrosis. The CX3CR1-CX3CL1 interaction mainly affected the speed of the spatially and temporally controlled recruitment of monocytes. In this context fractalkine seemed to have an important function on the recruitment of both monocyte subpopulations in affected tissue. Monocytes play a predominant role in a lot of different cases of sterile inflammation. The presented results could broaden the understanding of a variety of disease-related pathologies, including myocardial infarction and atherosclerosis and may contribute to the development of new therapeutic approaches.

Literaturverzeichnis

- [1] G. Y. Chen and G. Nuñez. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.*, 10(12):826–37, 2010.
- [2] H. Kono and K. L. Rock. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.*, 8(4):279–89, 2008.
- [3] W. Badri, K. Miladi, Q. A. Nazari, H. Greige-Gerges, H. Fessi, and A. Elaissari. Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: Overview, progress, challenges and prospects. *Int. J. Pharm.*, 515:757–773, 2016.
- [4] L. Ferrero-Miliani, O. H. Nielsen, P. S. Andersen, and S. E. Girardin. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1B generation. *Clin. Exp. Immunol.*, 147:227–235, 2007.
- [5] P. Matzinger. The evolution of the danger theory. *Expert Rev Clin Immunol*, 8(4):311–317, 2012.
- [6] H. Rock, K.L., Latz, E., Ontiveros, F. and Kono. The Sterile Inflammatory Response. *Annu. Rev. Immunol.*, 28:321–342, 2010.
- [7] S. S. Iyer, W. P. Pulskens, J. J. Sadler, L. M. Butter, G. J. Teske, T. K. Ulland, S. C. Eisenbarth, S. Florquin, R. A. Flavell, J. C. Leemans, and F. S. Sutterwala. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(48):20388–20393, 2009.
- [8] Marco E Bianchi. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.*, 81(1):1–5, 2007.

- [9] O. Takeuchi and S. Akira. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6):805–820, 2010.
- [10] P. Scaffidi, T. Misteli, and M. E. Bianchi. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418(6894):191–195, 2002.
- [11] R. M. Vabulas, P. Ahmad-Nejad, C. Da Costa, T. Miethke, C. J. Kirschning, H. Häcker, and H. Wagner. Endocytosed HSP60s Use Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 to Activate the Toll/Interleukin-1 Receptor Signaling Pathway in Innate Immune Cells. *J. Biol. Chem.*, 276:31332–31339, 2001.
- [12] Min-Fu Tsan and Baochong Gao. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J. Leukoc. Biol.*, 76(3):514–519, 2004.
- [13] B. A. Imhof and M. Aurrand-lions. Adhesion Mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol*, 4(6):432–444, 2004.
- [14] Sussan Nourshargh, Peter L. Hordijk, and Michael Sixt. Breaching multiple barriers : leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat. Rev.*, 11(May):366–378, 2010.
- [15] K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.*, 7(9):678–689, 2007.
- [16] S. R. Barthel, J. D. Gavino, L. Descheny, and C. J. Dimitroff. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*, 11(11):1473–1491, 2007.
- [17] D. A. Guyer, K. L. Moore, E. B. Lynam, C. M. Schammel, S. Rogelj, R. P. McEver, and L. A. Sklar. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is a ligand for L-selectin in neutrophil aggregation. *Blood*, 88(7):2415–2421, 1996.
- [18] J. R. Chan, S. J. Hyduk, and M. I. Cybulsky. Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular

- cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *J. Exp. Med.*, 193(10):1149–1158, 2001.
- [19] R. O. Hynes. Integrins : Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 110(6):673–687, 2002.
- [20] J. L. Dunne, R. G. Collins, A. L. Beaudet, C. M. Ballantyne, and K. Ley. Mac-1, but Not LFA-1, Uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF a induced Inflammation. *J. Immunol.*, 171(11):6105–6111, 2003.
- [21] H. U. Keller, A. Zimmermann, and H. Cottier. Crawling-like movements, adhesion to solid substrata and chemokinesis of neutrophil granulocytes. *J. Cell Sci.*, 64:89–106, 1983.
- [22] D. D. Richardson and M. Fernandez-Borja. Leukocyte adhesion and polarization: Role of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Bioarchitecture*, 5(5-6):61–69, 2015.
- [23] L. E. Goldfinger, J. Han, W. B. Kiosses, A. K. Howe, and M. H. Ginsberg. Spatial restriction of $\alpha 4$ integrin phosphorylation regulates lamellipodial stability and $\alpha 4\beta 1$ -dependent cell migration. *J. Cell Biol.*, 162(4):731–741, 2003.
- [24] Y. M. Hyun, R. Sumagin, P. P. Sarangi, E. Lomakina, M. G. Overstreet, C. M. Baker, D. J. Fowell, R. E. Waugh, I. H. Sarelius, and M. Kim. Uropod elongation is a common final step in leukocyte extravasation through inflamed vessels. *J. Exp. Med.*, 209(7):1349–1362, 2012.
- [25] D. Proebstl, M. B. Voisin, A. Woodfin, J. Whiteford, F. D’Acquisto, G. E. Jones, D. Rowe, and S. Nourshargh. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med*, 209(6):1219–1234, 2012.
- [26] A. Woodfin, M. B. Voisin, M. Beyrau, B. Colom, D. Caille, F. M. Diapouli, G. N. Nash, T. Chavakis, S. M. Albelda, G. E. Rainger, P. Meda, B. Imhof, and S. Nourshargh. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized

transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat. Immunol.*, 12(8):761–769, 2011.

- [27] X. Deng, J. Zhang, Y. Liu, L. Chen, and C. Yu. TNF- α regulates the proteolytic endothelial cell-cell junctions through upregulating expression. *Sci. Rep.*, 16(7):1–12, 2017.
- [28] S. Paskauskas, A. Parseliunas, V. Kerkadze, R. Nobiling, J. Schmidt, and E. Ryschich. Blockade of leukocyte haptokinesis and haptotaxis by ketoprofen, diclofenac and SC-560. *BMC Immunol.*, 12(64):1–9, 2011.
- [29] P. Friedl and B. Weigelin. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat. Immunol.*, 9(9):960–969, 2008.
- [30] T. Lämmermann, B. L. Bader, S. J. Monkley, T. Worbs, R. Wedlich-Söldner, K. Hirsch, M. Keller, R. Förster, D. R. Critchley, R. Fässler, and M. Sixt. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*, 453(7191):51–55, 2008.
- [31] K. Wolf, R. Mu, S. Borgmann, E. Bro, and P. Friedl. Amoeboid shape change and contact guidance : T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood*, 102(9):3262–3270, 2003.
- [32] B. G. Yipp, B. Petri, D. Salina, C. N. Jenne, B. N. Scott, L. D. Zbytniuk, K. Pittman, M. Asaduzzaman, K. Wu, H. C. Meijndert, S. E. Malawista, A. de Boisfleury Chevance, K. Zhang, J. Conly, and P. Kuberski. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*, 18(9):1386–1393, 2012.
- [33] M. L. Dustin, S. K. Bromley, Z. Kan, D. A. Peterson, and E. R. Unanue. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94(8):3909–3913, 1997.

- [34] F. Ginhoux and S. Jung. Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.*, 14(6):392–404, 2014.
- [35] B. Malissen, S. Tamoutounour, and S. Henri. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat. Rev. Immunol.*, 14(6):417–428, 2014.
- [36] C. Auffray, M.H. Sieweke, and F. Geissmann. Blood monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 27:669–692, 2009.
- [37] F. Geissmann, M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science (80-.)*, 327(5966):656–661, 2010.
- [38] L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. M. Leenen, Y. Liu, G. Macpherson, G. J. Randolph, and J. Scherberich. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16):74–80, 2010.
- [39] M. J. Pittet, F. K. Swirski, M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J. L. Figueiredo, R. H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T. R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science (80-.)*, 325(5940):612–616, 2009.
- [40] G. J. Randolph, K. Inaba, D. F. Robbiani, R. M. Steinman, and W. A. Muller. Differentiation of Phagocytic Monocytes into Lymph Node Dendritic Cells in Vivo. *Immunity*, 11(6):753–761, 1999.
- [41] C. Varol, L. Landsman, D. K. Fogg, L. Greenshtein, B. Gildor, R. Margalit, V. Kalchenko, F. Geissmann, and S. Jung. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 204(1):171–180, 2007.

- [42] R. van Furth and Z. A. Cohn. The Origin and Kinetics of Mononuclear Phagocytes. *J. Exp. Med.*, 128:415–435, 1968.
- [43] P. Saha and F. Geissmann. Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunol. Cell Biol.*, 89(1):2–4, 2011.
- [44] D. Flieger B. Passlick and H. W. Löms Ziegler-Heitbrock. Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood. *Blood*, 74(7):2527–2534, 1989.
- [45] S. Yona, K. W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guillemins, A. Misharin, D. A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer, and S. Jung. Fate Mapping reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*, 38(1):79–91, 2013.
- [46] M. L. Santiago-Raber, H. Amano, E. Amano, L. Baudino, M. Otani, Q. Lin, F. Nimmerjahn, J. Sijf Verbeek, J. V. Ravetch, Y. Takasaki, S. Hirose, and S. Izui. Fcγ Receptor-Dependent Expansion of a Hyperactive Monocyte Subset in Lupus-Prone Mice. *Arthritis Rheum.*, 60(8):2408–2417, 2009.
- [47] N. V. Serbina, T. Jia, T. M. Hohl, and E. G. Pamer. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu. Rev. Immunol.*, 26:421–452, 2008.
- [48] F. Geissmann, S. Jung, and D. R. Littman. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19(1):71–82, 2003.
- [49] R. Skalak, B. Raton, M. Dembo, I. Kaverina, J. V. Small, Y. L. Wang, D. E. Ingber, D. A. Calderwood, M. Sheetz, M. Kozlov, B. Geiger, M. Gautel, F. Osterhelt, J. M. Fernandez, H. E. Gaub, P. E. Marszalek, H. P. Erickson, J. M. Fernandez, C. Sattler, D. R. Hostetter, M. Rief, K. Schulten, S. O. Nielsen, M. L. Klein, D. E. Discher, T. Ohashi, R. L. Clark, H. P. Erickson, S. Zauscher, S. N. Loh, P. B. Harbury, C. H. Kwok, G. Manderson, D. W. Speicher, D. E. Discher, S. R. Ainarapu, H. H. Huang, J. M. Fernandez, E. A. Evans, J. Pascual, M. Saraste, H. E. Gaub, R. W. Rounsevell, J. Clarke, R. I. Macdonald,

- and A. Mondragon. Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science (80-.)*, 317(5838):666–670, 2007.
- [50] L. M. Carlin, E. G. Stamatziades, C. Auffray, R. N. Hanna, L. Glover, G. Vizcay-Barrena, C. C. Hedrick, H. T. Cook, S. Diebold, and F. Geissmann. Nr4a1-Dependent Ly6C(low) Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal. *Cell*, 153(2):362–375, 2013.
- [51] Oliver Soehnlein and Lennart Lindbom. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 10(6):427–439, 2010.
- [52] D. Spahn, J. H., Kreisel. Monocytes in sterile inflammation: recruitment and functional consequences. *Arch Immunol Ther Exp*, 62(3):187–194, 2014.
- [53] O. B. Dimitrijevic, S. M. Stamatovic, R. F. Keep, and A. V. Andjelkovic. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke*, 38(4):1345–1353, 2007.
- [54] I. F. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., Charo. Letters To Nature. *Nature*, 394(6696):894–897, 1998.
- [55] A. V. Misharin, C. M. Cuda, G. R. S. Budinger, and H. Perlman. Nonclassical Monocytes Drive the Development of Inflammatory Arthritis in Mice. *Cell Press*, 9(2):591–604, 2014.
- [56] M. Nahrendorf, F. K. Swirski, E. Aikawa, L. Stangenberg, T. Wurdinger, J. L. Figueiredo, P. Libby, and M. J. Pittet F. K. Swirski, M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J. L. Figueiredo, R. H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T. R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.*, 204(12):3037–3047, 2007.
- [57] F. Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sabine, S., Cumano, A., Lauvau, G., Geissmann. Monitoring of Blood Vessels

and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science (80-.)*, 317:666–670, 2007.

- [58] D. Kreisel, R. G. Nava, W. Li, B. H. Zinselmeyer, B. Wang, J. Lai, R. Pless, A. E. Gelman, A. S. Krupnick, and M. J. Miller. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(42):18073–18078, 2010.
- [59] Tim Lämmermann, Philippe V Afonso, Bastian R Angermann, Ji Ming Wang, Wolfgang Kastenmüller, Carole a Parent, and Ronald N Germain. Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature*, 498(7454):371–5, 2013.
- [60] M. Lech and H. Anders. Macrophages and fibrosis : How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim. Biophys. Acta*, 1832(7):989–997, 2013.
- [61] A. Sica, A., Mantovani. Mphage_M1-M2_rev_JCI2012. *J. Clin. Invest.*, 122(3):787–795, 2012.
- [62] B. Jones, M. Beamer, and S. Ahmed. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol. Interv.*, 10(5):263–270, 2010.
- [63] C. Murdoch and A. Finn. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, 95(10):3032–3043, 2000.
- [64] A. Rot and Ulrich H. Chemokines in innate and adaptive Host Defense: Basic Chemokine Grammar for Immune Cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 22:891–928, 2004.
- [65] M. Baggiolini, B. Dewald, and B. Moser. Human Chemokines - an Update. *Annu. Rev. Immunol.*, 15:675–705, 1997.
- [66] C. Kohler, T. Freitas, M. Maes, N. Q. de Andrade, C. Liu, B. Fernandes, B. Stubbs, M. Solmi, N. Veronese, N. Hermann, C. Raison, B. Miller, K. Lanctôt,

- and A. F. Carvalho. Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies. *Acta Psychiatr. Scand.*, 25:1–15, 2016.
- [67] Y. Le, Y. Zhou, P. Iribarren, and J. Wang. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol*, 1(2):95–104, 2004.
- [68] C. J. Raport, J. Gosling, V. L. Schweickart, P. W. Grayl, and I. F. Charos. Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Human CC Chemokine Receptor (CCR5) for Rantes, MIP-1b, and MIP-1a. *J. Biol. Chem.*, 271(29):17161–17166, 1996.
- [69] B. Moser and P. Loetscher. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.*, 2(2):123–128, 2001.
- [70] M. Yudasaka, M. Zhang, C. Jabs, and S. Iijima. Rapid communication Interleukin-4 Induces the Synthesis and Secretion of MCP-1/JE by Human Endothelial Cells. *Am. J Pathol.*, 138(6):1315–1319, 1991.
- [71] L. Huey-ming, L. Tsung-hsuan, L. Chih-hung, and Wen-bin W. TNF- α induces CXCL1 chemokine expression and release in human vascular endothelial cells in vitro via two distinct signaling pathways. *Acta Pharmacol Sin.*, 35(4):339–350, 2014.
- [72] S. Goda, T. Imai, O. Yoshie, O. Yoneda, H. Inoue, Y. Nagano, T. Okazaki, H. Imai, E. T. Bloom, N. Domae, and H. Umehara. CX3C-Chemokine, Fractalkine-Enhanced Adhesion of THP-1 Cells to Endothelial Cells Through Integrin-Dependent and -Independent Mechanisms. *J. Immunol.*, 164(8):4313–4320, 2000.
- [73] J. F. Bazan, K. B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D. R. Greaves, A. Zlotnik, and T. J. Schall. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 385:640–644, 1997.

- [74] Y. Pan, C. Lloyd, H. Zhou, S. Dolich, J. Deeds, J. A. Gonzalo, J. Vath, M. Gosselein, J. Ma, B. Dussault, E. Woolf, G. Alperin, J. Culpepper, J. C. Gutierrez-Ramos, and D. Gearing. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature*, 387(6633):611–617, 1997.
- [75] C. L. Tsou, C. A. Haskell, and I. F. Charo. Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme Mediates the Inducible Cleavage of Fractalkine. *J. Biol. Chem.*, 276(48):44622–44626, 2001.
- [76] K. J. Garton, P. J. Gough, C. P. Blobel, G. Murphy, D. R. Greaves, P. J. Dempsey, and E. W. Raines. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J. Biol. Chem.*, 276(41):37993–38001, 2001.
- [77] H. Umehara, E.T. Bloom, T. Okazaki, Y. Nagano, O. Yoshie, and T. Imai. Fractalkine in Vascular Biology: From Basic Research to Clinical Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24(1):34–40, 2004.
- [78] Y. Liu, W. Chen, C. Wu, L. J. Minze, J. Z. Kubiak, X. C. Li, M. Kloc, and M. Ghobrial. Macrophage / monocyte-specific deletion of Ras homolog gene family member A (RhoA) downregulates fractalkine receptor and inhibits chronic rejection of mouse cardiac allografts. *J. Hear. Lung Transplant.*, S1053-2498(16):30292–3, 2016.
- [79] P. Ancuta, R. Rao, A. Moses, A. Mehle, S. K. Shaw, F. W. Luscinskas, and D. Gabuzda. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J. Exp. Med.*, 197(12):1701–1707, 2003.
- [80] B. Roediger, L. G. Ng, A. L. Smith, B. F. Barbara, and W. Weninger. Visualizing dendritic cell migration within the skin. *Histochem. Cell Biol.*, 130(6):1131–1146, 2008.
- [81] A. G. Khandoga, A. Khandoga, C. A. Reichel, P. Bihari, M. Rehberg, and F. Krombach. In Vivo Imaging and Quantitative Analysis of Leukocyte Di-

- rectional Migration and Polarization in Inflamed Tissue. *PLoS One*, 4(3):e4693, 2009.
- [82] L. G. Ng, A. Hsu, M. A. Mandell, B. Roediger, C. Hoeller, P. Mrass, A. Iparra-guirre, L. L. Cavanagh, J. A. Triccas, S. M. Beverley, P. Scott, and W. Weninger. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog.*, 4(11):1–13, 2008.
- [83] J. L. Li, C. C. Goh, J. L. Keeble, J. S. Qin, B. Roediger, R. Jain, Y. Wang, W. K. Chew, L. G. Ng, and W. Weninger. Intravital multiphoton imaging of immune responses in the mouse ear skin. *Nat. Protoc.*, 7(2):221–234, 2012.
- [84] L. G. Ng, J. S. Qin, B. Roediger, Y. Wang, R. Jain, L. L. Cavanagh, A. L. Smith, C. A. Jones, M. de Veer, M. A. Grimbaldston, E. N. Meeusen, and W. Weninger. Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events. *J Invest Dermatol*, 131(10):2058–2068, 2011.
- [85] C. Hoeller, S. K. Richardson, L. G. Ng, T. Valero, M. Wysocka, A. H. Rook, and W. Weninger. In vivo imaging of cutaneous T-Cell lymphoma migration to the skin. *Cancer Res.*, 69(7):2704–2708, 2009.
- [86] C. Shi and E. G. Pamer. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 11(11):762–74, 2011.
- [87] S. Jung, J. Aliberti, P. Graemmel, M. Jean, G. W. Kreutzberg, A. Sher, and R. Dan. Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol. Cell. Biol.*, 20(11):4106–4114, 2000.
- [88] Solas,G.,TiergerechteHaltung:Labormäuse[Zugriff am22.11.2016]verügbarunter:http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/hal_maushaltung.pdf.
- [89] C. Gorzelanny, K. Thomas, V. Getova, V. Niemeyer, K. Zens, T. R. Unnerstall,

- J. S. Feger, and D. Metze. From morphology to biochemical state – intravital multiphoton. *Sci. Rep.*, 6(22789):1–12, 2016.
- [90] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951):73–76, 1990.
- [91] M. Oheim, D. J. Michael, M. Geisbauer, D. Madsen, and R. H. Chow. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58(7):788–808, 2006.
- [92] M. D. Cahalan, I. Parker, S. H. Wei, and Mark. J. Miller. Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nat. Rev. Immunol.*, 2(11):872–80, 2002.
- [93] W. Helmchen, F., Denk. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Publ. Gr.*, 2(12):932–940, 2005.
- [94] A. Drobizhev, M., Makkarov, N. S., Tillo S. E., Hughes, T. E., Rebane. HHS Public Access. *Nat Methods*, 8(5):393–399, 2011.
- [95] M. Oheim, E. Beaurepaire, E. Chaigneau, J. Mertz, and S. Charpak. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *J. Neurosci. Methods*, 111(1):29–37, 2001.
- [96] W. Mohler, A. C. Millard, and P. J. Campagnola. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods*, 29(1):97–109, 2003.
- [97] P. J. Campagnola and L. M. Loew. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nat. Biotechnol.*, 21(11):1356–1360, 2003.
- [98] W. Clsm and W. Webb. Vital imaging: Two photons are better than one. *Curr. Biol.*, 6(12):1595–1598, 1996.
- [99] P. T. C. So, C. Y. Dong, B. R. Masters, and K. M. Berland. TWO-PHOTON EXCITATION FLUORESCENCE MICROSCOPY. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2:399–429, 2000.

- [100] C. Sumen, T. Mempel, I. Mazo, and U. Vonandrian. Intravital Microscopy Visualizing Immunity in Context. *Immunity*, 21(3):315–329, 2004.
- [101] J. B. Beltman, A. F. M. Marée, and R. J. D. Boer. Analysing immune cell migration. *Nat. Rev. Immunol.*, 9(11):789–798, 2009.
- [102] J. E. Hungerford, W. C. Sessa, and S. S. Segal. Vasomotor control in arterioles of the mouse cremaster muscle. *FASEB J.*, 14(1):197–207, 2000.
- [103] E. Ledesma-Fernandez and P. H. Thorpe. Fluorescent foci quantitation for high-throughput analysis. *J. Biol. methods*, 2(2):e22, 2015.
- [104] A. P. Joglekar, E. D. Salmon, and K. S. Bloom. Counting Kinetochore Protein Numbers in Budding Yeast Using Genetically Encoded Fluorescent Proteins. *Methods Cell Biol.*, 85:127–151, 2008.
- [105] O. Soehnlein, L. Lindbom, and C. Weber. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood*, 114(21):4613–4623, 2009.
- [106] O. Soehnlein, A. Zerneck, E. E. Eriksson, A. G. Rothfuchs, C. T. Pham, H. Herwald, K. Bidzhikov, M. E. Rottenberg, C. Weber, and L. Lindbom. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*, 112(4):1461–1471, 2008.
- [107] O. Soehnlein, C. Weber, and L. Lindbom. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol.*, 30(11):538–546, 2009.
- [108] V. A. Fadok, D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott, and P. M. Henson. Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Pro-inflammatory Cytokine Production Through Autocrine / Paracrine Mechanisms Involving TGF- β . *J Clin Invest*, 101(28):890–898, 1998.
- [109] E. F. Foxman, J. J. Campbell, and E. C. Butcher. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J. Cell Biol.*, 139(5):1349–1360, 1997.

- [110] B. McDonald, K. Pittman, G. B. Menezes, S. A. Hirota, I. Slaba, C. C. M. Waterhouse, P. L. Beck, D. A. Muruve, and P. Kubers. Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation. *Science (80-.)*, 330:362–366, 2010.
- [111] L. Landsman, B. O. Liat, A. Zerneck, K. W. Kim, R. Krauthgamer, E. Shagdarsuren, S. A. Lira, I. L. Weissman, C. Weber, and S. Jung. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*, 113(4):963–972, 2009.
- [112] E. Debien, K. Mayol, V. Biajoux, C. Daussy, M. G. De Agüero, M. Taillardet, N. Dagany, L. Brinza, T. Henry, B. Dubois, D. Kaiserlian, J. Marvel, K. Babanian, and T. Walzer. S1PR5 is pivotal for the homeostasis of patrolling monocytes. *Eur. J. Immunol.*, 43(6):1667–1675, 2013.
- [113] C. Shi and E. G. Pamer. Monocyte Recruitment During Infection and Inflammation. *Nat Rev Immunol*, 11(11):762–774, 2014.
- [114] H. Tsujioka, T. Imanishi, H. Ikejima, A. Kuroi, S. Takarada, T. Tanimoto, H. Kitabata, K. Okochi, Y. Arita, K. Ishibashi, K. Komukai, H. Kataiwa, N. Nakamura, K. Hirata, A. Tanaka, and T. Akasaka. Impact of Heterogeneity of Human Peripheral Blood Monocyte Subsets on Myocardial Salvage in Patients With Primary Acute Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 54(2):130–138, 2009.
- [115] M. Nahrendorf, M. J. Pittet, and F. K. Swirski. Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair after Myocardial Infarction. *Circulation*, 121(22):2437–2445, 2010.
- [116] N. V. Serbina, T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel, and E. G. Pamer. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*, 19:59–70, 2003.
- [117] B. Arnold, L. Henry, A., Poron, F., Baba Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, K. R., Chazaud. Inflammatory monocytes recruited after skeletal

- muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*, 204(5):1057–1069, 2007.
- [118] D.J.J. Oh, B. Dursun, Z. He, L. Lu, T. S. Hoke, D. Ljubanovic, S. Faubel, and C. L. Edelstein. Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. *Am J Physiol Ren. Physiol*, 294(1):264–271, 2008.
- [119] L. A. Robinson, C. Nataraj, D. W. Thomas, D. N. Howell, R. Griffiths, V. Bautch, D. D. Patel, L. Feng, and T. M. Coffman. A role for fractalkine and its receptor (CX3CR1) in cardiac allograft rejection. *J. Immunol.*, 165(11):6067–6072, 2000.
- [120] L. A. Truman, C. A. Ford, M. Pasikowska, J. D. Pound, S. J. Wilkinson, I. E. Dumitriu, L. Melville, L. A. Melrose, C. A. Ogden, R. Nibbs, G. Graham, C. Combadiere, and C. D. Gregory. CX3CL 1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood*, 112(13):5026–5036, 2008.
- [121] O. L. Fahy, N. J. Coates, and S. R. McColl. Inhibition of Cytokine-Induced Fractalkine Production by Bacterial Invasion of Human-Dermal Fibroblasts. *Lab. Investig. a J. Tech. methods Pathol.*, 83(5):721–730, 2003.
- [122] M. V. Volin, J. M. Woods, M. A. Amin, M. A. Connors, L. A. Harlow, and A. E. Koch. Fractalkine: A Novel Angiogenic Chemokine in Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Pathol.*, 159(4):1521–1530, 2001.
- [123] C. Auffray, D. K. Fogg, E. Narni-Mancinelli, B. Senechal, C. Trouillet, N. Saderup, J. Leemput, K. Bigot, L. Campisi, M. Abitbol, T. Molina, I. Charo, D. A. Hume, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J. Exp. Med.*, 206(3):595–606, 2009.
- [124] C. Tsou, W. Peters, Y. Si, S. Slaymaker, A. M. Aslanian, S. P. Weisberg, M. Mack, and I. F. Charo. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte

mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.*, 117(4):902–909, 2007.

- [125] F. Tacke, D. Alvarez, T. J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, J. Liu, M. Mack, N. V. Rooijen, S. A. Lira, A. J. Habenicht, and G. J. Randolph. . Popdzuf Tvctfut Ejggfsfoujbmz Fnqmpz \$\$ 3 Buifsptdmfspujd Qmbrvft. *J. Clin. Investig.*, 117(1):185–194, 2007.

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt und motiviert haben.

Bei Prof. Dr. Maßberg möchte ich mich für die Ermöglichung dieses interessanten Arbeitsprojekts und die fachliche und kompetente Beratung bedanken.

Besonders herzlich möchte ich Dr. med. Konstantin Stark für seine Unterstützung im Labor und bei der Umsetzung dieser Doktorarbeit bedanken. Sein großes Engagement und seine Freude am wissenschaftlichen Arbeiten haben mich stets inspiriert.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe Massberg bedanken, in der jeder bereit war mir bei aufkommenden Fragestellungen hilfreich zur Seite zu stehen.

Hierbei möchte ich vor allem Raffaele Coletti und Christin Lehmann erwähnen, die mir bei sämtlichen technischen Fragen zur Seite gestanden haben. Außerdem möchte ich mich bei Dr. med. vet. Annekathrin Eckart und Dr. med. vet. Alexander Steinhart für ihre Unterstützung im Labor und die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Zudem möchte ich mich bei den Tierpflegern bedanken, die eine kompetente Betreuung der Versuchstiere gewährleistet haben.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden und meiner Familie, die immer an mich geglaubt haben und mich bei meinem Schreibprozess unterstützt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Köhne, Maria

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Rekrutierungsmechanismen von Monozyten bei der sterilen Inflammation.

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

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

Hamburg, 11.03.18

Ort, Datum

Maria Köhne

Unterschrift Doktorandin/Doktorand