

**Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
(im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, WBex)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. med. Markus Sperandio**

**Neutrophile Granulozyten in der akuten
Entzündungsreaktion – Neue Mechanismen der
Rekrutierung und Einfluss auf die Thrombusbildung**

DISSERTATION

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

vorgelegt von Daniel Fabio Puhr-Westerheide
aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Christoph Andreas Reichel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Steffen Massberg
Prof. Dr. med. Andreas Schober
PD Dr. med. Helmut Arbogast

Mitbetreuung durch den
habilitierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach

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

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2019

Eidesstattliche Versicherung

Puhr-Westerheide, Daniel Fabio

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Neutrophile Granulozyten in der akuten Entzündungsreaktion – Neue Mechanismen der Rekrutierung und Einfluss auf die Thrombusbildung

selbstständig 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.

München, 14.12.2019

Ort, Datum

Daniel Puhr-Westerheide

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

I	EINLEITUNG.....	10
II	LITERATURÜBERSICHT	14
1	Leukozyten.....	14
1.1	Neutrophile Granulozyten.....	15
1.2	Monozyten.....	17
1.3	Basophile und eosinophile Granulozyten	17
1.4	B-, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen	18
1.5	Rekrutierungsprozess	19
2	Chemotaktische und Pathogen-assoziierte Moleküle	22
2.1	Chemokine und Chemokinrezeptoren	22
2.2	Lipidmediatoren.....	24
2.3	Lipopolysaccharide (LPS)	24
3	Thrombozyten und Thrombusbildung.....	25
3.1	Thrombozyten	25
3.2	Plasmatische Blutgerinnung.....	28
3.3	Immunthrombose	29
III	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	31
IV	MATERIAL UND METHODEN.....	32
1	Genehmigung und Vorbemerkung.....	32
2	Mausstämme und Tierhaltung.....	32
3	<i>In-vivo</i> Experimente	33

Inhaltsverzeichnis

3.1	Narkose.....	33
3.2	Chirurgische Präparation und Injektionstechniken	33
3.2.1	Präparation des <i>M. cremaster</i>	33
3.2.2	Katheterisierung der <i>A. femoralis</i>	34
3.2.3	Schwanzveneninjektion.....	34
3.2.4	Entzündliche Stimulation des <i>M. cremaster</i>	35
3.2.5	Endotoxämie	35
3.2.6	Transfer von Knochenmarksleukozyten	36
3.2.7	Depletion von neutrophilen Granulozyten	37
3.2.8	Depletion von Thrombozyten	37
3.2.9	Blutentnahme	37
3.3	Intravitalmikroskopie (IVM).....	38
3.3.1	<i>Reflected light oblique transillumination</i> (RLOT)-Mikroskopie	38
3.3.2	Fluoreszenzmikroskopie	39
3.3.3	Thrombusbildung durch phototoxische Endothelzellschädigung.....	40
3.3.4	Konfokalmikroskopie	40
3.3.5	Quantifizierung hämodynamischer Parameter und der Leukozytenmigration	41
3.3.6	Quantifizierung der Rekrutierung von Fluoreszenz-markierten Leukozyten	42
3.3.7	Visualisierung der Leukozytentransmigrationswege	43
3.3.8	Quantifizierung der mikrovaskulären Thrombusbildung	43
3.3.9	Quantifizierung der Disposition von fluoreszierenden Mikrosphären und <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) in mikrovaskulären Thromben	43
4	<i>Ex-vivo-</i> und <i>In-vitro</i>-Experimente	44

Inhaltsverzeichnis

4.1	Immunhistochemische Färbungen	44
4.2	<i>In-vitro</i> -Fluidik-Experimente	45
4.2.1	Konstruktion der Mikrofluidikchips	45
4.2.2	Fluoreszenzmikroskopie der Mikrofluidikchips	46
4.2.3	Simulation der Fluidodynamik	46
4.3	Systemische Leukozytenzahlen, Thrombozytenzahlen, Differentialblutbild	48
4.4	Verwendete Reagenzien	48
5	Versuchsprotokolle	50
5.1	Leukozytenrekrutierung nach Stimulation mit CCL3, CXCL1 oder PAF	50
5.2	Rekrutierung von Knochenmarksleukozyten in Zell-Transfer-Experimenten	51
5.3	Analyse der Leukozytentransmigrationswege	52
5.4	Quantifizierung der mikrovaskulären Thrombusbildung	52
5.5	Leukozytenrekrutierung nach lokaler Stimulation mit LPS	53
5.6	Visualisierung und Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion in der Mikrofluidik	54
5.7	Einfangen von <i>E. coli</i> -Bakterien und Mikrosphären durch die mikrovaskuläre Thrombusbildung	55
6	Statistische Versuchsauswertung	55
V	ERGEBNISSE	57
1	Mechanismen der CC-Chemokin-induzierten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten	57
1.1	Bedeutung der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 für die CCL3- induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten	57

Inhaltsverzeichnis

1.2	Bedeutung von leukozytären vs. nicht-leukozytären Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten	58
1.3	Bedeutung G-Protein gekoppelter Signaltransduktionswege und der PI3-Kinase für die CCL3-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten	59
1.4	Bedeutung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1/CD54, VCAM-1/CD106, ICAM-2/CD102, und PECAM-1/CD31 und der α 4- und β 2-Integrine für die CCL3-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten	62
1.5	Die Bedeutung von G-Protein gekoppelten und PI3-Kinase abhängigen Signaltransduktionswegen für die CXCL1- oder PAF-induzierte Leukozytenrekrutierung	63
1.6	Bedeutung der β 2- und α 4- Integrine und der Adhäsionsmoleküle ICAM-1/CD54, VCAM-1/CD106, ICAM-2/CD102 und PECAM-1/CD31 für die CXCL1- oder PAF-induzierte Leukozytenrekrutierung.....	65
1.7	Transmigrationsrouten der Leukozyten nach Stimulation mit CCL3, CXCL1 oder PAF.....	68
1.8	Phänotypisierung von adhärenenten und transmigrierten Leukozyten.....	69
1.9	Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen ...	69
2	Effekte der lokalen Entzündung auf die mikrovaskuläre Thrombusbildung und physiologische Bedeutung der Immunthrombose.....	72
2.1	Mikrovaskuläre Thrombusbildung im entzündeten Gewebe.....	72
2.2	Die Bedeutung der Thrombozyten und der plasmatischen Gerinnung für die mikrovaskuläre Thrombusbildung	74
2.3	Funktion der Leukozyten bei der mikrovaskulären Thrombose unter inflammatorischen Bedingungen.....	76
2.4	Einfluss der inneren Oberflächenstruktur von Kanälen auf die Thrombozytenanlagerung <i>In-vitro</i> in der Mikrofluidik	79
2.5	Theoretische Analysen der Strömungsverhältnisse und Effekte auf die Thrombozytenanlagerung im Bereich eines <i>bump structure</i>	81

Inhaltsverzeichnis

2.6	Molekulare Mechanismen der mikrovaskulären Thrombusbildung am Ort der Entzündungsreaktion	83
2.7	Einfangen von pathogenen Mikroorganismen durch verstärkte mikrovaskuläre Thrombose.....	86
2.8	Systemische Leukozytenzahlen, mikrohämodynamische Parameter, Fluoreszenzintensität und Effekte der Thrombozyten- und Neutrophilendepletion	87
VI	DISKUSSION	90
1	Wissenschaftlicher Hintergrund	90
1.1	Akute Entzündungsreaktion mit Aktivierung neutrophiler Granulozyten	90
1.2	Immunthrombose in der akuten Entzündungsreaktion	91
2	Diskussion der verwendeten Methoden	91
2.1	Wahl des <i>M. cremaster</i> Modells für die Untersuchung der mikrovaskulären Entzündungsreaktion <i>In-vivo</i>	91
2.2	Wahl des Zell-Transfers von Knochenmarksleukozyten für die Unterscheidung der Bedeutung leukozytärer und nicht-leukozytärer Chemokinrezeptoren und G-Protein gekoppelter Signalwege	92
2.3	Wahl der phototoxischen Endothelzellaktivierung im <i>M. cremaster</i> zur Untersuchung der mikrovaskulären Thrombose im entzündeten Gewebe <i>In-vivo</i>	93
2.4	Benutzung von PDMS-Mikrofluidiken für <i>In-vitro</i> -Versuche der Thrombozytenadhärenz und Aggregation	95
2.5	Benutzung der Konfokalmikroskopie zur Untersuchung der Lokalisation von Oberflächenmolekülen auf den Zellen im Thrombus.....	95
3	Diskussion der Ergebnisse	96
3.1	CC-Chemokin-vermittelte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten.....	96
3.2	Mechanismen der neutrophilen Granulozyten-abhängigen Immunthrombose im akut entzündeten Gewebe und Einfangen von pathogenen Mikroorganismen	101

VII	ZUSAMMENFASSUNG.....	109
VIII	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	112
IX	LITERATURVERZEICHNIS	116
X	DANKSAGUNG	132
XI	PUBLIKATIONEN	134
1	Aus der Dissertation hervorgegangene/hervorgehende Publikationen ...	134
2	Weitere Publikationen	134

I Einleitung

Die Sepsis ist ein lebensbedrohliches Krankheitsbild. Es handelt sich dabei um die schwerste Form einer Entzündungsreaktion mit Organdysfunktion, welche durch eine Fehlregulation der (Immun-)Antwort des Organismus auf eine Infektion hervorgerufen wird [1]. Bei dieser übersteigerten Immunreaktion kommt es zu Schäden an den körpereigenen Organen bis hin zum septischen Schock mit Multiorganversagen und Todesfolge. Septische Krankheitsbilder treten weltweit häufig auf und sind mit einer hohen Mortalität von 20 bis 50% verbunden [2-4]. Die genauen pathophysiologischen Mechanismen, welche zur Entstehung einer Sepsis führen, sind noch unzureichend erforscht. Besonderes Augenmerk ist auf die grundlegenden Mechanismen der Entstehung von Entzündungen sowie die Prozesse zur Bekämpfung und Verhinderung der systemischen Dissemination von Pathogenen zu richten. Durch ein besseres Verständnis dieser Mechanismen kann zukünftig versucht werden, das Immunsystem bei der Bekämpfung von Pathogenen zu unterstützen und gleichzeitig eine übersteigerte Entzündungsreaktion mit Schädigung des eigenen Organismus zu verhindern.

Die Rekrutierung von weißen Blutkörperchen (Leukozyten) aus der Mikrozirkulation an den Ort des entzündlichen Geschehens ist ein grundlegender biologischer Vorgang der Entzündungsreaktion. In den letzten Jahren wurde dieser Prozess genauer untersucht und charakterisiert. Es handelt sich dabei um einen hoch-komplexen Vorgang in mehreren Schritten, welcher das koordinierte Zusammenspiel von chemotaktischen Molekülen, Adhäsionsmolekülen, deren Rezeptoren und verschiedener Signalkaskaden unter Einbeziehung unterschiedlicher Zellarten des Organismus (Immunzellen, Endothelzellen, Thrombozyten etc.) erfordert [5-8]. Die gezielte Rekrutierung bestimmter Leukozyten-Subgruppen wie beispielsweise der neutrophilen Granulozyten (als „erste Verteidigungslinie“) an den Ort der Entzündung ist jedoch noch unzureichend erforscht.

Molekulare Interaktionen von Rezeptoren auf Immunzellen mit löslichen oder auf Endothelzellen gebundenen Zytokinen spielen bei der gezielten Rekrutierung von Leukozyten aus dem Gefäßsystem in das Gewebe eine wesentliche Rolle. Chemokine sind chemotaktische Zytokine mit Schlüsselfunktionen bei Immunreaktionen [9-11].

Einleitung

Diese kleinen Moleküle (8 bis 14 kDa) können nach Anzahl und Anordnung ihrer Cysteinreste am Aminoterminus in Gruppen von C, CC, CXC und CX₃C Chemokinen unterteilt werden. Die Bindung von Chemokinen an G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren führt zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, welche letztendlich durch Beeinflussung der Adhäsion und Migration von Leukozyten zur Rekrutierung dieser Zellen in entzündetes Gewebe führt [12-14]. Um bestimmte Leukozyten-Subpopulationen gezielt zum Ort des entzündlichen Geschehens zu dirigieren, spielen räumliche und zeitliche Expressionsprofile von Chemokinen und deren Chemokinrezeptoren eine entscheidende Rolle. Bisher galt die Annahme, dass CXC-Chemokine wie beispielsweise CXCL1 oder CXCL2 hauptsächlich auf neutrophile Granulozyten wirken, während CC-Chemokine wie beispielsweise CCL3 vorwiegend auf Monozyten und T-Lymphozyten wirken [10, 12-14]. Jedoch sind auch CC-Chemokine an der Rekrutierung von eosinophilen [15, 16], basophilen [17, 18] und neutrophilen Granulozyten [19-22] an den Ort entzündlicher Prozesse beteiligt und somit in die Vorgänge der „ersten Verteidigungslinie“ des Immunsystems involviert. Der genaue Mechanismus ist hierbei allerdings noch unklar. Zudem wurden CC-Chemokinrezeptoren, wie beispielsweise der Chemokinrezeptor 1 (CCR1) und der Chemokinrezeptor 5 (CCR5), auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und auf weiteren Zellen (beispielsweise Endothelzellen und Mastzellen) nachgewiesen [23-29], welche für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe wichtig sind. Somit steht fest, dass sowohl CC-Chemokine als auch deren Rezeptoren wesentlich an der Entstehung von Entzündungsreaktionen im Rahmen inflammatorischer Krankheitsbilder beteiligt sind.

Dieser Prozess der gezielten Rekrutierung von Entzündungszellen an den Ort einer Schädigung oder Infektion ist von großer Bedeutung, damit das Immunsystem mit seinem Repertoire an molekularen und zellulären Strukturen seine Funktion in der Bekämpfung von Eindringlingen, wie beispielsweise pathogenen Mikroorganismen, erfüllen kann. In immundefizienten Patienten kommt es oft zu schweren, lebensbedrohlichen Infektionen, welche aus einer systemischen Ausbreitung von Krankheitserregern hervorgehen. Andererseits sind überschießende Immunreaktionen, wie auch solche, die fälschlicherweise gegen den eigenen Körper gerichtet sind, bedrohlich und allgegenwärtig (wie beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen, Atherosklerose und im septischen Schock). Die genauen

Einleitung

Mechanismen, anhand derer das Immunsystem erfolgreich die systemische Dissemination von Pathogenen verhindert und eindringende Krankheitserreger effizient eliminiert, ist bisher nur teilweise bekannt. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass für diese Prozesse eine enge Zusammenarbeit von Immunzellen mit Thrombozyten und plasmatischen Faktoren der Blutgerinnung wesentlich ist. Durch thrombotische Verschlüsse können entzündliche Prozesse effektiv kompartimentalisiert und dadurch die Einschwemmung von Pathogenen in die Zirkulation eingedämmt oder komplett verhindert werden. Zudem können Thrombozyten Abwehrfunktionen übernehmen und so zur Neutralisierung von Krankheitserregern beitragen [30-33]. In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass Leukozyten in Kooperation mit Thrombozyten und der plasmatischen Gerinnung für die Thrombusbildung und für die Ausbildung von Netzstrukturen (sogenannte NETs; *neutrophil extracellular traps*) aus Desoxyribonukleinsäure (DNA), Histonen und weiteren gebundenen Molekülen zum Einfangen und Eliminieren von Pathogenen und als thrombogenes Gerüst mit übersteigerter Thrombusbildung verantwortlich sind [32, 34-42]. Diese Mechanismen wurden in größeren Gefäßen (Venen und Arterien) und in der Mikrozirkulation (Gefäße mit einem Durchmesser von unter 100 µm) der Leber nachgewiesen, in welchen relativ geringe Schergeschwindigkeiten vorherrschen. Das Eindringen von Pathogenen in den Organismus geschieht allerdings meist über die Mikrozirkulation von Geweben, in welcher jedoch hohe Schergeschwindigkeiten (beispielsweise Mikrozirkulation der Harnwege, Lunge und Haut) gegenwärtig sind.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Teile dieser komplexen, oben geschilderten Mechanismen aufzuschlüsseln. Dabei soll der Weg von der initialen Entzündungsentstehung mit der Rekrutierung von Immunzellen an den Ort des Geschehens bis hin zu immunthrombotischen Vorgängen am Ort der entstehenden Inflammation zur Verhinderung der systemischen Dissemination von pathogenen Mikroorganismen betrachtet werden.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich aus diesem Grund mit den Mechanismen der durch das Chemokin CCL3 induzierten Inflammation und folgender Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an den Ort des Geschehens, den beteiligten Signalkaskaden, Adhäsionsmolekülen und deren Rezeptoren.

Einleitung

Im zweiten Teil der Arbeit werden die Effekte einer durch neutrophile Granulozyten vermittelten, akuten Entzündungsreaktion auf die mikrovaskuläre Thrombusbildung untersucht. Besonderes Augenmerk wird auf die Thrombusbildung in der Mikrozirkulation des *M. cremaster* direkt am Ort der Entzündungsentstehung unter hohen Schergeschwindigkeiten gelegt. Der potentielle Nutzen dieser Vorgänge bei der Kompartimentalisierung von Krankheitserregern wird dabei untersucht.

II Literaturübersicht

1 Leukozyten

Leukozyten (altgriechisch leukós „weiß“ und kýtos „Hülle“) sind die Effektorzellen des Immunsystems und haben eine Vielzahl an Funktionen. Sie übernehmen Aufgaben bei der Abwehr von für den Organismus schädlichen Eindringlingen (Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten [32, 43-46]) und bei der Regulierung des Wachstums körpereigener Zellen (beispielsweise durch regulatorische T-Zellen [47]) sowie der Kontrolle von Proliferation und Metastasierung von Krebszellen [48-50]. Außerdem sind sie wesentlich an der Entstehung steriler Entzündungen (Autoimmunerkrankungen, Atherosklerose) beteiligt [51, 52]. Der primäre Bildungsort der Leukozyten ist das Knochenmark, wo sie aus hämatopoietischen Stammzellen hervorgehen und sich in weitere Subpopulation differenzieren (siehe Abbildung 1, [53]).

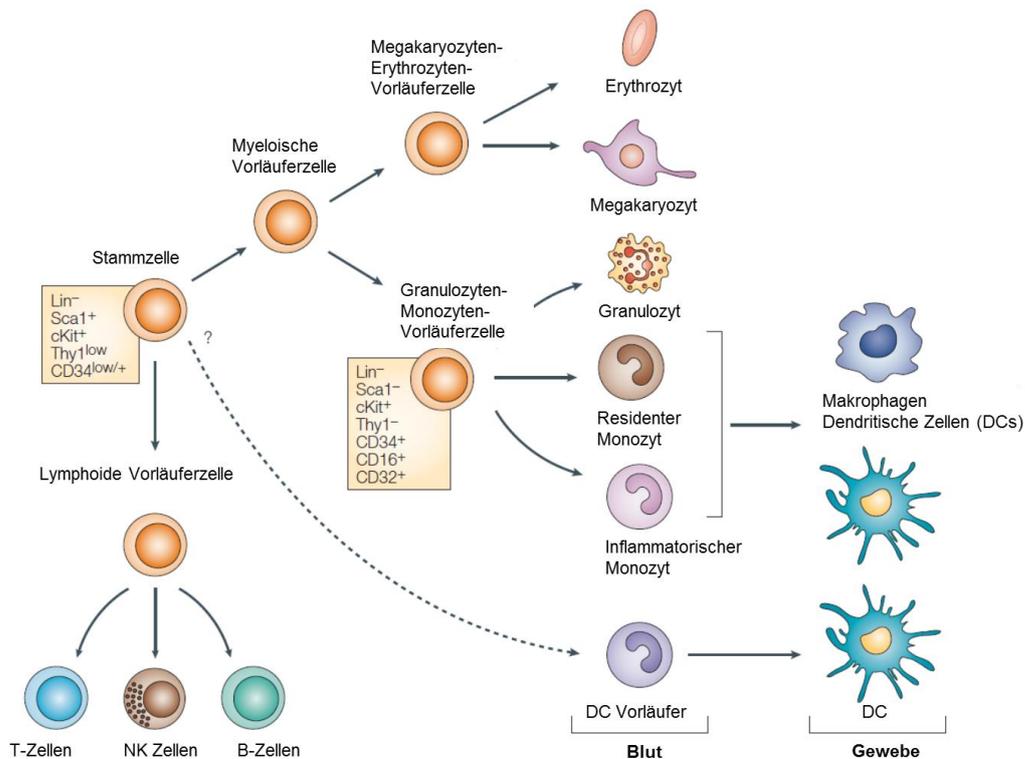


Abbildung 1: Übersicht der weiteren Differenzierung hämatopoietischer Stammzellen, nach [53].

Eine weitere Ausreifung bestimmter Leukozytenpopulationen, wie beispielsweise der Lymphozyten, findet in den lymphatischen Organen (Thymus, Milz, Lymphknoten und Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe) statt. Die ausgereiften Zellen zirkulieren im Blut, um ihre Aufgaben wahrzunehmen. Das Immunsystem kann in zwei Bereiche unterteilt werden: die angeborene Immunabwehr und die erworbene Immunabwehr. Zur angeborenen Immunabwehr werden hauptsächlich die Granulozyten (neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten), Monozyten, natürliche Killerzellen und das Komplementsystem gezählt. Zum adaptiven (erworbenen) Immunsystem gehören vor allem die B- und T-Lymphozyten sowie dendritische Zellen.

Um ihre Abwehrfunktionen zu erfüllen muss ein Großteil der Zellen des Immunsystems aus der Zirkulation in das Gewebe auswandern. Die Rekrutierung der Leukozyten ist hierbei ein geordneter und komplexer Vorgang (siehe Kapitel II, 1.5).

1.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen des Immunsystems, welche zur Abwehr von für den Organismus schädlichen Pathogenen rekrutiert werden („erste Verteidigungslinie“) [8, 54, 55].

Die Entstehung neutrophiler Granulozyten findet im Knochenmark statt, wo sich hämatopoetische Stammzellen unter dem Einfluss von Wachstumshormonen, wie beispielsweise *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) und Chemokinen (z. B. CXCL1, CCL2 und CXCL10), in neutrophile Granulozyten differenzieren [56]. Dendritische Zellen spielen für die Regulation der Verteilung neutrophiler Granulozyten zwischen dem Knochenmark, den Organen und dem Blut (systemische Zirkulation) eine entscheidende Rolle und kontrollieren die Produktion von G-CSF und Chemokinen [57].

In der Maus zirkulieren etwa 1 bis 2 Prozent der neutrophilen Granulozyten im Blut [58]. Neutrophile Granulozyten unterliegen einem hohen Umsatz und ihre Lebensspanne beträgt ca. 5 Tage [59]. Die Zeit, in welcher sich eine individuelle Zelle in der Blutbahn befindet, beträgt etwa 6–12 Stunden [60]. Die Extravasation vom Gefäßsystem in das Gewebe und der Abbau von gealterten neutrophilen Granulozyten ist durch den Chemokinrezeptor CXCR4 reguliert und findet in Leber, Milz und im

Literaturübersicht

Knochenmark statt [61]. Gealterte neutrophile Granulozyten sind außerdem hoch reaktive Zellen, welche aus der Zirkulation besonders schnell an den Ort einer Entzündungsreaktion rekrutiert werden und zudem eine höhere Phagozytose-Aktivität aufweisen als jüngere neutrophile Granulozyten [62].

Sobald Pathogene (Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten) in den Organismus eindringen, werden durch residente Zellen im Gewebe (z. B. Makrophagen und Mastzellen) chemotaktisch wirksame Moleküle (beispielsweise Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin 1 beta (IL-1 β) und verschiedene Chemokine) sezerniert und eine Endothelzellaktivierung hervorgerufen. Aktivierte Endothelzellen produzieren wiederum chemotaktisch wirksame Moleküle und präsentieren diese an der luminalen Seite in postkapillären Venolen, um zirkulierende neutrophile Granulozyten an den Ort der Entzündung zu dirigieren [63]. Mastzellen und Makrophagen können die Migration von neutrophilen Granulozyten zu bestimmten Orten im Gewebe beeinflussen [64]. Während der Transmigration von neutrophilen Granulozyten in das Gewebe kommt es zu Änderungen wie beispielsweise erhöhter Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase-Aktivität [65] und Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (z. B. des Chemokins CXCL8 [66]).

Zur Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen verfügen neutrophile Granulozyten über ein Repertoire an antimikrobiellen „Waffen“, wie beispielsweise NADPH-Oxidase, Myeloperoxidase und Neutrophilenelelastase [67]. Pathogene können phagozytiert und in Phagosomen eliminiert werden [68]. Ein weiterer wichtiger Abwehrmechanismus neutrophiler Granulozyten ist die Bildung von extrazellulären Netzen („NETosis“). Hierbei handelt es sich um eine Freisetzung von Zellkern-DNA der neutrophilen Granulozyten, welche weitere Moleküle wie Proteasen (z. B. Neutrophilenelelastase), Histone und andere antimikrobielle Substanzen an sich gebunden haben. Dieser Mechanismus führt zu einer Kompartimentalisierung und effektiven Bekämpfung von Pathogenen [32, 42, 69]. Die NET-Bildung kann entweder durch Zell-Lyse (3-4 Stunden nach Neutrophilenaktivierung [70]) oder durch DNA-Freisetzung aus Vesikeln (30-60 Minuten nach Stimulierung [71]) erfolgen. Auch aktivierte Thrombozyten spielen für die schnelle NET-Bildung eine wesentliche Rolle [32].

Die Wichtigkeit der neutrophilen Granulozyten für die Abwehr von pathogenen Mikroorganismen lässt sich nachvollziehen, wenn man die hohe Rate an Infektionen mit letalem Ausgang bei neutropenen Patienten in Betracht zieht [72, 73].

1.2 Monozyten

Monozyten entstehen aus Vorläuferzellen der myeloiden Reihe und gehören zu den Effektorzellen des Immunsystems. Diese Zellen zirkulieren nach Chemokin-vermittelter Mobilisation aus dem Knochenmark [74] für ein bis drei Tage im Gefäßsystem, bevor sie in das Gewebe auswandern und sich dort in residente Makrophagen oder dendritische Zellen differenzieren [75]. Monozyten können in Subpopulationen unterteilt werden. Murine Monozyten, welche hauptsächlich die Oberflächenrezeptoren Ly6C und CCR2 exprimieren und nur wenige Moleküle des Chemokinrezeptors CX₃CR1 auf der Zelloberfläche tragen, werden inflammatorische Monozyten (iMOs) genannt. Diese sind, zusammen mit den neutrophilen Granulozyten, Hauptakteure bei der Bekämpfung von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen [76-78] in der akuten Infektion.

Residente Monozyten (rMOs) exprimieren hingegen insbesondere den Chemokinrezeptor CX₃CR1 und nur wenig Ly6C und CCR2. Diese Zellen sind durch ein patrouillierendes Verhalten gekennzeichnet [79], wobei das Gefäßsystem nach Infektionen abgesucht und ein schnelles Auswandern von residenten Monozyten in diesen Bereichen gewährleistet wird. Dies kann wiederum eine Immunreaktion auslösen und residente Monozyten können sich vor Ort zu Makrophagen differenzieren.

1.3 Basophile und eosinophile Granulozyten

Eosinophile und basophile Granulozyten sind vor allem bei allergischen Reaktionen wie Asthma, atopischen Ekzemen und allergischer Rhinitis von Bedeutung. Bei diesen Prozessen spielen membrangebundene IgE-Antikörper auf basophilen Granulozyten eine entscheidende Rolle. Diese führen nach Antigenbindung zur Degranulation der

Zellen mit Histaminfreisetzung [80]. Außerdem sind eosinophile Granulozyten Schlüsselzellen bei der Bekämpfung von Parasiten [81] und sind maßgeblich an einigen Autoimmunerkrankungen (z. B. Churg-Strauss Vaskulitis [82] und eosinophiler Myokarditis) beteiligt [83]. Für die in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen spielen basophile und eosinophile Granulozyten eine untergeordnete Rolle.

1.4 B-, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen

B- und T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark aus lymphoiden Vorläuferzellen. Eine weitere Ausreifung dieser Zellen findet in den lymphatischen Organen (Thymus, Milz, Lymphknoten und Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe) statt. T-Lymphozyten sind für die erworbene, zellvermittelte Immunantwort verantwortlich und erkennen durch T-Zell-Rezeptoren Antigene, welche an der Zelloberfläche an Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen I oder II (MHC von engl. *major histocompatibility complex*) präsentiert werden. MHC I Moleküle kommen auf allen kernhaltigen Zellen des Organismus und MHC II Moleküle auf den Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems vor [84]. Man unterscheidet CD4-positive T-Helferzellen, die primär regulatorische Aufgaben übernehmen, von CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, die durch Granula mit Zell-schädigenden Enzymen zum Zelltod von infizierten Zellen führen. Außerdem gibt es weitere T-Zell-Populationen wie zum Beispiel regulatorische T-Zellen (T_{Reg}). Bei der positiven Selektion im Thymus werden T-Zellen, deren Rezeptoren nicht an körpereigene MHC I Moleküle binden, eliminiert. T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor zu stark an körpereigene MHC I Moleküle bindet, können nicht zwischen „fremd“ und „eigen“ unterscheiden und werden anschließend ebenfalls eliminiert (negative Selektion). Die Bindungsstärke (Affinität) der T-Zell-Rezeptoren an körpereigene MHC-Moleküle ist mitverantwortlich dafür, ob sich die Zellen zu CD4-positiven T-Helferzellen, CD8-positiven zytotoxischen Zellen oder regulatorischen T-Zellen differenzieren [85].

B-Lymphozyten sind die Zellen der humoralen Immunantwort. Sie tragen Immunglobuline als B-Zell-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, mit denen sie Antigene binden können. Anschließend können sich die B-Zellen zu Plasmazellen differenzieren, welche spezifische Antikörper produzieren [86, 87].

Natürliche Killerzellen (NKs) sind große Lymphozyten, welche dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden. Diese Zellen produzieren Zytokine (insbesondere Interferon- γ) sowie Chemokine und können infizierte oder entartete Zellen eliminieren [88].

1.5 Rekrutierungsprozess

Um eine Entzündungsreaktion auszulösen und ihre Abwehrfunktion ausüben zu können, müssen Effektorzellen des Immunsystems (wie beispielsweise neutrophile Granulozyten) durch die Zirkulation an den Ort des Geschehens gelangen. Hierbei spielen chemotaktische Moleküle eine entscheidende Rolle (siehe Kapitel II, 2).

Eine lokalisierte Schädigung von Gewebe (durch Pathogene oder mechanische Verletzungen) führt zu einer Aktivierung von ortsansässigen Zellen mit Wächterfunktion, wie beispielsweise Makrophagen, Mastzellen, Perizyten und dendritische Zellen [7, 64, 89, 90]. Diese Zellen aktivieren weitere Zellen in ihrer Umgebung, darunter insbesondere Endothelzellen. Die Endothelzellen präsentieren daraufhin chemotaktische Moleküle, Selektine und Proteine der Immunglobulin-Superfamilie an ihrer luminalen Zelloberfläche, welche mit zirkulierenden Leukozyten interagieren. Es kommt zu einem kaskadenartig verlaufenden, komplexen Vorgang, welcher durch die oben genannten Moleküle fein reguliert ist und im folgenden Abschnitt genauer erklärt wird.

Aktivierte Endothelzellen mobilisieren und präsentieren P-Selektin/CD62P (schneller Prozess; P-Selektin ist in Weibel-Palade-Körperchen gespeichert) und E-Selektin/CD62E (langsamer Prozess; meist *de-novo*-Synthese; eine Ausnahme stellen z. B. dermale Venolen dar mit konstitutiver Expression von E-Selektin [91]) auf ihrer luminalen Zelloberfläche. Auch Adhäsionsmoleküle wie *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1/CD54) werden an der Oberfläche von Endothelzellen im Laufe einer Entzündungsreaktion verstärkt exprimiert. Zirkulierende Leukozyten interagieren mittels verschiedener Rezeptoren und Liganden mit Endothelzellen. Dazu gehören *P-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL-1/CD162), *E-selectin ligand-1* (ESL-1), der Ligand CD44 sowie Integrine in einer schwach-bindenden Konformation. Dies führt zum Einfangen (engl. „capture and tethering“) und Rollen der Zellen auf dem Endothel.

Literaturübersicht

Hierbei können auch lang gezogene Ausläufer (engl. „*tether*“) der rollenden Zellen entstehen, welche im weiteren Prozess des Rollens abreißen und nach vorne schnellen, um erneut Bindungen einzugehen (engl. „*sling*“). Dieser Vorgang ermöglicht Rollen bei hohen Scherkräften. Durch chemotaktische Moleküle wie beispielsweise Chemokine, welche an G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren auf Leukozyten binden, kommt es während des Rollens zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, welche nachfolgend zu einer Konformationsänderung von Integrinen führen. Tyrosinkinasen (*spleen tyrosin kinase*, SYK) spielen bei diesen Vorgängen eine wichtige Rolle [92]. Hierbei entsteht die hochaffine Konformation der Integrine und die Leukozyten kommen durch Wechselwirkung der Integrine mit Molekülen der Immunoglobulin-Superfamilie auf dem Endothel zum Stillstand. Dieser Schritt wird als feste Adhärenz bezeichnet und erfolgt hauptsächlich durch Wechselwirkungen von den Integrinen *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1/CD11a), *macrophage-1 antigen* (Mac-1/CD11b) und *very late antigen-4* (VLA-4/CD49d) mit ICAM-1 oder *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1/CD54) der Immunoglobulin-Superfamilie. Das Protein Midkine ruft in neutrophilen Granulozyten eine Konformationsänderung von β 2-Integrinen hervor, wodurch die Adhäsion dieser Zellen ermöglicht wird [93]. Es folgt ein Mac-1/CD11b, LFA-1/CD11a und ICAM-1/CD54 abhängiges intravaskuläres Kriechen der Leukozyten („*crawling*“) auf dem Gefäßendothel, um geeignete Bereiche für die Auswanderung der Zellen in das Gewebe zu finden. Diese oben genannten komplexen Mechanismen sind gut beschrieben [5, 7, 94, 95]. Welche der jeweiligen Moleküle dabei involviert werden, ist abhängig vom Gewebe und der Art des Stimulus. Der nachfolgende Prozess der Transmigration in das umliegende Gewebe kann entweder transzellulär (durch die Endothelzelle hindurch) oder parazellulär (zwischen benachbarten Endothelzellen) stattfinden [96-98]. Es hat sich gezeigt, dass in den meisten Geweben die parazelluläre Transmigration dominiert, während die transzelluläre Auswanderung nur selten zu beobachten ist (abhängig von der auswandernden Leukozytenpopulation und Gewebeart). Wichtige, am Prozess der Transmigration beteiligte Moleküle sind die Integrine LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d, sowie *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1/CD31), CD99 und ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102, *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1/CD106), *junctional adhesion*

molecules (JAMs), *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM) und *vascular endothelial-cadherin* (VE-cadherin/CD144) auf Endothelzellen.

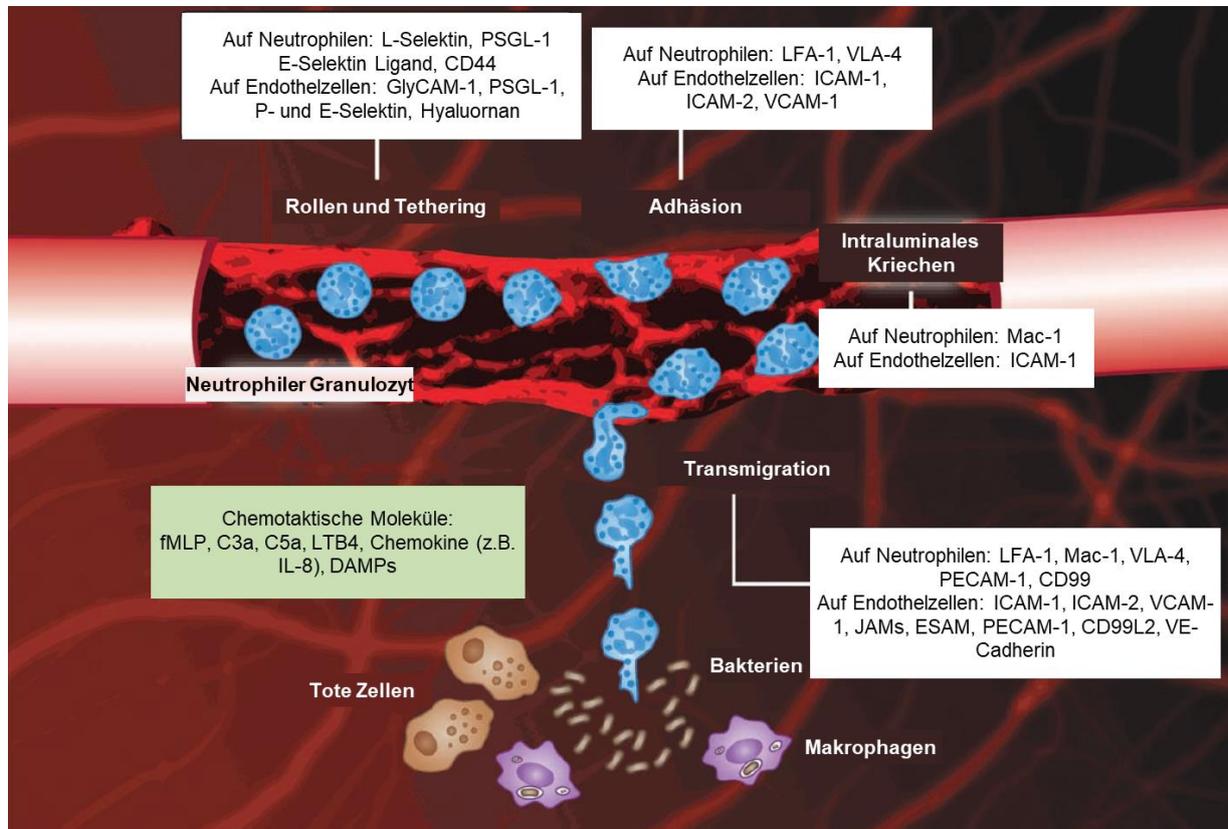


Abbildung 2: Leukozytenrekrutierung am Beispiel eines neutrophilen Granulozyten, modifiziert nach [7].

In der Abbildung 2 ist der vollständige Ablauf der Leukozytenrekrutierung aus dem Gefäßsystem in das perivaskuläre Gewebe am Beispiel eines neutrophilen Granulozyten dargestellt.

Bei defekter Leukozytenrekrutierung, wie beispielsweise den *leukocyte adhesion deficiency* Erkrankungen (LAD1 mit Defekten in LFA-1/CD11a und Mac-1/CD11b, LAD2 mit Defekten in den Liganden von P-Selektin/CD62P und E-Selektin/CD62E und LAD3 mit Defekten in den Proteinen, welche für die Konformationsänderung der Integrine LFA-1/CD11a und Mac-1/CD11b in die hochaffine Konformation notwendig sind), kommt es wiederholt zu schweren bakteriellen Infekten mit oftmals letalem Ausgang [99, 100].

2 Chemotaktische und Pathogen-assoziierte Moleküle

2.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind chemotaktische Zytokine mit Schlüsselfunktionen bei Immunreaktionen [9-11] und der Regulation von Proliferations- und Migrationsprozessen, wie beispielsweise der Freisetzung von bestimmten Immunzellpopulation aus dem Knochenmark [61, 101]. Chemokine sind kleine Proteine (8 bis 14 kDa), welche nach Anzahl und Anordnung ihrer Cysteinreste am Aminoterminus in unterschiedliche Gruppen unterteilt werden. Man unterscheidet C (auch „XC“ genannt), CC, CXC und CX₃C Chemokine, wobei X die Anzahl an Aminosäuren zwischen den Cysteinresten beschreibt. Die Struktur der Chemokine ist in Abbildung 3 dargestellt.

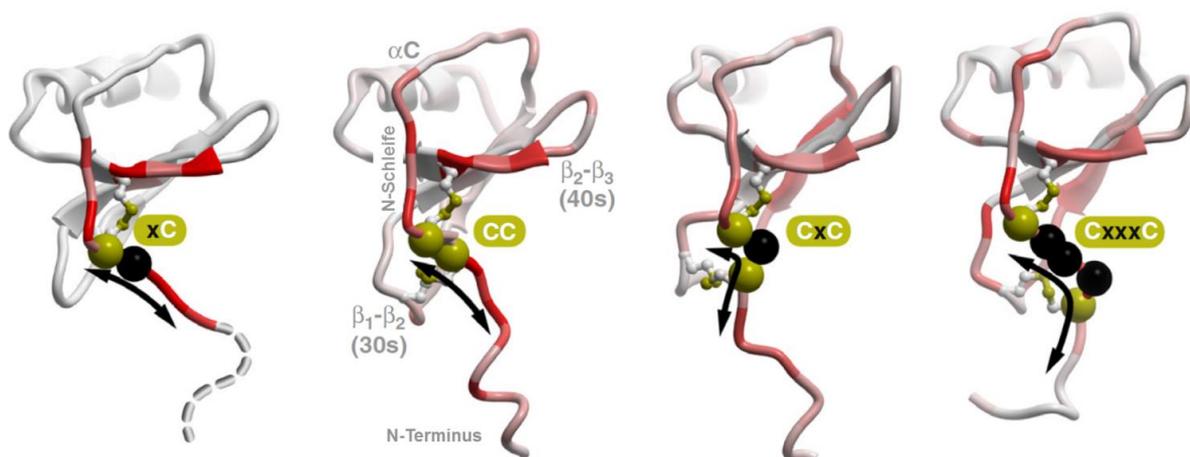


Abbildung 3: Schematische Darstellung der 3D-Proteinstrukturen der Chemokin-Oligomere mit Anordnung der Cystinreste („C“) und Anzahl der dazwischen liegenden Aminosäuren („X“) innerhalb der Proteine, modifiziert nach [102].

Es hat sich gezeigt, dass Chemokine Dimere oder sogar Oligomere bilden und somit unterschiedliche Epitope für Wechselwirkungen mit Chemokinrezeptoren zur Verfügung stellen können [102]. Genaue Details sind hier noch unzureichend aufgeschlüsselt.

Chemokinrezeptoren haben sieben Transmembranbereiche und drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen (Proteinstrukturen, welche aufgrund von Wechselwirkungen, wie zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen, schleifenartig geformt sind) und

gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die Signaltransduktion verläuft über heterotrimere G-Proteine der G_i Familie [103]. Durch Strukturveränderungen des Chemokinrezeptors bei Bindung von Chemokinen wird ein Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) mit Guanosintriphosphat (GTP) am G-Protein ermöglicht und somit eine Dissoziation der $G_{\alpha i}$ - und β -, γ -Untereinheit bewirkt. Die Bindung von Chemokinen an G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren führt zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, welche letztendlich durch Beeinflussung der Adhäsion und Migration von Leukozyten zur spezifischen Rekrutierung dieser Zellen führt [12-14]. In der durch Chemokine ausgelösten Signalkaskade spielt die Phosphoinositid-3-(PI3)-Kinase eine wesentliche Rolle. Sie führt zur Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat an der Hydroxylgruppe an der 3. Position des Inositol-Rings. Hierdurch kommt es zur weiteren Aktivierung von Kinasen, wie beispielsweise der Proteinkinase B (PKB). Besonders die γ - und δ -Isoformen der PI3-Kinase spielen bei Rekrutierungsprozessen von Immunzellen ins Gewebe eine entscheidende Rolle [40].

Um bestimmte Leukozyten-Subpopulationen gezielt zum Ort des entzündlichen Geschehens zu dirigieren, spielen räumliche und zeitliche Expressionsprofile von Chemokinen und deren Chemokinrezeptoren eine entscheidende Rolle. Bisher galt die Annahme, dass CXC-Chemokine, wie beispielsweise CXCL1 oder CXCL2, hauptsächlich auf neutrophile Granulozyten wirken, während CC-Chemokine, wie zum Beispiel CCL3, hauptsächlich auf T-Lymphozyten und Monozyten wirken [10, 12-14]. Doch auch CC Chemokine sind an der Rekrutierung von eosinophilen [15, 16], basophilen [17, 18] und neutrophilen Granulozyten [19-22] beteiligt und somit in die Vorgänge der primären Immunantwort („erste Verteidigungslinie“) involviert. Der genaue Mechanismus ist hierbei allerdings noch unklar. Zudem wurden CC-Chemokinrezeptoren wie beispielsweise CCR1 und CCR5 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und auf weiteren Zellen, welche für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten wichtig sind (z. B. Endothelzellen und Mastzellen), nachgewiesen [23-29]. Das CC Chemokin CCL3 ist ein inflammatorisches Chemokin, welches zu einer Aktivierung des Immunsystems führt [22, 28, 104-106]. Es wird von verschiedenen Zellen exprimiert. Hierzu gehören insbesondere neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen [107-109]. Lipopolysaccharide und andere bakterielle Moleküle, wie zum Beispiel Flaggelin,

führen zu einer Expression des CC Chemokins CCL3 als Mediator in der akuten Entzündungsreaktion [107-111].

2.2 Lipidmediatoren

Prostaglandine, Leukotriene und Plättchenaktivierender Faktor (PAF) sind klassische Lipidmediatoren, welche bei entzündlichen Vorgängen eine wichtige Rolle spielen. Plättchenaktivierender Faktor (1-O-alkyl-2-azetyl-sn-glyzero-3-phosphocholin) zeigt eine ausgeprägte inflammatorische Wirkung [112, 113], und ist in entzündliche Prozesse wie beispielsweise allergische Reaktionen und Asthma involviert [114, 115]. Die Bildung erfolgt hauptsächlich in Endothelzellen, Fibroblasten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Thrombozyten [116]. PAF wirkt aktivierend auf Leukozyten, kann eine Thrombozytenaggregation auslösen und die Degranulation von Granulozyten hervorrufen. Auch die Permeabilität von Gefäßen kann durch PAF erhöht werden.

2.3 Lipopolysaccharide (LPS)

Unter Lipopolysacchariden (LPS) versteht man Bestandteile der Zellwand von gramnegativen Bakterien. Diese Moleküle werden auch Endotoxine genannt und können starke Immunantworten auslösen. Sie bestehen aus einem Lipid-Anteil, der kovalent mit einem Polysaccharid aus O-Antigen, äußerer und innerer Kernstruktur [117] verbunden ist. Ihre Aufgabe ist die strukturelle Stabilisierung der bakteriellen Zellwand. Über den *Toll-like-Rezeptor* 4 (TLR4) und den Co-Rezeptor Lymphozytenantigen 96 (MD2, auch: LY96) wirkt LPS auf Immunzellen und weitere Zellpopulationen [118-120]. TLR4 und MD2 werden zum größten Teil von Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten, Endothelzellen und Makrophagen exprimiert [121]. Diese Zellen sind maßgeblich an der Immunreaktion beteiligt, welche durch LPS hervorgerufen werden. Bei solchen Immunantworten kann es zum septischen Schock mit lebensbedrohlichem Multiorganversagen kommen [122, 123]. Neue Untersuchungen zeigen, dass LPS über TLR4 auch auf Thrombozyten wirken kann [32]. Dabei kommt es zu einer gesteigerten Interaktion zwischen neutrophilen

Granulozyten und Thrombozyten, welche zur Degranulierung der Immunzellen führt. Zudem führen die LPS-stimulierten Thrombozyten zur Bildung von NETs durch neutrophile Granulozyten in Lebersinusoiden. Diese Mechanismen führen wiederum zum effizienten Einfangen und Eliminieren von Bakterien.

3 Thrombozyten und Thrombusbildung

3.1 Thrombozyten

Thrombozyten (altgriechisch thrómbos „Klumpen“ und kýtos „Hülle“) sind diskoide Zellfragmente, welche aus Abschnürungen von Megakaryozyten in den Sinusoiden des Knochenmarks entstehen. Bei diesem Prozess spielen Sarkomkinasen der Src-Familie eine wesentliche Rolle [124]. Ein einzelner muriner Megakaryozyt bildet zwischen 500 und 1000 Blutplättchen bis zu seinem Zelluntergang und täglich entstehen 480×10^6 Thrombozyten in der Maus [125]. Thrombozyten sind in großer Zahl in der systemischen Zirkulation vorhanden. Ihre Hauptaufgabe besteht in der primären Hämostase (schnelle Thrombusbildung, beispielsweise nach Gefäßverletzung). Hierbei heften sich Blutplättchen an subendotheliale Strukturen, wie z. B. Kollagen, an. Im Folgenden werden die Thrombozyten durch verschiedenste Mediatoren wie Adenosindiphosphat (ADP), Thrombin und Prostaglandine aktiviert und es kommt zur Plättchenaggregation mit der Bildung eines „weißen“ Plättchenthrombus. Folglich werden in den Thrombozyten intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, Oberflächenmoleküle auf den Thrombozyten aktiviert und eine Degranulation der gespeicherten Granula bewirkt [126]. Es befinden sich drei verschiedene Arten von Granula in den Thrombozyten. Zum einen gibt es die Alpha-Granula, welche Adhäsionsmoleküle für interthrombozytäre Interaktionen, Anheftung an die subendotheliale Matrix sowie an aktivierte Endothelzellen enthalten. Hierzu gehören insbesondere P-Selektin/CD62P, PECAM-1/CD31, Glykoprotein GPIIb/IIIa (CD41/CD61), von-Willebrand-Faktor (vWF), Vitronektin und Fibronektin. Zum anderen befinden sich elektronendichten Granula („dense bodies“) in den Thrombozyten, welche Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Serotonin, Kalzium sowie Pyrophosphat enthalten. Des Weiteren sind Lysosomen,

Literaturübersicht

welche Glykosidasen, Proteasen, sowie Peptide mit bakterizider Wirkung [127] beinhalten, vorzufinden.

Interaktionen einzelner Oberflächenmoleküle von Thrombozyten mit entsprechenden Bindungspartnern auf anderen Zellen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Oberflächenmolekül auf Thrombozyt	Interaktionspartner
P-Selektin/CD62P	PSGL-1/CD162 (auf Leukozyten)
ICAM-2/CD102	LFA-1/CD11a (auf Leukozyten)
von-Willebrand-Faktor (vWF)	GPIb α /V/IX (auf Thrombozyten)
GPIb α /V/IX	vWF (hauptsächlich bei hohen Schergeschwindigkeiten), P-Selektin /CD62P, Mac-1/CD11b
CD40L	CD40 (auf Leukozyten und Endothelzellen)

Tabelle 1: Oberflächenmoleküle auf Thrombozyten und Interaktionspartner auf anderen Zellen, modifiziert nach [127].

Die Thrombozytenadhäsion und Aggregation ist ein komplexer Vorgang mit mehreren Schritten. Verschiedene Moleküle auf der Oberfläche der Thrombozyten sowie deren Interaktionspartner sind an diesen Ereignissen beteiligt. Es ist bekannt, dass je nach vorhandenen Scherkräften während der Adhäsion und Aggregation unterschiedliche Moleküle involviert sind. Bei höheren Schergeschwindigkeiten ($> 1000 \text{ s}^{-1}$) sind initial vor allem Bindungen von Glykoprotein GPIb α /V/IX mit vWF von großer Bedeutung. Je höher die vorherrschenden Scherkräfte, umso wichtiger werden Bindungen von GPIb α und Fibronectin und umso weniger wichtig sind Interaktionen von Fibrinogen mit GPIIb/IIIa [128-130].

Literaturübersicht

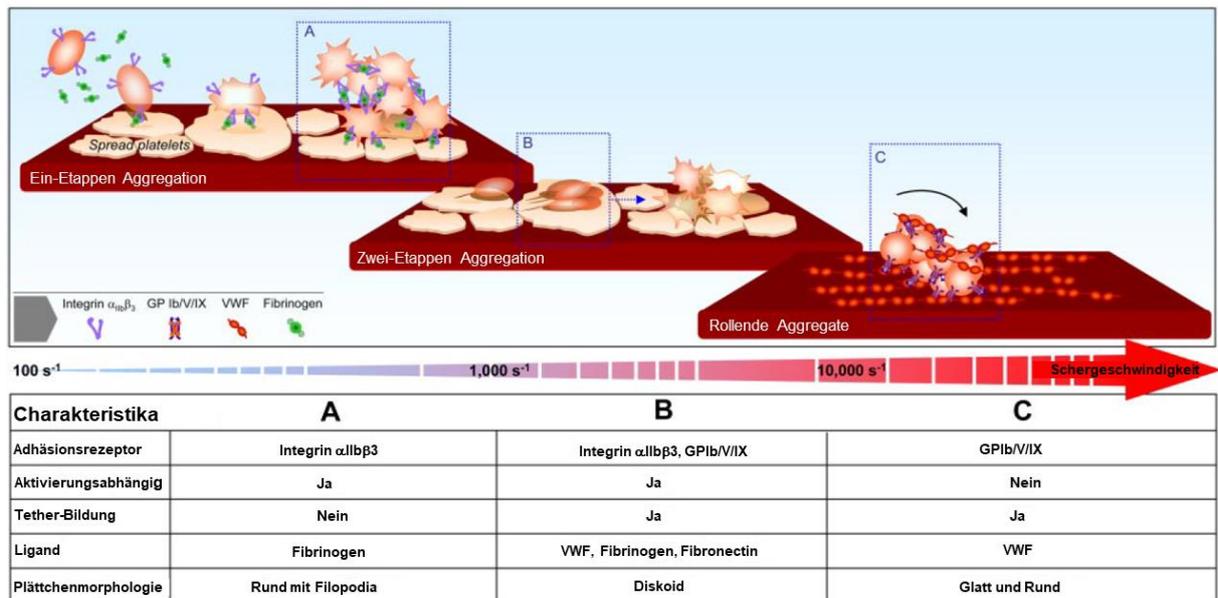


Abbildung 4: Einfluss verschiedener Oberflächenmoleküle von Thrombozyten und deren Interaktionspartner auf die Thrombusbildung in Abhängigkeit von der vorherrschenden Schergeschwindigkeit, modifiziert nach [128].

Bei der Thrombozytenadhäsion und der darauffolgenden Aggregation kann es auch zur Ausbildung von Membranfäden (sogenannte „tethers“) kommen. Diese membranösen Strukturen spielen vor allem bei der initialen Adhäsion von Thrombozyten an subendotheliale Strukturen, Endothelzellen oder weitere Thrombozyten eine wesentliche Rolle. Die Ausbildung der „tethers“ ist ebenfalls abhängig von den vorherrschenden Scherkräften und wird erst ab einer Schergeschwindigkeit von 1000 s^{-1} und höher beobachtet [130-132]. Die für die Thrombozytenadhäsion verantwortlichen Interaktionen von vWF mit GPIb α werden vor allem über vWF vermittelt, welches von Endothelzellen synthetisiert wird und im Blutplasma vorhanden ist [133]. Neben der entscheidenden Rolle der Thrombozyten bei der primären Hämostase hat sich in neueren Untersuchungen auch ein wichtiges Zusammenspiel von Thrombozyten und Immunzellen gezeigt, welches bei inflammatorischen Reaktionen von großer Bedeutung ist. So hat sich herausgestellt, dass neutrophile Granulozyten nach aktivierten, am Endothel befindlichen Thrombozyten suchen und mit diesen interagieren. Diese Interaktionen erfolgen durch Wechselwirkung von P-Selektin/CD62P auf Thrombozyten mit PSGL-1/CD162 auf den Immunzellen und ist von entscheidender Bedeutung in pathologischen Prozessen wie beispielsweise der Entwicklung eines akuten Lungenversagens [134]. Auch

Interaktionen von Immunzellen und Thrombozyten über CD40 und CD40L können die Immunzellen an den Ort einer Entzündung dirigieren und somit die Immunantwort entfachen [135]. Es hat sich zudem gezeigt, dass starke inflammatorische Reaktionen, wie beispielsweise eine systemische Entzündung durch Endotoxämie, die mikrovaskuläre, Thrombozyten-abhängige Thrombusbildung verstärken kann [136-138]. Weitere Interaktionen von Thrombozyten mit Immunzellen werden im Kapitel II, 3.3 näher beleuchtet.

3.2 Plasmatische Blutgerinnung

Die plasmatische Blutgerinnung wird auch als sekundäre Hämostase bezeichnet. Es handelt sich hierbei um eine Kaskade an enzymatischen Reaktionen, welche durch Serinproteasen katalysiert werden. Vorläuferenzyme (die Enzyme bezeichnet man als Faktoren) werden zu aktiven Enzymen gespalten, welche wiederum zur Aktivierung weiterer Serinproteasen führen. Zwei initiale Wege werden unterschieden: Der intrinsische Weg, welcher mit der Aktivierung von Faktor XII beginnt und der extrinsische Weg, bei dem Faktor VII bei Kontakt mit *tissue factor* (ein Membranprotein, welches beispielsweise von Fibroblasten, Perizyten, glatten Muskelzellen der Gefäßwand und Zellen der myeloiden Reihe exprimiert wird) zuerst aktiviert wird. In der gemeinsamen Endstrecke beider Wege wird Prothrombin zu Thrombin gespalten, welches wiederum die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin katalysiert. Durch die Zwischenvernetzung der einzelnen Fibrinmoleküle kommt es zur Ausbildung eines Fibrin-Thrombus. Thrombin ist das Schlüsselenzym bei diesem Vorgang und hat neben der Aufgabe, Fibrin zu aktivieren, weitere Funktionen. Hierzu gehört auch die Aktivierung von Thrombozyten und eine Verstärkung des Gerinnungsprozesses über einen positiven Rückkopplungsmechanismus [139, 140]. Als Kofaktoren bei der Blutgerinnung sind Calcium und Phospholipide involviert. Die Synthese der Gerinnungsfaktoren findet in der Leber statt und ist Vitamin K-abhängig. Negative Regulationsmechanismen der plasmatischen Gerinnung mit antithrombotischer oder fibrinolytischer Wirkung werden von Protein C, Antithrombin, *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) und Plasmin getragen.

Literaturübersicht

Neben der physiologisch wichtigen Funktion der Beendigung von Blutungen, ist die plasmatische Gerinnung auch an pathologischen Prozessen beteiligt. Sie spielt bei Herzinfarkten, Schlaganfällen und der tiefen Venenthrombose eine maßgebliche Rolle.

Die Prozesse der primären und sekundären Hämostase laufen gleichzeitig ab und ergänzen sich, sodass es zur Ausbildung eines stabilen Thrombus kommen kann (siehe Abbildung 5) [30, 141, 142].

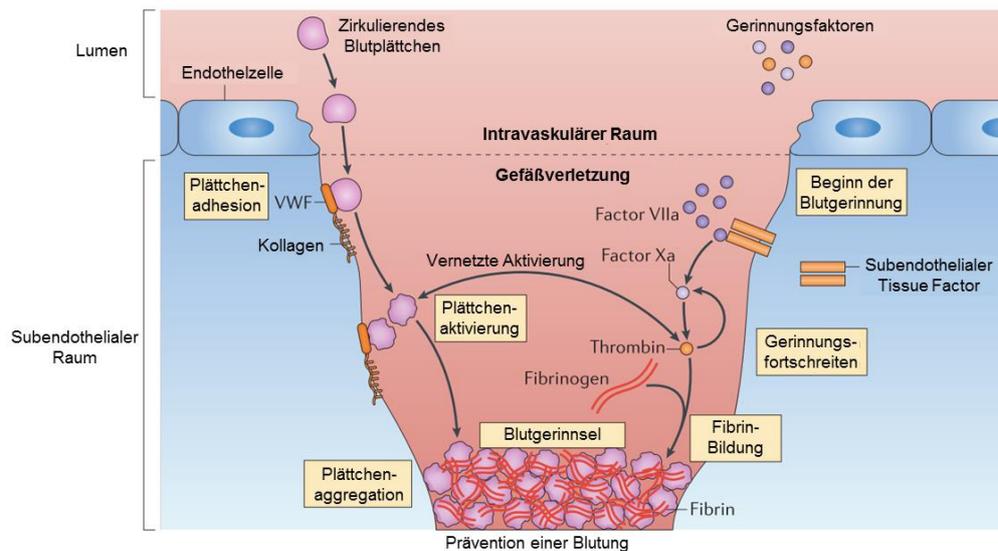


Abbildung 5: Parallel ablaufende Prozesse der primären und sekundären Hämostase zur Generation eines stabilen Thrombus nach Gefäßverletzung, modifiziert nach [30].

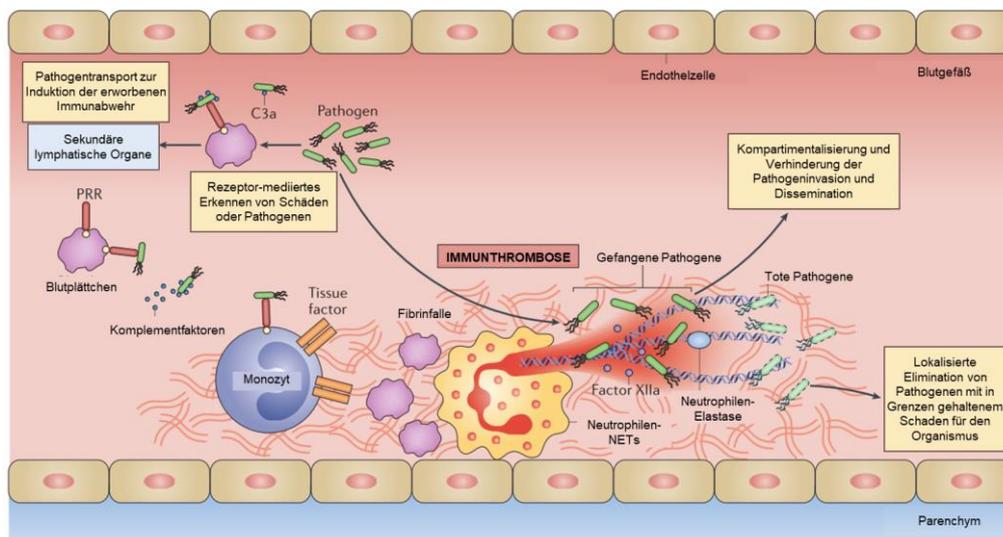
Die Mechanismen der Immunthrombose werden im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

3.3 Immunthrombose

Unter Immunthrombose versteht man die Vernetzung von Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität mit Prozessen der Blutgerinnung [30, 33, 143]. Diese Mechanismen sind phylogenetisch mehr als 400 Millionen Jahre alt und dienen primär der Abwehr von Pathogenen [144]. Eine Dysregulation dieser Prozesse ist jedoch gefährlich für den Organismus und kann beträchtlichen Schaden anrichten. So hat sich

Literaturübersicht

beispielsweise gezeigt, dass die Immunthrombose wesentlich zur Entstehung der tiefen Venenthrombose beiträgt [34, 36]. Insbesondere Interaktionen von Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen (z. B. über P-Selektin/CD62P, PSGL-1/CD162 und GPIb α), aber auch Mechanismen der plasmatischen Gerinnung mit Einbeziehung von *tissue factor* aus Zellen der myeloiden Reihe sind entscheidende Ereignisse bei der Bildung eines tiefen Venenthrombus. Außerdem kommt es zur Bildung von NET-Strukturen durch neutrophile Granulozyten, welche Faktor XII binden können und somit den intrinsischen Weg der Blutgerinnung auslösen und wesentlich verstärken. Ein Beispiel für den physiologischen Nutzen der Immunthrombose ist das Einfangen von Bakterien unter septischen Bedingungen. Neutrophile Granulozyten bilden hierbei NET-Gerüste in den Lebersinusoiden aus, nachdem sie von Thrombozyten aktiviert wurden. Diese netzartigen DNA- und Histongebilde können zirkulierende Bakterien aus der Lebermikrozirkulation sequestrieren und hierdurch eine weitere systemische Streuung verhindern sowie eine räumliche Nähe zwischen Pathogenen und Immunzellen herstellen, welche bei der weiteren Pathogenbekämpfung durch die Immunzellen von Nutzen ist [32, 69]. In Abbildung 6 ist das Einfangen von Pathogenen durch immunthrombotische Vorgänge dargestellt.



6: Einfangen von pathogenen Organismen durch immunthrombotische Vorgänge (plasmatischer Gerinnung, Thrombozytenadhäsion und Rekrutierung von Immunzellen) mit Ausbildung von NETs, modifiziert nach [30].

III Zielsetzung der Arbeit

Folgende Ziele wurden für diese Arbeit definiert:

Im ersten Teil der Arbeit sollen die Mechanismen einer durch das CC-Chemokin CCL3-vermittelten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das perivaskuläre Gewebe untersucht werden:

- 1) Welche Bedeutung haben die leukozytären und nicht leukozytären Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 auf die Rekrutierungsmechanismen?
- 2) Welche Signal- und Adhäsionsmoleküle sind an diesem Vorgang beteiligt?
- 3) Transmigrieren die Leukozyten über parazelluläre oder transzelluläre Wege ins Gewebe?
- 4) Welche Unterschiede lassen sich im Vergleich zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch „klassische Mediatoren“ wie CXCL1 oder PAF feststellen?

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Bedeutung von neutrophilen Granulozyten für die mikrovaskuläre Thrombusbildung und der Auswirkung dieses Prozesses auf die Dissemination von Pathogenen:

- 1) Welchen Effekt hat die akute, lokale Entzündung auf die mikrovaskuläre Thrombose verglichen mit mikrovaskulärer Thrombusbildung in nicht-entzündetem Gewebe?
- 2) Welche Bedeutung haben neutrophile Granulozyten im Prozess der mikrovaskulären Thrombose unter entzündlichen Bedingungen?
- 3) Haben rheologische Effekte nahe der Gefäßoberfläche Einfluss auf die mikrovaskuläre Thrombusbildung?
- 4) Welche Moleküle haben Schlüsselfunktionen bei diesen Ereignissen?
- 5) Welchen biologischen Nutzen haben immunthrombotische Vorgänge in der Mikrozirkulation?

IV Material und Methoden

1 Genehmigung und Vorbemerkung

Alle durchgeführten Tierexperimente sind in der Zeit von Januar 2012 bis März 2017 am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München unter den Tierversuchsanträgen AZ 55.2-1-54-2531.84/09 und 55.2-1-54-2532-115-12 mit der Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt worden.

2 Mausstämme und Tierhaltung

Unterschiedliche Mauslinien wurden für die unten beschriebenen Experimente verwendet. Wildtyp C57BL/6N-Mäuse und Wildtyp Balb/cAnNCrI-Mäuse wurden bei Charles River (Sulzfeld, Deutschland) erworben. Zur Untersuchung der Rolle der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe wurden Ccr1-defiziente und Ccr5-defiziente Mäuse von PD Dr. B. Luckow (Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität München), wie in [145] beschrieben, generiert und für 10 Generationen (Ccr1) oder 13 Generationen (Ccr5) auf den Balb/c-Stamm zurückgekreuzt. Diese Tiere entsprechen vom Phänotyp den Balb/c Kontrollmäusen, sind überlebensfähig und paarungsfähig. Männliche, 20 bis 25 Wochen alte Balb/c, Ccr1- und Ccr5-defiziente-Mäuse wurden für den ersten Teil der Arbeit verwendet. Für den zweiten Teil der Arbeit wurden acht bis zwölf Wochen alte, männliche C57BL/6N Mäuse untersucht.

Die Haltung der Mäuse erfolgte im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin in einer räumlich abgetrennten Einheit in Gruppen von drei bis fünf Tieren in Makrolonkäfigen. Freier Zugang zu Futter und Wasser wurde gewährt und mittels Zeitschaltuhr-abhängiger Beleuchtung wurde ein zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus vorgegeben. Die Aufzucht der Tiere erfolgte in individuell belüfteten Käfigen unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen.

3 *In-vivo* Experimente

3.1 Narkose

Zur Einleitung einer Anästhesie wurde eine intraperitoneale Injektion mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) in Verdünnung mit Natriumchlorid 0,9% (2,5 : 0,5 : 7) durchgeführt. Die Narkose wurde durch wiederholte Injektion von Ketamin und Natriumchlorid 0,9% (3 : 7) bis zur Beendigung des Versuchs fortgeführt. Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde während der Präparation durch eine Wärmeplatte und während der Intravitalmikroskopie durch Wärmestrahler aufrechterhalten.

Für schnell durchführbare Injektionen (intraskrotal oder intravenös über die Schwanzvene) wurde eine kurzzeitige Gasnarkose mit Isofluran (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und N₂O mit Sauerstoff (F_{IO}₂ 0,35) verwendet.

3.2 Chirurgische Präparation und Injektionstechniken

3.2.1 Präparation des *M. cremaster*

Zur Untersuchung der Mikrozirkulation auf zellulärer Ebene *In-vivo* bietet sich die Intravitalmikroskopie am *M. cremaster* der Maus an. Dieser Muskel ist leicht zugänglich und kann durch eine ventrale Inzision auf einer individuell gefertigten Mikroskopierbühne dünn ausgebreitet werden. Nach Präparation können biologische Prozesse mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchlichtmikroskopie visualisiert werden. Die Präparation wurde mit geringfügigen Modifikationen nach dem Protokoll des Erstbeschreibers Baez [146] durchgeführt. Während der Präparation wurde ein Lichtmikroskop (Leitz, Wetzlar, Deutschland) mit 16-facher Vergrößerung benutzt. Nach Narkoseeinleitung wurde das Versuchstier mit Pflasterstreifen auf einer individuell angefertigten Bühne auf dem Rücken liegend fixiert. Das Skrotum wurde anschließend auf der rechten Seite inzidiert und eröffnet. Nach Exposition des rechten Hodens und Nebenhodens mit dem umhüllenden *M. cremaster* wurde vorsichtig eine Elektrokauterisation der ventralen, möglichst avaskulären Zone des Muskels mit einer

Material und Methoden

bipolaren Elektrokoagulations-Pinzette vorgenommen. Dieser wurde daraufhin im elektrokoagulierten Bereich ventral eingeschnitten, aufgeklappt, aufgespannt und mit Nadeln (L-förmig gebogene 30 G Kanülenspitzen) fixiert. Hoden und Nebenhoden wurden nach Ablösen vom Muskel vorsichtig in die Bauchhöhle zurückmobilisiert. Während der gesamten Prozedur wurde das Gewebe mit körperwarmer, gepufferter, physiologischer Kochsalzlösung (PBS) benetzt.

3.2.2 Katheterisierung der *A. femoralis*

Zur Verabreichung von Antikörpern, Inhibitoren, fluoreszierenden Mikrosphären oder Fluoreszenzfarbstoffen wurde eine retrograde Kanülierung der *A. femoralis* vorgenommen. Auf diese Weise kann die Mikrozirkulation des *M. cremaster* mit Umgehung des Lungenkreislaufs direkt erreicht werden. Die chirurgische Präparation wurde auf einer Wärmeplatte und unter einem Lichtmikroskop (Leitz, Wetzlar, Deutschland) mit 16-facher Vergrößerung durchgeführt. Nach Narkoseeinleitung wurde die Maus auf dem Rücken liegend mit Pflasterstreifen fixiert und eine Inzision der Leistenregion links vorgenommen. Die exponierten Strukturen (von innen: *V. femoralis*, *A. femoralis* und *N. femoralis*) wurden vorsichtig mittels stumpfer Präparation voneinander getrennt und die *A. femoralis* mit einem dünnen Polypropylenkatheter (Innendurchmesser von 0,28 mm, Portex, Lythe, Großbritannien) retrograd kanüliert. Der Katheter wurde mittels Nahtmaterial fixiert und der Hautschnitt durch zwei Einzelknopfnähte wieder verschlossen. Während der gesamten Prozedur wurde das Präparationsgebiet mit körperwarmer, gepufferter, physiologischer Kochsalzlösung benetzt.

3.2.3 Schwanzveneninjektion

Zur intravenösen Verabreichung von Antikörpern oder Inhibitoren wurde eine Schwanzveneninjektion durchgeführt. Die lateralen Venen des Schwanzes sind hierbei gut zugänglich und bieten einen ausreichenden Durchmesser für die Punktion mit einer Kanüle der Größe 30 G. In der Vorbereitung wurde ein dünner

Material und Methoden

Polypropylenkatheter mit der Spitze einer 30 G-Kanüle konnektiert und mit PBS gespült. Nach Einleitung einer Gasnarkose wurde die anästhesierte Maus mittels Pflasterstreifen auf einer Wärmeplatte fixiert. Der Schwanz des Tieres wurde zwischen Zeigefinger und Mittelfinger im proximalen Drittel gehalten und die Venen auf diese Weise gestaut. Distal wurde die Haut mit Cutasept F (Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) desinfiziert. Mit einer gebogenen Pinzette wurde nun die Spitze der 30 G-Kanüle gegriffen und die Punktion der Vene durchgeführt. Die intravasale Lage der Kanüle konnte durch zurückfließendes venöses Blut verifiziert und im Anschluss die Injektion durchgeführt werden. Nach Wiedererwachen der Tiere wurden diese in Einzelkäfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter bis zur Fortführung des Versuchs gehalten.

3.2.4 Entzündliche Stimulation des *M. cremaster*

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Mechanismen der Rekrutierung von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten in das Gewebe nach intraskrotaler Stimulation mit Chemokinen und Lipidmediatoren (CCL3, CXCL1 und PAF) im *M. cremaster* untersucht. Im zweiten Teil der Dissertation wurde die mikrovaskuläre Thrombusbildung nach intraskrotaler Stimulation mit LPS analysiert. Hierzu wurden die Versuchstiere jeweils durch eine kurze Gasnarkose anästhesiert, bevor eine intraskrotale Injektion des entsprechenden inflammatorischen Stimulus in Lösung mit PBS injiziert wurde. Das Gesamtvolumen der Injektion belief sich auf 0,4 ml. Vor der Injektion wurde die rechte Seite des Hodens mit Cutasept F desinfiziert und mit einer 30 G-Kanüle eingestochen. Nach vorsichtiger Aspiration wurde im Anschluss das Volumen verabreicht. Nach Wiedererwachen der Tiere wurden diese in Einzelkäfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter bis zur Fortführung des Versuchs gehalten.

3.2.5 Endotoxämie

Zur Untersuchung der Effekte einer Endotoxämie auf die mikrovaskuläre Thrombusbildung wurde eine intraperitoneale Injektion von LPS nach volatiler

Kurzarkose durchgeführt. Hierzu wurde die Bauchhaut mit Cutasept F desinfiziert, anschließend mit einer 30 G-Kanüle punktiert und nach vorsichtiger Aspiration die Substanz injiziert. Nach Wiedererwachen der Tiere wurden diese in Einzelkäfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter bis zur Fortführung des Versuchs gehalten.

3.2.6 Transfer von Knochenmarksleukozyten

Zur Unterscheidung von leukozytären und nicht-leukozytären Effekten der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 sowie der Pertussis-sensitiven G-Protein gekoppelten Signalkaskaden auf die CCL3 bedingte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das perivaskuläre Gewebe wurden im ersten Teil der Arbeit Zell-Transfer-Experimente nach Woodfin et al. [147] mit aus dem Knochenmark isolierten Leukozyten (>90% neutrophile Granulozyten) durchgeführt. Zur Gewinnung von Knochenmarksleukozyten wurden die Tiere narkotisiert und durch eine zervikale Dislokation euthanasiert. Anschließend wurden nach Hautdesinfektion in Bereich der Inzisionslinien die Röhrenknochen der unteren Extremität (Femur und Tibia) exartikuliert und von Muskelgewebe befreit. Die Enden der Knochen wurden distal und proximal abgetrennt und das übrig gebliebene Knochenfragment mehrfach vorsichtig mit gekühltem PBS gespült. Die Flüssigkeit wurde durch ein Zellsieb (70 µm Porengröße, White; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) geleitet und in einem Falcon-Röhrchen (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) aufgefangen. Im Anschluss wurde die Anzahl der Leukozyten in der Suspension mit Hilfe eines Zellzähl-Gerätes (Coulter A-C-T-Serie; Coulter Corporation, Miami, FL, USA) bestimmt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Calcein-AM, 10 µM Lösung) bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden 10^7 fluoreszenzmarkierte Zellen mittels intravenöser Schwanzveneninjektion der Empfängermaus zugeführt. Nach weiteren 30 Minuten wurde zur Induktion der Entzündung im *M. cremaster* eine intraskrotale Injektion von CCL3 durchgeführt, bevor 3 Stunden später die intravitalmikroskopischen Untersuchungen begonnen wurden.

3.2.7 Depletion von neutrophilen Granulozyten

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von neutrophilen Granulozyten auf die mikrovaskuläre Thrombusbildung untersucht. Hierzu wurde eine Depletion der neutrophilen Granulozyten in Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Um dies zu erreichen wurden blockierende, gegen das Antigen Ly-6G auf neutrophilen Granulozyten gerichtete, monoklonale Antikörper (mAb, clone 1A8; 150 µg; BD Biosciences) verwendet, welche 24 und 6 Stunden vor Induktion der Entzündungsreaktion intravenös (s.o.) mittels Schwanzveneninjektion verabreicht wurden. In der Blutabnahme nach dem Experiment wurde der Erfolg der Depletion mit der Erstellung eines Differential-Blutbildes an einem Zellzähl-Gerät (ProCyte Dx cell counter; IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) überprüft. Auf diese Weise konnten über 90% der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten in diesen Tieren eliminiert werden (siehe Tabelle 5, Kapitel V, 2.8).

3.2.8 Depletion von Thrombozyten

Um die Bedeutung von Thrombozyten für die mikrovaskuläre Thrombusbildung zu überprüfen, wurden eine Depletion dieser zellulären Blutbestandteile vorgenommen. Durch repetitive Injektionen (48, 24 und 6 Stunden vor Induktion der Entzündungsreaktion) monoklonaler, gegen GPIIb/IIIa/CD42 gerichteter Antikörper (mAb, clone Xia.B2; jeweils 50 µg; Emfret Analytics, Eibelstadt, Deutschland) in die Schwanzvene von Wildtyp-Mäusen konnte eine Elimination von über 90% der zirkulierenden Thrombozyten in diesen Tieren erreicht werden (siehe Tabelle 4, Kapitel V, 2.8).

3.2.9 Blutentnahme

Nach jedem Tier-Experiment wurde eine Blutentnahme durchgeführt. Hierfür wurde eine mediane Inzision der Haut im Bereich des Oberbauchs am anästhesierten Tier

vorgenommen und die *V. cava inferior* exponiert. Im Anschluss wurde das Gefäß mit einer 26 G-Kanüle punktiert und Blut gewonnen. Im ersten Teil der Arbeit wurde die systemische Leukozytenzahl mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Coulter A-C-T-Serie; Coulter Corporation) bestimmt, im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Differentialblutbild mittels ProCyte Dx-Zellzählgerät (IDEXX Laboratories) erstellt.

3.3 Intravitalmikroskopie (IVM)

3.3.1 *Reflected light oblique transillumination (RLOT)*-Mikroskopie

Zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Mikrozirkulation des *M. cremaster* wurde ein Olympus BX 50 Mikroskop (Olympus Mikroskopie, Hamburg, Deutschland) benutzt, welches für Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie ausgestattet ist. Als Lichtquelle diente eine Xenon Lampe (75 Watt), deren Licht zu einem annähernd monochromatischen Strahl mit einer Wellenlänge von 700 nm durch einen galvanometrischen Scanner gebündelt (Polychrome II, TILL Photonics, Gräfelfing, Deutschland) und durch einen Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Filter-Kubus mit dichroitischen Emissionsfiltern (DCLP 500 und LP515, Olympus) auf das zu untersuchende Objekt gelenkt wurde. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden durch Wasser-Immersionlinsen der Firma Olympus (60x numerische Apertur (NA), 0,9; 20x NA, 0,5; 10x NA, 0,3) angefertigt und mit einer Schwarz-Weiß (CCD)-Videokamera (Cohu 4920, Cohu, San Diego, CA, USA) und einem analogen Videorekorder (AG-7350-E, Panasonic, Tokyo, Japan) aufgenommen. Durch eine spezielle Aufnahmetechnik nach Mempel et al. [148] mit schräg gestelltem Spiegel (Reflektor) unter dem zu untersuchenden Objekt (*Reflected Light Oblique Transillumination* (RLOT)-Mikroskopie) wurde erreicht, dass ein Teil des ankommenden Lichts vom Gewebe reflektiert wird, während ein anderer Teil des Lichts durch das Objekt hindurch auf den Reflektor trifft und in einem bestimmten Winkel zur Horizontalebene zurück durch das Gewebe ins Mikroskop gelangt. Zusammen mit dem Einsatz von nah-infrarotem Licht entsteht auf diese Weise ein vergleichsweise hoher Bildkontrast, welcher beispielsweise die Darstellung von in das Gewebe transmigrierten Leukozyten ohne den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen erlaubt. Der verwendete Spiegel hat

einen Durchmesser von 11,8 mm und eine Tiefenausdehnung von 0,19 bis 0,22 mm (Freichel, Kaufbeuren, Deutschland).

3.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden an drei verschiedenen Mikroskopen angefertigt. Im ersten Teil der Arbeit wurde für die Darstellung der Endothelzellkontakte (*endothelial junctions*) ein Fluoreszenzfarbstoff-markierter, gegen das Molekül PECAM-1/CD31-gerichteter, monoklonaler Antikörper verwendet. Hierfür wurde ein Axio Scope.A1 Mikroskop mit einer Colibri 2 LED Lichtquelle (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) und einem QUAD Filterset (DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole)/FITC/Cy3/Cy5-sbx-HC Filterset; AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland) mit 20x und 40x Wasser-Immersionsoberjektiven (0,5 NA, Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland) verwendet. Für den zweiten Teil der Arbeit wurden Aufnahmen der mikrovaskulären Thrombusbildung ebenfalls am oben genannten Mikroskop angefertigt.

Mit dem Olympus BX 50 Mikroskop (siehe Kapitel IV, 3.3.1) wurden Aufnahmen von fluoreszierenden Mikrosphären zur Geschwindigkeitsbestimmung und Aufnahmen der durch phototoxische Endothelzellschädigung ausgelösten mikrovaskulären Thrombose angefertigt.

Zur pseudo-simultanen Darstellung von fluoreszenzmarkierten Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Bakterien während der mikrovaskulären Thrombusbildung wurde ein AxioTech-Vario 100 Mikroskop (Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) mit einer Colibri LED Lichtquelle (Zeiss MicroImaging GmbH) benutzt. Das Licht wurde durch ein 62 HE Filterset (Zeiss MicroImaging GmbH) mit dichroischen Filtern und Emissionsfiltern [TFT 495 + 610 (HE); TBP 527 + LP615 (HE)] auf das zu untersuchende Gewebe gelenkt. Die Mikroskopieaufnahmen wurden mit einer AxioCam Hsm Digitalkamera mit 20x und 40x Wasser-Immersionsoberjektiven (0,5 NA, Zeiss MicroImaging GmbH) angefertigt. Die so entstandenen Aufnahmen wurden mit der AxioVision 4.6 Software (Zeiss MicroImaging GmbH) prozessiert.

3.3.3 Thrombusbildung durch phototoxische Endothelzellschädigung

Zur Untersuchung der mikrovaskulären Thrombusbildung wurde ein Modell verwendet, bei welchem durch phototoxische Endothelzellschädigung eine Thrombose induziert wird (siehe Kapitel IV, 3.3.3). Hierfür wurde FITC-Dextran (150 kDa, 2,5%, 6 ml/kg Körpergewicht, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) über einen Katheter in der *A. femoralis* verabreicht. Fünf Minuten nach Injektion wurde das gewählte Gefäß (ca. 300 µm Länge) mit Licht der Wellenlänge 488 nm kontinuierlich bestrahlt und auf diese Weise eine phototoxische, durch Sauerstoffradikale vermittelte Schädigung des Gefäßendothels generiert. Die hieraus resultierende Endothelzellaktivierung führt schließlich zu einer lokalisierten Thrombusbildung im belichteten Areal. Hierbei können sowohl der Beginn der Thrombusbildung, als auch der weitere Verlauf bis zum vollständigen Gefäßverschluss visualisiert und quantitativ analysiert werden. Um die Vergleichbarkeit der Gruppen zu gewährleisten, wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensität in jedem der untersuchten Gefäße bestimmt (siehe Tabelle 3, Kapitel V, 2.8).

3.3.4 Konfokalmikroskopie

Im zweiten Teil der Arbeit wurden zur Lokalisation der CD40, CD40L/CD154 und von-Willebrand-Faktor-Moleküle im Thrombus konfokalmikroskopische Analysen durchgeführt. Hierzu wurden, nach Präparation des *M. cremaster*, durch phototoxische Stimulationen Thrombosen ausgelöst. Nach Euthanasie wurde der präparierte *M. cremaster* von Wildtyp-Mäusen in 4% Paraformaldehyd fixiert. Das Gewebe wurde anschließend mit einer 10% Ziegenserum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)-Lösung bedeckt, mit PBS gewaschen und permeabilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmoleküle: GPIIb/IIIa-Derivat zur Identifikation von Thrombozyten (X-649; DyLight 488; Emfret Analytics) und Ly6G/C zur Visualisierung von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten (GR-1; Alexa Fluor 647; Invitrogen,

Material und Methoden

Carlsbad, CA, USA). Antikörper gegen CD40 (rat anti-mouse; eBiosciences, San Diego, CA, USA), CD40L/CD154 (rat anti-mouse; BD Bioscience) oder vWF (rabbit polyclonal; abcam, Cambridge, UK) wurden verwendet, um die Lokalisation der jeweiligen Moleküle zu untersuchen. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte für 12 Stunden bei 4°C und im Anschluss wurde das Gewebe 3 Stunden bei Raumtemperatur mit einem Alexa Fluor 546 *goat anti-rat* oder einem Alexa Fluor *goat anti-rabbit* Antikörper für 3 Stunden inkubiert. Vor der Mikroskopie wurde die Gewebeprobe in PermaFluor (Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA) auf einem Objektträger mit Deckglas eingebettet. Konfokale Bilder von ca. 30 µm Dicke (Schichtdicke pro Aufnahme: 1,0 µm) wurden mit einem Leica SP5 *Laser-scanning* Konfokalmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) mit Öl-Immersionsobjektiven (40x, NA 1,40; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) angefertigt.

3.3.5 Quantifizierung hämodynamischer Parameter und der Leukozytenmigration

Zur Analyse der intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurde die Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) und die Cap-Image Software (Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Als intravaskulär rollende Leukozyten wurden die Zellen gewertet, welche sich langsamer als der sie umgebende Blutstrom entlang der Endothelzellen bewegten. Dabei wurde die Anzahl der rollenden Leukozyten während einer 30 sekündigen Aufnahme quantifiziert, welche in diesem Zeitraum eine quer durch das Gefäß gelegte Linie überschritten hatten. Als intravaskulär adhärente Leukozyten wurden die Zellen bestimmt, welche für mehr als 30 Sekunden innerhalb des ausgewerteten Bereichs (Gefäßabschnitt auf 100 µm Länge) statisch an der luminalen Endothelzelloberfläche befindlich waren. Zur Auswertung der in das perivaskuläre Gewebe transmigrierten Leukozyten wurde ein rechteckiger Bereich von jeweils 100 x 75 µm auf beiden Seiten des betrachteten Gefäßabschnitts begutachtet und darin befindliche, extravaskuläre Leukozyten gezählt.

Material und Methoden

Um die Blutfließgeschwindigkeiten in den untersuchten Gefäßabschnitten zu bestimmen, wurden fluoreszierende Mikrosphären (0,96 μm Durchmesser; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) über den Katheter in der *A. femoralis* injiziert und anschließend unter stroboskopischer Beleuchtung die Distanz zwischen zeitlich aufeinanderfolgenden Aufnahmen einer individuellen Mikrosphäre gemessen. So konnten mehrere Mikrosphären in einem bestimmten Gefäßabschnitt ausgewertet und der Mittelwert der Blutfließgeschwindigkeiten (nach der Formel: $V_{\text{mean}} = 0,625 V_{\text{centerline}}$; $V_{\text{centerline}}$ ist die gemessene Geschwindigkeit einer frei fließenden Mikrosphäre in der Mitte des Gefäßes) berechnet werden (siehe Tabelle 2, Kapitel V, 1.9 und Tabelle 3, Kapitel V, 2.8). Über die Messung der Blutfließgeschwindigkeit und die ausgemessenen Gefäßdurchmesser konnten die vorherrschenden Schergeschwindigkeiten, unter Annahme eines parabolischen Flussprofils über den Gefäßquerschnitt berechnet werden (nach der Formel: Scherrate (γ_w) = $4,9 (8 V_{\text{mean}} / d)$, wobei der Gefäßdurchmesser d in μm und die Geschwindigkeit V_{mean} in $\mu\text{m s}^{-1}$ angegeben werden [149]).

3.3.6 Quantifizierung der Rekrutierung von Fluoreszenz-markierten Leukozyten

Um leukozytäre Effekte von Chemokinrezeptorinteraktionen und Signaltransduktionswegen von nicht-leukozytären Effekten auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das perivaskuläre Gewebe unterscheiden zu können, wurde im ersten Teil der Arbeit ein Zelltransfer durchgeführt (siehe Kapitel IV, 3.2.6 Transfer von Knochenmarkleukozyten). Die aus dem Knochenmark gewonnenen Leukozyten (über 90% neutrophile Granulozyten), welche mit Calcein-AM angefärbt wurden, wurden drei Stunden nach Applikation eines entzündlichen Stimulus in 175 Gesichtsfeldern (Hauptgesichtsfeld, *high power field*, HPF) fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt. Dies entspricht der vollständigen Fläche eines nach chirurgischer Präparation aufgespannten *M. cremasters* der Maus. Auf diese Weise konnte die Anzahl der adhären und transmigrierten Calcein-gefärbten Zellen pro Hauptgesichtsfeld bestimmt werden.

3.3.7 Visualisierung der Leukozytentransmigrationswege

Zur Visualisierung der Transmigrationsroute von extravasierenden Leukozyten wurde eine Färbung der Endothelzellkontakte mittels Fluoreszenz-markierter, monoklonaler, nicht-blockierender, gegen PECAM-1/CD31 gerichteter Antikörper vorgenommen. So konnten die endothelialen Kontakte in postkapillären Venolen des *M. cremaster* fluoreszenzmikroskopisch dargestellt und die Lokalisation der adhärenen Leukozyten in Bezug auf diese Strukturen analysiert werden. Auf diese Weise konnten Rückschlüsse auf die Transmigrationsroute (parazellulär vs. transzellulär) gezogen werden.

3.3.8 Quantifizierung der mikrovaskulären Thrombusbildung

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die mikrovaskuläre Thrombusbildung nach phototoxischer Endothelzellaktivierung fluoreszenzmikroskopisch visualisiert und analysiert. Die Zeit bis zum Beginn der Thrombusbildung (Beginn) wurde als Zeitspanne nach Beginn der kontinuierlichen Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 488 nm bis zum ersten Auftreten adhärenter Thrombusanteile an der endothelialen Oberfläche definiert. Die Zeit bis zum Gefäßverschluss (Verschluss) wurde definiert als Zeitspanne nach Beginn der kontinuierlichen Bestrahlung bis zum kompletten Verschluss des entsprechenden Gefäßabschnitts mit ausbleibendem Blutfluss für über 60 Sekunden. Als Grenzwert für die Dauer der Messungen bis zum vollständigen Gefäßverschluss wurde 1500 Sekunden für Venolen und 2700 Sekunden für Arteriolen definiert.

3.3.9 Quantifizierung der Disposition von fluoreszierenden Mikrosphären und *Escherichia coli* (*E. coli*) in mikrovaskulären Thromben

Um den physiologischen Nutzen der mikrovaskulären Thrombusbildung unter entzündlichen Bedingungen zu analysieren, wurde die mikrovaskuläre

Thrombusbildung nach dem oben genannten Protokoll durchgeführt und kurz vor Beginn der Thrombose eine Injektion von fluoreszierenden Mikrosphären oder gefärbten *E. coli*-Bakterien (K12 Stamm, mit Hoechst 1:500 gefärbt, Injektion von 10^9 Bakterien) vorgenommen. Die Anzahl der Mikrosphären in den entstehenden Thromben bzw. die Fläche der mit Bakterien durchsetzten Thrombusanteile wurden quantifiziert.

4 *Ex-vivo*- und *In-vitro*-Experimente

4.1 Immunhistochemische Färbungen

Zur Phänotypisierung der in das perivaskuläre Gewebe transmigrierten Leukozyten wurden immunhistochemische Färbungen an Gewebsschnitten des *M. cremaster* angefertigt. Nach Stimulation des *M. cremaster* mit CCL3 oder LPS wurde dieser nach drei Stunden oder respektive sechs Stunden entnommen, in 4% Paraformaldehyd (pH 7,4) fixiert und anschließend in Paraffin gebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms (Reichert-Jung Biocut 2030, Leica-Microsystems, Wetzlar, Deutschland) wurden ca. 6 μm dicke Gewebeschnitte angefertigt, welche mit monoklonalen gegen Ly-6G (BD Biosciences) zur Anfärbung von neutrophilen Granulozyten, CD45 (BD Biosciences) zur Anfärbung aller Leukozyten oder F4/80 (Serotec, Oxford, UK) zur Anfärbung von Monozyten und Makrophagen gerichteten IgG Antikörpern inkubiert wurden. Ein Immunhistochemie Kit (Super Sensitive Link-Label ICH detection system, BioGenex, San Ramon, CA, USA) wurde verwendet, um die durch die Antikörper markierten Zellen zu visualisieren. Eine Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun zum Färben von Zell- und Gewebestrukturen (wie beispielsweise Zellkerne, Mitochondrien, Myelin und Kollagen und Elastin) wurde durchgeführt und die so erhaltenen Schnitte bei 400x Vergrößerung lichtmikroskopisch ausgewertet. Auf diese Weise konnten in das Gewebe transmigrierte Ly-6G-, CD45-, und F4/80-positive Zellen quantifiziert werden. Insgesamt wurden pro Versuchstier 60 Hauptgesichtsfelder (HPF) bei vier Versuchstieren pro Gruppe ausgewertet.

4.2 *In-vitro*-Fluidik-Experimente

4.2.1 Konstruktion der Mikrofluidikchips

Mikrofluidikchips wurden aus Silikonelastomeren (PDMS Silygard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA) hergestellt und gegossen. Die Maske zum Gießen der Chips wurde durch Photolithographie (Übertragung einer Fotomaske auf einen lichtempfindlichen Fotolack) auf einem Siliziumwafer (Grundplatte für die Fluidikchips) hergestellt und besteht aus 2 übereinandergelegten Formen des Fotolacks (SU-8 photoresist, MicroChem Corp., Westborough, MA, USA). Um ein Negativ des später gegossenen 40 μm Kanals mit 8 μm durchmessenden fokalen Erhebungen (welche im Folgenden „*bump structures*“ genannt werden und den Maßen von intravaskulär adhären Leukozyten entsprechen) anzufertigen, wurde eine 32 μm durchmessende obere Schicht des Kanals mit einer 8 μm durchmessenden unteren Schicht mit ausgestanzten, 8 μm durchmessenden Löchern übereinandergelegt. Auf diese Weise konnten die Kanäle der Fluidik hergestellt werden. Folgende Kanalstrukturen wurden gebaut: 4 verschiedene Kanäle mit unterschiedlichen *bump structure* Dichten (0, 10, 25 und 50 *bump structures* pro $10^4 \mu\text{m}^2$), welche parallel geschaltet, vom gleichen Zulauf gespeist und in den gleichen Ablauf drainiert wurden. Die Anordnung der *bump structures* in den Kanälen wurde durch einen MATLAB-Zufallsgenerator (Software zur Berechnung, MathWorks, Naticks, Massachusetts, USA) bestimmt. Zwischen den Kanälen und dem Ablauf wurde ein hydrodynamischer Widerstand in Form einer Serpentinstruktur eingebaut, um die Flussrate auf physiologische Bedingungen einstellen zu können. Zur Anfertigung der Kanäle wurde Polydimethylsiloxan (PDMS, ein Polymer auf Siliziumbasis) hergestellt, auf den Siliziumwafer gegossen und für eine Stunde bei 80°C ausgehärtet. Das polymerisierte PDMS wurde im Anschluss vorsichtig vom Siliziumwafer gelöst und Einlass und Auslass wurden gestanzt. Danach wurde der Chip gesäubert, für 30 Sekunden mit Sauerstoffplasma in Kontakt gebracht (Diener electronics GmbH+Co. KG, Ebenhausen, Deutschland) und irreversibel auf einem Objektträger befestigt.

4.2.2 Fluoreszenzmikroskopie der Mikrofluidikchips

Experimente in der Mikrofluidik wurden fluoreszenzmikroskopisch an einem Nikon Ti-E Inversmikroskop (Nikon, Tokio, Japan) mit durch NIS-Elements (Softwarepaket von Nikon zur Navigation der Plattform) gesteuerter Plattform durchgeführt. Dabei wurden fünf Positionen mit einer insgesamt $40 \times 830 \mu\text{m}$ messenden Oberfläche in jedem Kanal minütlich aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit einem CFI P-Apo DM 100x Objektiv und einer Kamera (SCMOS *low-light* Kamera für hohe Aufnahmegeschwindigkeit und hohe Auflösung, Zyla-5.5, Andor, Belfast, Nordirland) angefertigt. Thrombozyten wurden mit einem anti-GPIIb β Derivat (X-649; Emfret Analytics, Deutschland) fluoreszenzmarkiert. Durch die festen Blutbestandteile im Vollblut wurde der Lichtstrahl des Mikroskops derart abgeschwächt, dass keine ausreichend scharfen Videoaufnahmen der *bump structures* und der Anlagerungen von Thrombozyten an diese möglich waren. Daher wurde für die mikroskopischen Videoaufnahmen Vollblut im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Auf diese Weise konnten detaillierte Videoaufzeichnungen der Interaktionen von Thrombozyten mit *bump structures* angefertigt werden. Zusätzlich wurden Experimente mit unverdünntem Vollblut ohne Echtzeit-Visualisierung durchgeführt. Nach zehn Minuten Durchfluss wurde die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten auf einer Fläche von $40 \times 830 \mu\text{m}$ pro Kanal quantifiziert und so Daten zur Bedeutung der Dichte von *bump-structures* für die Anlagerung von Thrombozyten erhoben.

4.2.3 Simulation der Fluidodynamik

Um zu verstehen, warum sich Thrombozyten an geometrischen *bump structures* in den Kanälen der Mikrofluidik anlagern (siehe Kapitel V, 2.4), haben wir eine Fluiddynamiksimulation benutzt. Die Simulation beschreibt annähernd den Fluss von einer Flüssigkeit (z. B. Blut) als auch der darin enthaltenen Teilchen (z. B. Thrombozyten) in einem Kanal mit $40 \mu\text{m}$ Durchmesser bei physiologischen Flussbedingungen (mit einer Schergeschwindigkeit von 1500 s^{-1}). In der Literatur finden sich Arbeiten, welche den Einfluss von Wandeffekten [150], Brown'scher Molekularbewegung [151], Elastizität [152], biochemischen Reaktionen [153] sowie

Material und Methoden

roter Blutkörperchen im Vollblut [154] auf Thrombozyten untersucht haben. Ein dominierender Effekt in diesen Studien ist eine von der Hydrodynamik induzierte Drehbewegung der Thrombozyten. Aufgrund hoher Scherkräfte wird eine Drehbewegung der Thrombozyten ausgelöst, wodurch sich diese untereinander annähern und auch in die Nähe des Endothels geraten.

Auf Grund dieser Beobachtungen postulierten wir, dass die Drehbewegung eines Thrombozyten diesen in die Nähe der *bump structures* bringt. Um die Simulation zu vereinfachen, haben wir uns auf theoretische Physik fokussiert, welche die Drehbewegung korrekt beschreibt. Andere Einflüsse, wie die oben genannte Braun'sche Molekularbewegung, Elastizität, Wechselwirkungen durch andere Blutkörperchen oder Wandeffekte, wurden vernachlässigt. Des Weiteren haben wir die Simulation der Dynamik auf einen longitudinalen Schnitt durch den Kanal (2D, 160 x 40 μm) begrenzt. Die Bewegung der Flüssigkeit und des Thrombozyten durch den Kanal haben wir mit einem Finite Elemente Simulationsprogramm (COSMOL Multiphysics, Stockholm, Schweden) simuliert.

Auf Grund der niedrigen Reynolds Zahl (eine dimensionslose Kennzahl, welche das Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskräften beschreibt) in der Mikrozirkulation wurde laminarer Fluss angenommen [155]. Erst bei deutlich höheren als in der Mikrozirkulation auftretenden Reynolds Zahlen kommt es zu turbulenten Strömungen. Diese sind in der Mikrozirkulation nicht vorzufinden. Der simulierte Thrombozyt wurde als inelastisches, diskoides Objekt ohne Einfluss auf den umliegenden Flüssigkeitsstrom (aufgrund der geringen Größe des Objekts) betrachtet. Auf diese Weise konnte zuerst der Flüssigkeitsstrom und anschließend die Verschiebe- und Rotationsbewegung des Thrombozyten berechnet werden. Bei der Berechnung der Verschiebebewegung des Thrombozyten wirkt bei niedriger Reynolds Zahl eine Zugkraft auf den Thrombozyten. Die Geschwindigkeit des Blutflusses wurde im Massenmittelpunkt des Thrombozyten angenommen. Eine Rotationsbewegung, die durch das Geschwindigkeitsprofil der Flüssigkeit im Kanal und den daraus entstehenden Scherkräften auf den Thrombozyten ausgelöst wird, wurde in unserem Computermodell durch Hinzufügen einer Rotationsgeschwindigkeit simuliert. Sowohl die Verschiebe- als auch die Rotationsbewegung ändern in dieser Annäherung den Fluss in der Fluidik nicht und wurden mittels MATLAB-Software (Mathworks) berechnet.

4.3 Systemische Leukozytenzahlen, Thrombozytenzahlen, Differentialblutbild

In den Untersuchungen zur Chemokin-vermittelten Entzündungsreaktion wurden die systemische Leukozytenzahl (siehe Tabelle 2, Kapitel V, 1.9) und in den Zelltransfer-Experimenten mit Knochenmarksleukozyten die Anzahl der injizierten Knochenmarksleukozyten in der Spenderlösung mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Coulter AC-T-Serie; Coulter Corporation) gemessen.

In den Untersuchungen zur mikrovaskulären Thrombusbildung in entzündetem Gewebe wurden Differentialblutbilder mittels ProCyte Dx cell counter (IDEXX Laboratories) erstellt. Die systemischen Leukozytenzahlen und Thrombozytenzahlen der einzelnen Gruppen sind in Tabelle 3, Kapitel V, 2.8 in den Ergebnissen dargestellt. Nach Plättchendepletion wurden die Thrombozyten gemessen und somit der Erfolg der Intervention überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4, Kapitel V, 2.8 dargestellt. Nach Depletion der neutrophilen Granulozyten wurde der Erfolg der Intervention durch Anfertigung eines Differentialblutbilds kontrolliert (siehe Tabelle 5, Kapitel V, 2.8).

4.4 Verwendete Reagenzien

Folgende Reagenzien wurden in den Untersuchungen zur Chemokin-vermittelten Entzündungsreaktion verwendet:

Rekombinantes murines CCL3 oder CXCL1 (je 300 ng in 400 μ l PBS, R&D Systems; Wiesbaden, Deutschland) oder PAF (400 μ l einer 10^{-6} molaren Lösung; Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) wurde zur Induktion einer Entzündungsreaktion intraskrotal (i.s.) injiziert. Pertussistoxin (PTx, 4 μ g in 150 μ l PBS; Sigma Aldrich) wurde intraarteriell (i.a.) verabreicht, um G-Protein gekoppelte Signalwege zu blockieren. Zur Inhibierung von PI3-Kinasen wurde Wortmannin (irreversibler pan-PI3K-Inhibitor, 1 mg/kg Körpergewicht i.a., blockiert alle Isoformen der PI3-Kinase; Sigma Aldrich), PI103 (reversibler pan-PI3K-Inhibitor, 3 mal 5 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal (i.p.), blockiert alle Isoformen der PI3-Kinase), AS605240 (selektiver, reversibler Inhibitor der PI3K γ ; dreimal 5 mg/kg Körpergewicht i.p.) oder IC87114 (selektiver, reversibler PI3K δ -Inhibitor, 3 mal 5 mg/kg Körpergewicht i.p.) verwendet. Blockierende, monoklonale Antikörper gegen LFA-1/CD11a (clone M17/4), Mac-

Material und Methoden

1/CD11b (clone M1/70), VLA-4/CD49d und Integrin $\alpha 4\beta 7$ (clone R1-2 und clone PS/2), PECAM-1/CD31 (clone MEC 13.3), ICAM-1/CD54 (clone YN1), ICAM-2/CD102 (clone 3C4) und VCAM-1/CD106 (clone 429) wurden intraarteriell injiziert, um die jeweiligen Molekülinteraktionen zu blockieren (jeweils 50 μ l der Antikörperlösung in 150 μ l PBS; BioLegend, San Diego, CA, USA). Ein nicht-blockierender anti-PECAM-1/CD31 Antikörper (clone 390, 50 μ l der Antikörperlösung in 150 μ l PBS; BioLegend) wurde als zusätzliche Kontrolle verwendet. Für die Darstellung der Endothelzellkontakte wurde ein nicht-blockierender Alexa Fluor 488 konjugierter monoklonaler Antikörper gegen PECAM-1/CD31 in die Superfusionslösung gegeben (clone 390, 40 μ l/ml; BioLegend, San Diego, CA, USA).

In den Untersuchungen zur mikrovaskulären Thrombusbildung wurden folgende Reagenzien verwendet:

10 ng LPS (gewonnen aus *Escherichia coli* O111:B4; Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) wurden intraskrotal zur Induktion einer lokalisierten, ausgeprägten Entzündungsreaktion verabreicht oder 1 mg intraperitoneal zur Erzeugung einer Endotoxämie injiziert. Die Inhibierung der plasmatischen Gerinnung wurde durch Heparin (500 I.E. pro Maus i.a., zehn Minuten vor Induktion einer Thrombose; Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) erreicht. Monoklonale Antikörper gegen GPIIb/CD42b (clone Xia.B2, 50 μ g i.v., 48, 24, und 6 Stunden vor Auslösung einer mikrovaskulären Thrombose; Emfret Analytics) wurden für die Depletion der Thrombozyten verwendet (siehe Kapitel IV, 3.2.8). Monoklonale Antikörper gegen Ly-6G (clone 1A8; 150 μ g i.v., 24 und 6 Stunden vor Induktion einer Entzündungsreaktion; BD Biosciences) wurden für die Depletion von neutrophilen Granulozyten verwendet (siehe Kapitel IV, 3.2.7). Blockierende GPIIb Fab' Fragmente (clone Xia.B2; 2.5 mg/kg, p0p/B, i.a., zehn Minuten vor Induktion einer Thrombose; Emfret Analytics), ein nicht-Peptid Inhibitor von GPIIb/IIIa (GR144053 Trihydrochlorid, 10 mg/kg i.a., 10 Minuten vor Auslösung einer mikrovaskulären Thrombose; R&D Systems, Lille, Frankreich), polyklonale Antikörper gegen vWF (100 μ g in 100 μ l PBS i.a.; 10 Minuten vor Auslösung einer mikrovaskulären Thrombose; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland), monoklonale Antikörper gegen CD40 (clone 1C10; 50 μ g in 100 μ l PBS i. a.; 10 Minuten vor Auslösung einer mikrovaskulären Thrombose; eBiosciences), CD40L/CD154, P-Selektin/CD62P (clone RB40.34; 50 μ g in 100 μ l PBS i.a.; 10 Minuten vor Induktion einer mikrovaskulären Thrombose; BD Bioscience),

Material und Methoden

Mac-1/CD11b (clone M1/70; 50 µg in 150 µl PBS; BioLegend) wurden zur Blockade der entsprechenden Moleküle auf Thrombozyten und ihren Interaktionspartnern verabreicht. DNase I (RNase frei, 100 Einheiten pro Maus nach von Bruhl et al. und nach Fuchs et al. [34, 35] und in einer höheren Dosierung von 1000 Einheiten pro Maus nach Yipp et al. [42]; i.a.; 4 Stunden und nochmals 10 Minuten vor Induktion einer mikrovaskulären Thrombose; Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Neutrophile Granulozyten wurden mittels monoklonaler, fluoreszenzmarkierter Ly6-G Antikörper (clone 1A8; PE-gefärbt, 5 µg in 100 µl PBS i. a.; BD Biosciences oder clone AP-MAB0866, DyLight 550-gefärbt, 10 µg in 100 µl PBS i.a.; Novus Biologicals, Biotech, Littleton, CO, USA) angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch während der Thrombusbildung *In-vivo* visualisiert. Thrombozyten wurden für *In-vivo* und *In-vitro* Experimente in der Mikrofluidik mit einem GPIIb/IIIa Derivat (X-649; DyLight 649-gefärbt; 5 µg in 100 µl PBS i.a.; emfret Analytics) angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch dargestellt.

5 Versuchsprotokolle

Zur Übersicht über die Versuchsdurchführungen dienen die Ablaufdiagramme, welche im Kapitel IV, 5.1 bis 5.7 in den Abbildungen 7 bis 12 dargestellt werden.

5.1 Leukozytenrekretierung nach Stimulation mit CCL3, CXCL1 oder PAF

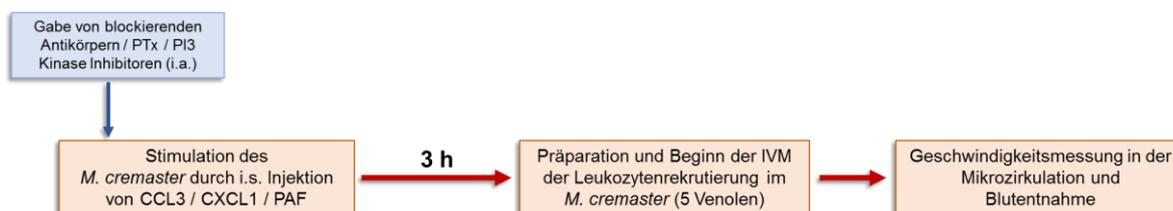


Abbildung 7: Versuchsaufbau zur Analyse der Leukozytenrekretierung im *M. cremaster* nach Stimulation mit CCL3, CXCL1 oder PAF.

Die Leukozytenrekretierung im *M. cremaster* der Maus wurde nach intraskrotaler Stimulation mit CCL3, CXCL1 oder PAF im Vergleich zu Kontrollexperimenten

Material und Methoden

(intraskrotale Injektion von PBS) nach 3 Stunden intravitalmikroskopisch untersucht. Kurz vor Stimulation wurden blockierende Antikörper, Pertussistoxin oder PI3-Kinase-Inhibitoren intraarteriell verabreicht, um deren Effekte auf die Leukozytenrekrutierung zu analysieren. Nach erfolgter Intravitalmikroskopie (IVM) an 5 Venolen wurde die Geschwindigkeitsmessung in den untersuchten Gefäßen und anschließend die Blutentnahme aus der *V. cava inferior* durchgeführt.

5.2 Rekrutierung von Knochenmarksleukozyten in Zell-Transfer-Experimenten

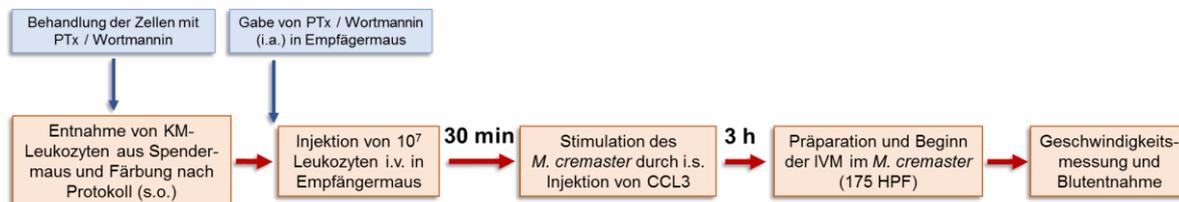


Abbildung 8: Versuchsaufbau zur Analyse der Rekrutierung von Knochenmarkstransferleukozyten im *M. cremaster* nach Stimulation mit CCL3.

Die Rekrutierung von aus einer Spendermaus gewonnenen Knochenmarksleukozyten im Organismus der Empfängermaus wurde nach 30 Minuten Zirkulationszeit und weiteren 3 Stunden Stimulationszeit mit CCL3 *intraskrotal* fluoreszenzmikroskopisch in 175 Hauptgesichtsfeldern (HPF) pro *M. cremaster* untersucht. Dabei wurden *Ccr1*^{-/-}, *Ccr5*^{-/-} und Wildtyp (WT) Knochenmarksleukozyten in *Ccr1*^{-/-}, *Ccr5*^{-/-} und Wildtyp-Empfängermäuse gegeben. In einem weiteren Versuchsansatz wurden mit Pertussistoxin oder Wortmannin vorbehandelte Zellen in Wildtyp-Empfängermäuse und Wildtyp-Knochenmarksleukozyten in Pertussistoxin oder Wortmannin vorbehandelte Empfängertiere injiziert und die Rekrutierung dieser Knochenmarksleukozyten untersucht. So konnten Rückschlüsse auf die Bedeutung leukozytärer und nicht-leukozytärer Rezeptoren und Signalmoleküle für die Leukozytenrekrutierung gezogen werden

5.3 Analyse der Leukozytentransmigrationswege

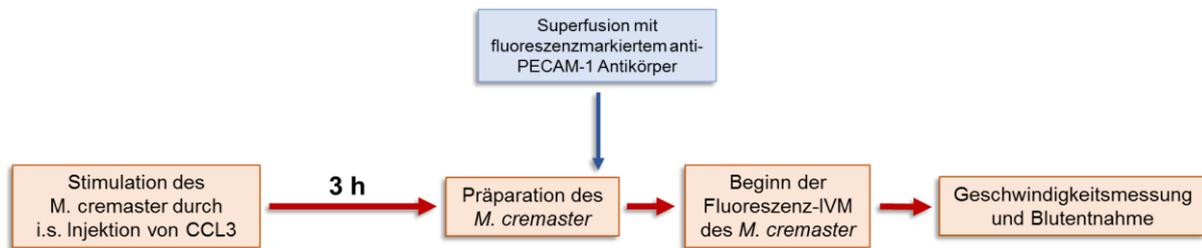


Abbildung 9: Versuchsaufbau zur Analyse Transmigrationsroute von Leukozyten im *M. cremaster* nach Stimulation mit CCL3.

Um die Leukozytentransmigrationswege zu identifizieren, wurden die Endothelzellkontakte durch einen nicht-blockierenden, fluoreszenzmarkierten und gegen PECAM-1/CD31-gerichteten Antikörper visualisiert und die Lokalisation der adhärennten Leukozyten 3 Stunden nach Stimulation mit CCL3 in Relation zu den Endothelzellkontakten ausgewertet. Mit dieser Technik ergaben sich Hinweise auf die Art der Transmigration (parazellulär vs. transzellulär).

5.4 Quantifizierung der mikrovaskulären Thrombusbildung

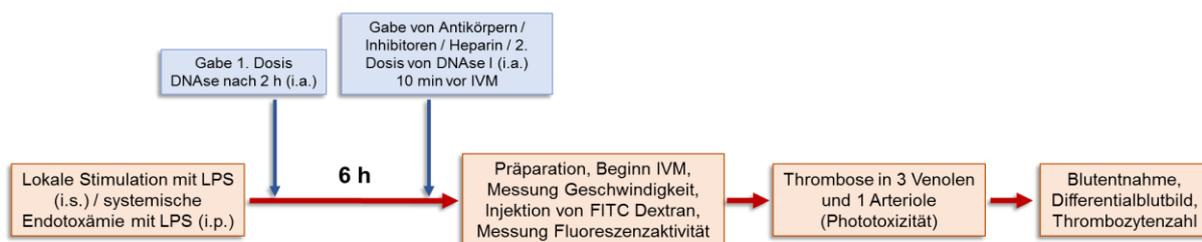


Abbildung 10: Versuchsaufbau zur Visualisierung und Quantifizierung der mikrovaskulären Thrombusbildung im *M. cremaster* nach lokaler (i.s.) oder systemischer (i.p.) Stimulation mit LPS.

Um die Dynamik der mikrovaskulären Thrombusbildung im entzündeten Gewebe zu untersuchen, wurde eine lokale Stimulation des *M. cremaster* von Wildtyp-Mäusen mittels intraskrotaler Injektion von LPS, eine systemische Endotoxämie in Wildtyp-

Material und Methoden

Mäusen mittels intraperitonealer Injektion von LPS und die jeweiligen Kontrollexperimente mit PBS intraskrotal und PBS intraperitoneal durchgeführt. Nach 6 Stunden Stimulationszeit wurde die Präparation und Intravitalmikroskopie begonnen. Die mikrovaskuläre Thrombusbildung wurde durch eine phototoxische Schädigung des Gefäßendothels ausgelöst und fluoreszenzmikroskopisch visualisiert. Die Zeiten bis zum Beginn der Thrombusbildung (Beginn) und bis zum kompletten Gefäßverschluss (Verschluss) wurden dabei gemessen. Die Rolle von thrombozytären und nicht-thrombozytären Oberflächenmolekülen wurde durch die Verabreichung geeigneter blockierender Antikörper, welche gegen diese Moleküle gerichtet waren, 10 Minuten vor der Induktion der mikrovaskulären Thrombose analysiert. Die Bedeutung von neutrophilen Netzstrukturen aus DNA und Histonen (NETs) wurde durch die Injektion von DNase I und durch Experimente mit Heparin überprüft. Eine Vollantikoagulation zur Inhibierung der plasmatischen Gerinnung wurde mit Heparin durchgeführt. Zudem wurden Experimente mit Thrombozyten- und Neutrophilen-depletierten Tieren durchgeführt, um die Funktion dieser Zellen bei der mikrovaskulären Thrombusbildung zu analysieren. In ausgewählten Experimenten wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper verabreicht, welche gegen spezifisch exprimierte Oberflächenantigene auf Thrombozyten oder neutrophilen Granulozyten gerichtet sind und diese Zellen *In-vivo* anfärben. Auf diese Weise können Interaktionen zwischen den Zellen während der mikrovaskulären Thrombose differenziell dargestellt und untersucht werden.

5.5 Leukozytenrekrutierung nach lokaler Stimulation mit LPS

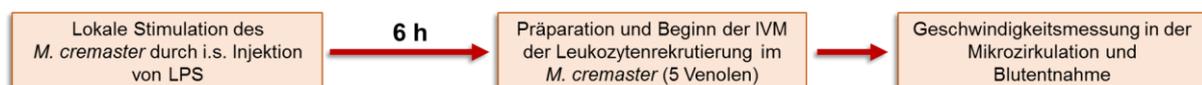


Abbildung 11: Versuchsaufbau zur Analyse der Leukozytenrekrutierung im *M. cremaster* nach Stimulation mit LPS.

Zur Untersuchung der Leukozytenrekrutierung im *M. cremaster* der Maus nach intraskrotaler (lokaler) Stimulation mit LPS und im Vergleich zur Leukozytenrekrutierung bei Endotoxämie nach intraperitonealer LPS-Stimulation

wurde 6 Stunden nach der Injektion der inflammatorischen Mediatoren jeweils die Anzahl der intravaskulär adhärenen und in das Gewebe transmigrierten Leukozyten (in 5 Venolen pro Tier) ausgewertet. Anschließend wurde eine Geschwindigkeitsmessung (s.o.) vorgenommen und nach Abschluss der Intravitalmikroskopie erfolgte die Blutentnahme zur Messung der Thrombozytenzahlen und Erstellung eines Differentialblutbilds.

5.6 Visualisierung und Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion in der Mikrofluidik

Zur Untersuchung rheologischer Effekte in der Mikrozirkulation während der Thrombusbildung wurden Versuche in Mikrofluidik-Chips (Herstellung und Material siehe Kapitel IV, 4.2.1) durchgeführt. Hierfür wurde mit Heparin antikoaguliertes, murines Vollblut verwendet. Zudem wurden die Blutplättchen mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper angefärbt. Das Blut wurde für 10 Minuten bei zu den *In-vivo*-Experimenten vergleichbaren Schergeschwindigkeiten durch die Mikrofluidikkanäle geleitet. Die Geschwindigkeit wurde mittels fluoreszierender Mikrosphären gemessen und konnte durch Änderung des hydrostatischen Drucks angepasst werden. Nach 10 Minuten Durchflusszeit wurde die Anzahl der in den Kanälen adhärenen, fluoreszierenden Thrombozyten ausgewertet. Hierzu wurde pro Kanal eine Oberfläche von 40 x 830 μm hinsichtlich der adhärenen Thrombozyten begutachtet. In Folgeexperimenten wurde der Thrombozytenrezeptor GPIIb/IIIa durch gegen das Molekül gerichtete Fab' Fragmente inhibiert und die Thrombozytenadhärenz 10 Minuten später quantitativ analysiert.

Weitere Experimente mit 1:10 verdünntem Vollblut und fluoreszierenden Thrombozyten wurden durchgeführt, um die Thrombozytenadhärenz in den einzelnen Kanälen im Detail in Echtzeit darstellen zu können. Die Verdünnung war dabei notwendig, um eine Extinktion des Fluoreszenzlichtes (hauptsächlich durch Erythrozyten) zu verhindern und dadurch eine verbesserte Bildauflösung zu erreichen.

5.7 Einfangen von *E. coli*-Bakterien und Mikrosphären durch die mikrovaskuläre Thrombusbildung

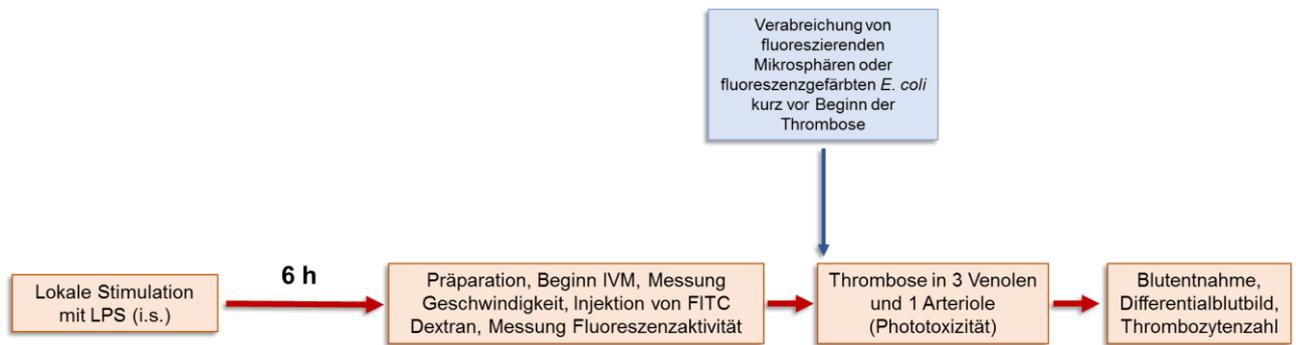


Abbildung 12: Versuchsaufbau zur Analyse der Leukozytenrekrutierung im *M. cremaster* nach Stimulation mit LPS.

Zur Untersuchung des Einflusses der mikrovaskulären Thrombusbildung in entzündetem Gewebe auf die systemische Streuung von Pathogenen wurde untersucht, inwieweit ein entstehender Thrombus in der Lage ist, zirkulierende Bakterien „einzufangen“ und somit eine fortschreitende Dissemination von Pathogenen zu verhindern. In einem ersten Ansatz wurde das Einfangen von fluoreszierenden Mikrosphären untersucht, welche kurz vor Beginn der mikrovaskulären Thrombusbildung intraarteriell injiziert wurden. Unterschiede zwischen *a priori* entzündeten Gefäßen und entsprechenden Kontrollgefäßen wurden hierbei untersucht. In einer weiteren Versuchsreihe wurden statt der Mikrosphären *E. coli*-Bakterien injiziert, welche mit dem DNA-Farbstoff Hoechst gefärbt waren, und deren Deposition im mikrovaskulären Thrombus analysiert.

6 Statistische Versuchsauswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen wurde mit dem Software Paket SigmaStat (SigmaStat für Windows, Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Der „t-Test“ (Vergleich von 2 Versuchsgruppen) oder „One-way ANOVA Test“ (Vergleich von mehr als 2 Versuchsgruppen) mit anschließendem „Dunnett Test“ (mehr als 2 Versuchsgruppen, Signifikanzrechnung

Material und Methoden

gegen Kontrollgruppe) oder „Student-Newman-Keuls Methode“ (mehr als 2 Versuchsgruppen, Vergleich aller Gruppen untereinander) wurden verwendet um statistisch signifikante Unterschiede der Ergebnisse zu überprüfen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (*mean*) mit dem Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of mean*, SEM) angegeben. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Ergebnisse

V Ergebnisse

1 Mechanismen der CC-Chemokin-induzierten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten

1.1 Bedeutung der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 für die CCL3-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten

Die Bedeutung der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 für das intravaskuläre Rollen, die intravaskuläre Adhärenz und die Transmigration von Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe wurde mit Hilfe der *In-vivo*-Mikroskopie am *M. cremaster* von Wildtyp-Mäusen sowie von *Ccr1*^{-/-}- und *Ccr5*^{-/-}-Knockout-Mäusen untersucht (Abbildung 13).

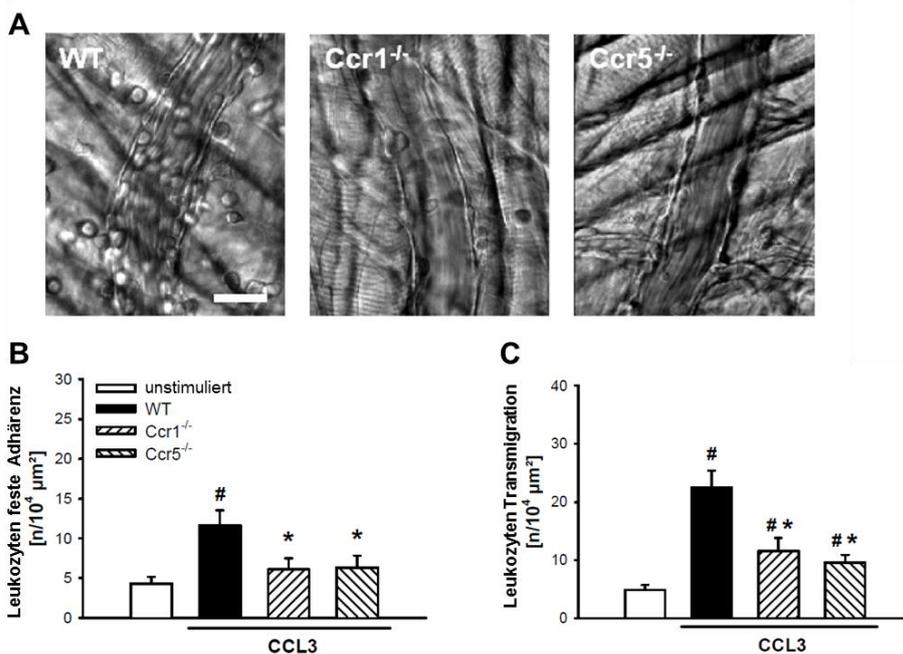


Abbildung 13: Die Bedeutung der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 für die CCL3-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten. *In-vivo*-Mikroskopieaufnahmen in WT, *Ccr1*^{-/-} und *Ccr5*^{-/-}-Knockout-Mäusen nach intraskrotaler Stimulation mit CCL3 (A, Messbalken 20 µm). Die Anzahl der adhärennten und transmigrierten Leukozyten nach Stimulation mit CCL3 in WT, *Ccr1*^{-/-} und *Ccr5*^{-/-}-Tieren im Vergleich zur PBS-behandelten Kontrollgruppe ist gezeigt (B, C, Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts für 6 Tiere pro Gruppe, # p<0,05 vs. Kontrollgruppe (unstimuliert), * p<0,05 vs. WT).

Die chirurgische Präparation des Gewebes verursachte in postkapillären Venolen ein geringgradiges, intravaskuläres Rollen von Leukozyten am Gefäßendothel. In Bezug

Ergebnisse

auf das Leukozytenrollen fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen CCL3-stimulierten Tieren und PBS-behandelten Kontrolltieren.

Die Stimulation mit CCL3 führte aber zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl intravaskulär fest adhärenter Leukozyten ($11,6 \pm 1,9 / 10^4 \mu\text{m}^2$) im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren ($4,3 \pm 0,9 / 10^4 \mu\text{m}^2$). In Ccr1- ($6,1 \pm 1,4 / 10^4 \mu\text{m}^2$) und Ccr5-defizienten ($6,3 \pm 1,5 / 10^4 \mu\text{m}^2$) Mäusen hingegen war dieser Anstieg nicht zu beobachten (siehe Abbildung 13 A, B).

Auch die Anzahl der in das Gewebe transmigrierten Leukozyten ($22,5 \pm 2,9 / 10^4 \mu\text{m}^2$) nach Stimulation mit CCL3 war im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrolltieren ($4,9 \pm 0,8 / 10^4 \mu\text{m}^2$) signifikant erhöht. In Ccr1- ($11,5 \pm 2,3 / 10^4 \mu\text{m}^2$) und Ccr5-defizienten ($9,6 \pm 1,3 / 10^4 \mu\text{m}^2$) Knockout-Tieren war kein signifikanter Anstieg der transmigrierten Leukozyten zu beobachten (siehe Abbildung 13 A, C).

1.2 Bedeutung von leukozytären vs. nicht-leukozytären Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten

Um der Fragestellung nachzugehen, ob leukozytäre oder nicht-leukozytäre Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 an der CCL3 vermittelten Entzündungsreaktion beteiligt sind, wurden Zell-Transfer-Experimente durchgeführt. Knochenmarksleukozyten wurden von Wildtyp-, Ccr1^{-/-}- und Ccr5^{-/-}-Knockout-Tieren gewonnen, mit dem Farbstoff Calcein-AM gefärbt und in Wildtyp-, Ccr1^{-/-}- und Ccr5^{-/-}-Knockout-Tiere intravenös appliziert. Im Anschluss wurde mittels intraskrotal verabreichtem Chemokin CCL3 stimuliert und die intravaskuläre Adhärenz und Transmigration der gefärbten Zellen ins umliegende Gewebe ausgewertet (175 Gesichtsfelder (HPF) pro *M. cremaster*).

Ergebnisse

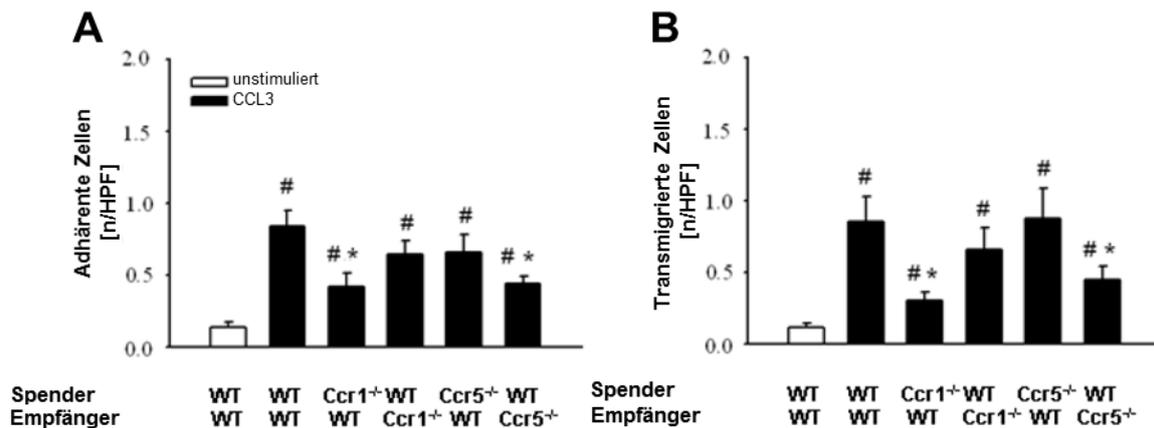


Abbildung 14: Die Bedeutung der leukozytären vs. nicht-leukozytären Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 für die CCL3-vermittelte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten. Intravaskulär adhären und in das perivaskuläre Gewebe transmigrierte, fluoreszenzmarkierte Leukozyten aus dem Knochenmark von WT-, Ccr1^{-/-} und Ccr5^{-/-}-Mäusen im *M. cremaster* nach Stimulation mit CCL3, verglichen mit der PBS-behandelten Kontrollgruppe. Die Graphen zeigen Ergebnisse für Empfängermause, die mit WT-, Ccr1^{-/-} und Ccr5^{-/-}- Knochenmarksleukozyten behandelt wurden (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts für 7 Tiere pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (unstimuliert), * $p < 0,05$ vs. WT zu WT Transfer).

Hierbei hat sich gezeigt, dass signifikant mehr fluoreszierende Wildtyp-Knochenmarksleukozyten in Wildtyp-Tieren nach CCL3 Stimulation adhären ($0,84 \pm 0,11$ / HPF vs. $0,14 \pm 0,03$ / HPF) und transmigriert ($0,86 \pm 0,17$ / HPF vs. $0,12 \pm 0,02$ / HPF) waren, als in PBS-behandelten Kontrollen (siehe Abbildung 14 A, B).

Dieser Anstieg war in Wildtyp-Tieren, welche Ccr1^{-/-}-Knochenmarkszellen empfangen hatten ($0,42 \pm 0,09$ / HPF adhären Zellen und $0,31 \pm 0,06$ / HPF transmigrierte Zellen) und in Ccr5^{-/-}-Tieren, welche Wildtyp-Knochenmarksleukozyten empfangen hatten nicht zu sehen.

1.3 Bedeutung G-Protein gekoppelter Signaltransduktionswege und der PI3-Kinase für die CCL3-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten

Chemokinrezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche über G α i-Proteine Signale in die Zelle transduzieren. Ob dieser Signaltransduktionsweg im Falle der CCL3 vermittelten Leukozytenrekrutierung im *M. cremaster* involviert ist, wurde

Ergebnisse

anhand intravitalmikroskopischer Aufnahmen im Gewebe nach Behandlung mit Pertussistoxin untersucht.

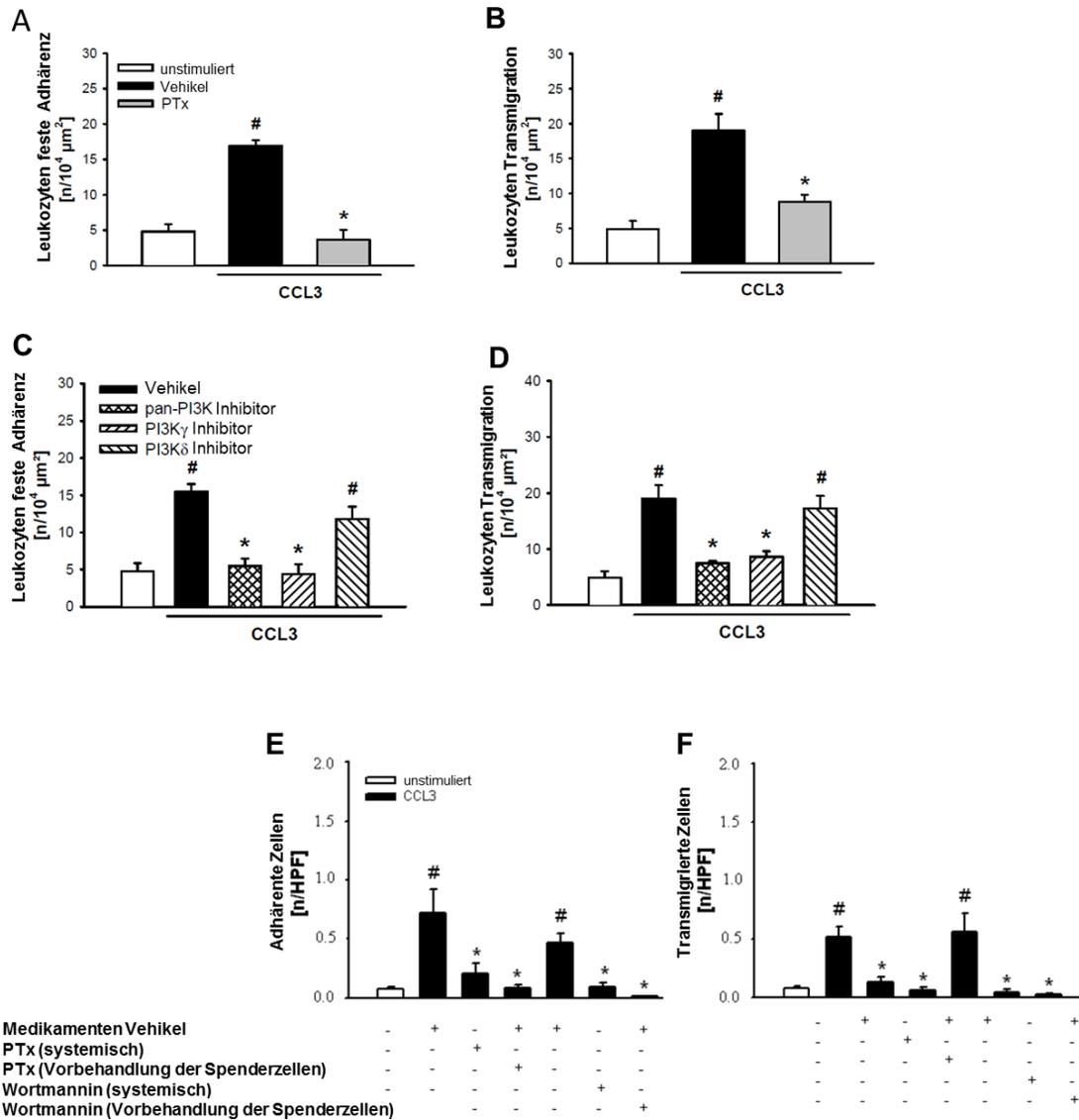


Abbildung 15: Bedeutung G-Protein gekoppelter Signaltransduktionswege und der PI3-Kinase für die intravaskuläre Adhärenz und Transmigration von neutrophilen Granulozyten ins umliegende Gewebe nach Stimulation mit CCL3. Leukozytenrekrutierung nach Blockade von G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit Pertussistoxin (PTx) im *M. cremaster* nach Stimulation mit CCL3 verglichen mit der Kontrollgruppe und mit der Vehikel-behandelten Gruppe. Adhärenz und Transmigration von Leukozyten nach Verabreichung von PI3-Kinase-Inhibitoren (pan-PI3-Kinase für Blockade aller Isoformen, selektive Blockade der PI3K γ -Isoform und δ -Isoform) verglichen mit der Kontrollgruppe und mit der Vehikel-behandelten Gruppe nach Stimulation mit CCL3 (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts für 4 Tiere pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (unstimuliert), * $p < 0,05$ vs. Medikamenten Vehikel). Zell-Transfer-Experimente mit quantitativer Auswertung der Adhärenz und Transmigration von Fluoreszenz-markierten Knochenmarksleukozyten pro Hauptgesichtsfeld (HPF) nach Stimulation mit CCL3, die mit PBS, PTx oder dem pan-PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin vorbehandelt wurden und Empfängermäusen zugeführt wurden, welche mit Medikamenten Vehikel, PTx oder Wortmannin systemisch vorbehandelt wurden (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts für 4 Tiere pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (unstimuliert), * $p < 0,05$ vs. Medikamenten Vehikel).

Ergebnisse

Pertussistoxin (PTx) führt über eine ADP-Ribosylierung des $G_{\alpha i}$ -Proteins zu dessen Blockade und unterbricht somit die Signaltransduktion der $G_{\alpha i}$ - und $\beta\gamma$ - Untereinheit. Die Behandlung mit Pertussistoxin kurz vor der Stimulation mit CCL3 führte zu einer signifikanten Reduktion der intravaskulären Adhärenz und Transmigration der Leukozyten in das umliegende Gewebe im Vergleich zur entsprechenden Vehikel-Kontrollgruppe (siehe Abbildung 15 A, B).

Der nachgeschaltete Signalweg beinhaltet unter anderem die Aktivierung der PI3-Kinase, wobei verschiedene Isoformen der PI3-Kinase vorliegen, die unterschiedliche Funktionen innehaben. Im Kontext der Leukozytenrekrutierung sind die Isoformen PI3-Kinase γ und δ von besonderer Bedeutung. Zur Untersuchung der Bedeutung dieser Enzyme für die Leukozytenrekrutierung durch CCL3 wurden PI3-Kinase-Inhibitoren kurz vor der Stimulation verabreicht. Die Behandlung mit einem pan-PI3-Kinase-Inhibitor sowie mit einem PI3-Kinase γ -Inhibitor führte zu einer signifikanten Reduktion der intravaskulären Adhärenz und Transmigration von Leukozyten ins perivaskuläre Gewebe verglichen mit den entsprechenden Kontrolltieren. Die Blockade der PI3-Kinase δ hatte hingegen keinen Effekt auf die durch CCL3 hervorgerufene Leukozytenrekrutierung (Abbildung 15 C, D).

Durch Zell-Transfer-Experimente mit fluoreszierend angefärbten Knochenmarksleukozyten aus Spendermäusen wurde untersucht, ob die Signaltransduktionsmoleküle auf den Leukozyten oder auf nicht-leukozytären Zellen für die Rekrutierung von Leukozyten ins Gewebe benötigt werden. Hierbei hat sich gezeigt, dass sowohl Tiere, welche systemisch mit Pertussistoxin oder dem irreversiblen pan-PI3-Kinasen-Inhibitor Wortmannin behandelt wurden und anschließend Spenderleukozyten von Wildtyp-Tieren erhalten haben, als auch unbehandelte Tiere, welche mit Pertussistoxin oder Wortmannin behandelte Spenderleukozyten erhalten haben, signifikant weniger in der Mikrozirkulation adhären und ins Gewebe transmigrierte, fluoreszenzmarkierte Knochenmarksleukozyten pro Hauptgesichtsfeld (HPF) nach Stimulation mit CCL3 aufwiesen (siehe Abbildung 15 E, F).

Ergebnisse

1.4 Bedeutung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1/CD54, VCAM-1/CD106, ICAM-2/CD102, und PECAM-1/CD31 und der α 4- und β 2-Integrine für die CCL3-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten

Die α 4- und β 2-Integrine sowie die Adhäsionsmoleküle ICAM-1/CD154, VCAM-1/CD106, ICAM-2/CD102 und PECAM-1/CD31 sind Schlüssel-moleküle bei Prozessen der Leukozytenrekrutierung ins umliegende Gewebe (siehe Kapitel II, 1.5). Welche dieser Moleküle in der durch CCL3 ausgelösten Entzündungsreaktion beteiligt sind, wurde intravitalmikroskopisch untersucht.

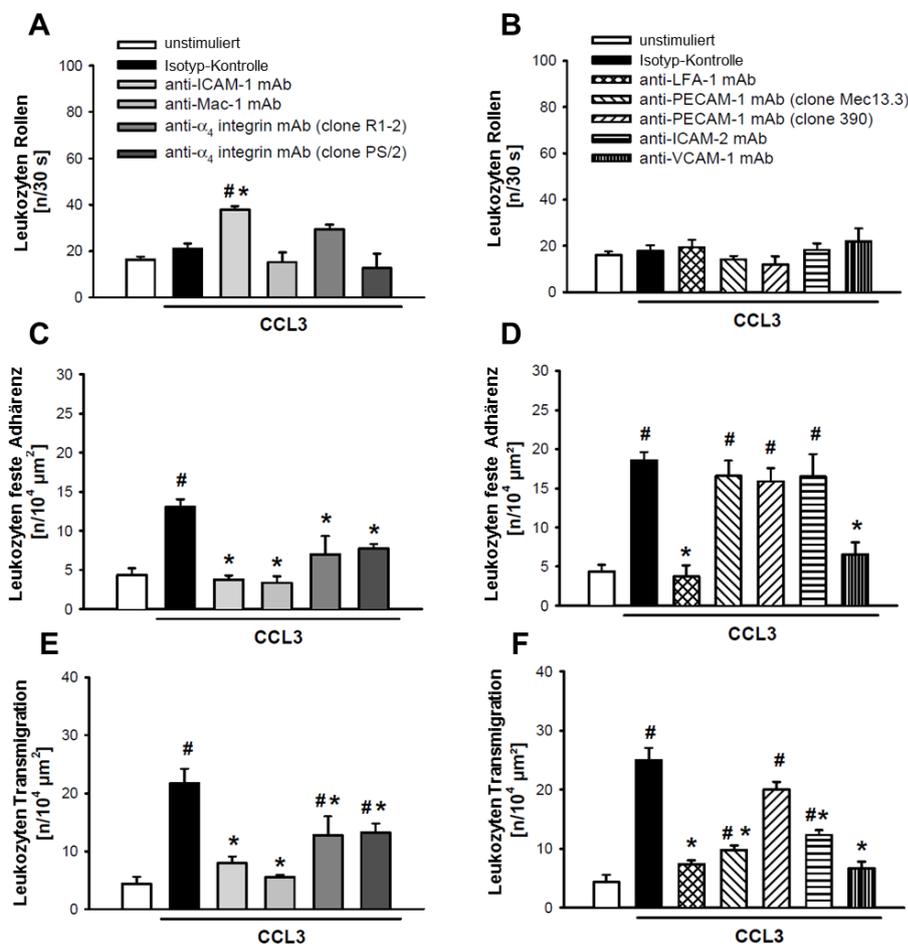


Abbildung 16: Relevanz der β 2- und α 4-Integrine und der Adhäsionsmoleküle ICAM-1/CD54, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und ICAM-2/CD102 für die CCL3-induzierte Leukozytenrekrutierung. Leukozytenrollen, Adhärenz und Transmigration wurde in postkapillären Venolen nach Verabreichung von blockierenden Antikörpern gegen die β 2- und α 4-Integrine sowie gegen ICAM-1/CD154, VCAM-1/CD106, PECAM-1/CD31 und ICAM-2/CD102, kurz vor Stimulation mit CCL3, untersucht und mit Tieren verglichen, die mit Isotyp-Kontrollantikörpern behandelt wurden. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein nicht-blockierender Antikörper gegen PECAM-1/CD31 (clone 390) verabreicht (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts für 4 Tiere pro Gruppe, # p<0,05 vs. Kontrollgruppe (unstimuliert), * p<0,05 vs. Isotyp-Kontrollantikörper).

Ergebnisse

Hierbei zeigte sich, dass die intravaskuläre Adhärenz und die anschließende Transmigration der Leukozyten in der CCL3-induzierten Entzündung nach vorheriger systemischer Verabreichung von blockierenden Antikörpern gegen die β 2-Integrine LFA-1/CD11a oder Mac-1/CD11b im Vergleich zur Kontrollantikörper-behandelten Gruppe (siehe Abbildung 16 C, D, E, F) praktisch vollständig inhibiert wurden. Das Rollen der Leukozyten wurde im Gegensatz dazu durch die Behandlung mit den Antikörpern nicht wesentlich beeinflusst (siehe Abbildung 16 A, B). Die Blockade des Adhäsionsmoleküls ICAM-1/CD154, dem Interaktionspartner der β 2-Integrine, führte zu einer praktisch vollständigen Blockade der Adhärenz und Transmigration von Leukozyten und zudem zu einer signifikanten Verringerung des Rollens von Leukozyten. Die Blockade der α 4-Integrine ergab eine leichte Reduktion der CCL3-induzierten intravaskulären Adhärenz und Transmigration von Leukozyten in das umliegende Gewebe. Durch die Blockade des Adhäsionsmoleküls und Interaktionspartners VCAM-1/CD106 kam es zu einer deutlichen Reduktion der Adhärenz und Transmigration. Die Adhäsionsmoleküle PECAM-1/CD31 und ICAM-2/CD102 sind vor allem in die Prozesse der Transmigration durch das Endothel ins Gewebe involviert. Eine Blockade von PECAM-1/CD31 und ICAM-2/CD102 führte zu einer selektiven Verringerung der Transmigration ohne maßgeblicher Beeinflussung des Rollens oder der Adhärenz von Leukozyten. Ein nicht-blockierender Antikörper gegen PECAM-1/CD31 (clone 390) wurde zu Kontrollzwecken verwendet und zeigte keine Wirkung auf die Adhärenz und Transmigration von Leukozyten.

1.5 Die Bedeutung von G-Protein gekoppelten und PI3-Kinase abhängigen Signaltransduktionswegen für die CXCL1- oder PAF-induzierte Leukozytenrekrutierung

Das Chemokin CXCL1 und der Lipidmediator PAF sind bekanntermaßen klassische Entzündungsmediatoren, welche chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken. Durch *In-vivo*-Mikroskopie am *M. cremaster* der Maus wurde die Bedeutung von G-

Ergebnisse

Protein abhängiger Signaltransduktion und anschließender Aktivierung der PI3-Kinase untersucht.

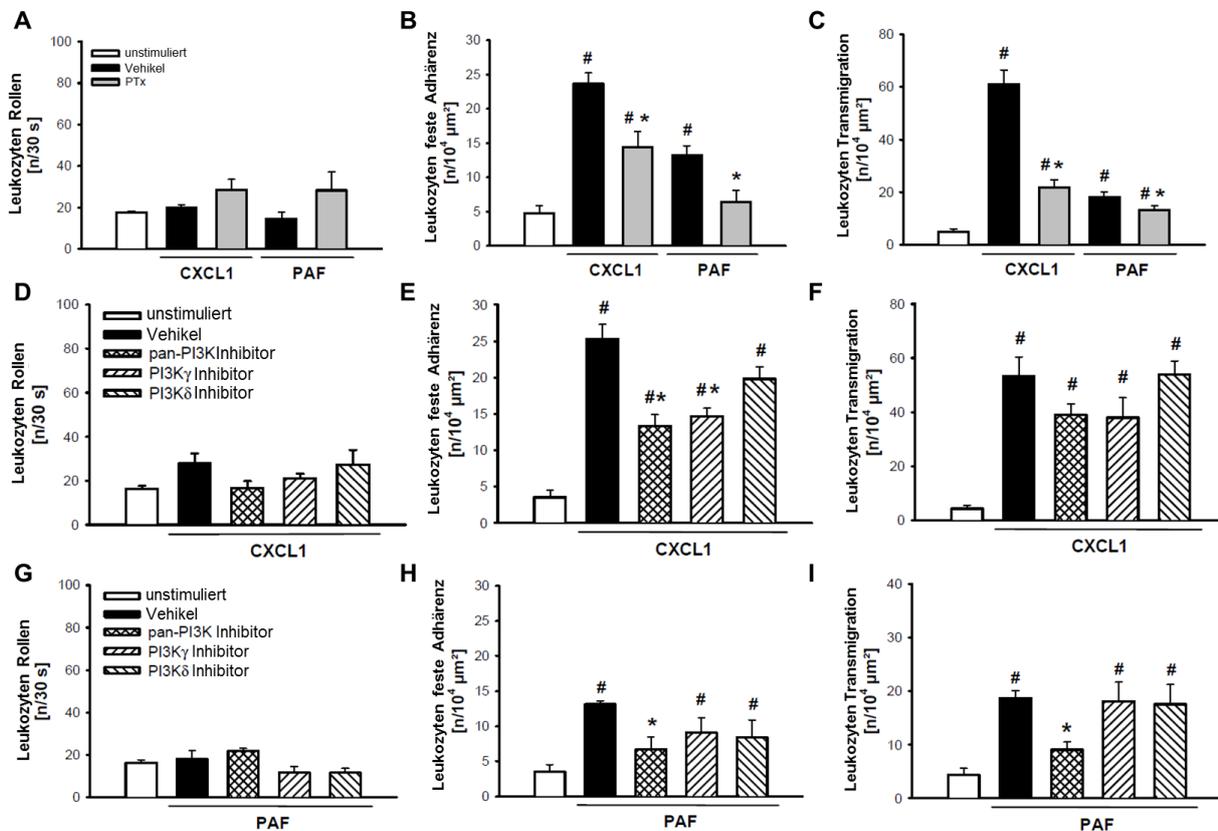


Abbildung 17: Signaltransduktion über G-Protein gekoppelte Rezeptoren und nachfolgender Aktivierung der PI3-Kinase in der CXCL1- oder PAF-induzierten Leukozytenrekretion. Leukozytenrollen (A, D, G), intravaskuläre Adhärenz (B, E, H) und Transmigration ins perivaskuläre Gewebe (C, F, I) wurden nach Stimulation mit CXCL1 oder PAF und vorangegangener Applikation von Pertussistoxin oder Inhibitoren der PI3-Kinase untersucht. In den Graphen sind die quantitativen Daten der PBS-behandelten Kontrolltiere (unstimuliert) und der CXCL1- oder PAF-stimulierten Tiere nach Behandlung mit Pertussistoxin (PTx), einem pan-PI3-Kinase-Inhibitor (PI103), einem Inhibitor der PI3-Kinase γ (AS605240), einem Inhibitor der PI3-Kinase δ (IC87114) oder nach einer Behandlung mit einem entsprechenden Vehikel dargestellt. (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts für 4 Tiere pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (unstimuliert), * $p < 0,05$ vs. Vehikel).

Nach Stimulation mit CXCL1 oder PAF kam es, nach G-Protein Blockade durch Pertussistoxin, nur zu einer partiell verringerten intravaskulären Adhärenz und Transmigration von Leukozyten in das umliegende Gewebe (Abbildung 17 B, C). Das Rollen der Zellen am Endothel blieb unbeeinflusst (Abbildung 17 A). Auch die Behandlung mit Inhibitoren der PI3-Kinase führte nur zu einer geringen Reduktion der Adhärenz von Leukozyten nach Stimulation mit CXCL1, wobei nur der Inhibitor der pan-PI3-Kinase (alle Isoformen) und der PI3-Kinase γ , nicht aber der Inhibitor der PI3-

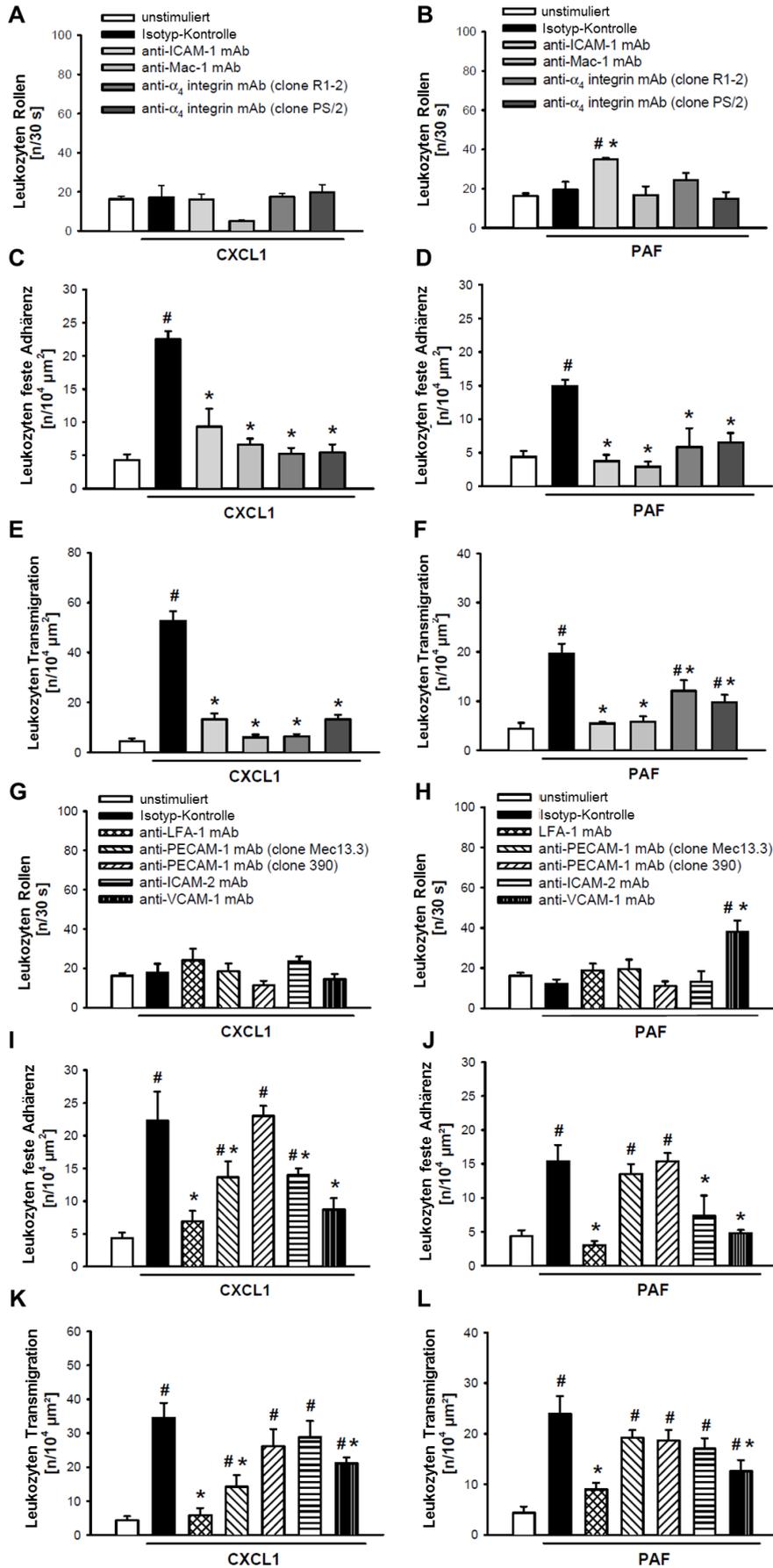
Ergebnisse

Kinase δ einen Effekt zeigte (Abbildung 17 E). Das Rollen und die Transmigration von Leukozyten ins perivaskuläre Gewebe blieben durch die Blockade der PI3-Kinase unbeeinflusst (Abbildung 17 D, F). Nach Stimulation mit PAF ergab sich lediglich bei Blockade aller PI3-Kinase-Isoformen eine geringe Reduktion der Leukozytenrekrutierung in das Gewebe, nicht aber durch alleinige Blockade der γ - oder δ -Isoform (Abbildung 17 G, H, I).

1.6 Bedeutung der β 2- und α 4- Integrine und der Adhäsionsmoleküle ICAM-1/CD54, VCAM-1/CD106, ICAM-2/CD102 und PECAM-1/CD31 für die CXCL1- oder PAF-induzierte Leukozytenrekrutierung

Nach Untersuchung der Bedeutung der α 4- und β 2-Integrine und der Adhäsionsmoleküle ICAM-1/CD54, VCAM-1/CD106, ICAM-2/CD102 und PECAM-1/CD31 in der CCL3-induzierten Leukozytenrekrutierung in das Gewebe, wurde die Bedeutung dieser Moleküle für die Leukozytenrekrutierung nach Stimulation mit klassischen, auf neutrophile Granulozyten wirkenden Mediatoren (CXCL1 und PAF) überprüft (Abbildung 18 A-L). Durch Blockade der entsprechenden Moleküle kurz vor der entzündlichen Stimulation und anschließender intravitalmikroskopischer Beurteilung, wurde die Bedeutung dieser Moleküle für die intravaskuläre Adhärenz und Transmigration von Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe analysiert.

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 18: Involvierung von Mac-1, der α 4-Integrine und ICAM-1/CD54 sowie LFA-1/CD11a, PECAM-1/CD31, ICAM-2/CD102 und VCAM-1/CD106 in die CXCL1- und PAF-induzierte Leukozytenrekrutierung. Leukozytenrollen (A, B, G, H), intravaskuläre Adhärenz am Endothel (C, D, I, J) und Transmigration durch das Endothel ins Gewebe (E, F, K, L) wurden mittels RLOT-Intravitalmikroskopie quantifiziert. Die Graphen zeigen die Ergebnisse für PBS-behandelte Kontrolltiere (unstimuliert), Tiere die mit blockierenden Antikörpern (gegen Mac-1/CD11b, α 4-Integrine und ICAM-1/CD54 sowie LFA-1/CD11a, PECAM-1/CD31, ICAM-2/CD102 und VCAM-1/CD106) kurz vor der Stimulation mit CXCL1 oder PAF behandelt wurden sowie Tiere, die mit entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörpern behandelt wurden. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine Gruppe mit einem nicht-blockierenden Antikörper gegen PECAM-1/CD31 (clone 390) behandelt. (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts für 4 Tiere pro Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (unstimuliert), * $p < 0,05$ vs. Isotyp-Kontrollantikörper).

Durch die Blockade von den β 2-Integrinen Mac-1/CD11b und LFA-1/CD11a wurde die intravaskuläre Adhärenz und die anschließende Transmigration von Leukozyten nach Stimulation mit CXCL1 oder PAF praktisch vollständig inhibiert im Vergleich zu Tieren, welche mit entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörpern oder einem nicht-blockierenden PECAM-1/CD31 Antikörper (clone 390) behandelt wurden. Das Rollen der Leukozyten wurde im Gegensatz dazu nicht beeinflusst. Interessanterweise führte die Blockade von ICAM-1/CD54 nach Stimulation mit CXCL1 und PAF zu einer signifikanten Inhibierung der intravaskulären Adhärenz und Transmigration ins Gewebe, im Falle der Stimulation mit PAF jedoch zusätzlich zu einer Erhöhung der Anzahl rollender Leukozyten. Außerdem führte die Blockade von α 4-Integrinen (VLA-4/CD49d oder α 4 β 7-Integrin) und deren Liganden VCAM-1/CD106 sowohl in der CXCL1-induzierten als auch in der PAF-induzierten Entzündung zur verringerten Leukozytenrekrutierung ins Gewebe. Die Blockade des typischerweise für die Transmigration bedeutsamen Moleküls PECAM-1/CD31 führte nach Stimulation mit CXCL1 zu einer partiellen Verringerung der intravaskulären Adhäsion und Transmigration von Leukozyten ins Gewebe, wohingegen dies für die PAF-induzierte Rekrutierung von Leukozyten nicht zu beobachten war. Die Blockade von ICAM-2/CD102 hingegen reduzierte die Leukozytenadhäsion am Endothel nach Stimulation mit CXCL1 und PAF, führte jedoch nicht zu einer signifikanten Verringerung der Transmigration von Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe.

1.7 Transmigrationsrouten der Leukozyten nach Stimulation mit CCL3, CXCL1 oder PAF

Aus der Literatur ist bekannt, dass Leukozyten bei ihrer transendothelialen Migration in das perivaskuläre Gewebe auf zwei verschiedene Arten die Barriere zwischen Gefäß und Gewebe durchbrechen können. Man unterscheidet den transzellulären Weg (durch den Körper der Endothelzelle hindurch) vom parazellulären Weg (durch die Kontaktverbindungen zweier benachbarter Endothelzellen). Um den vorherrschenden Weg der Transmigration nach Stimulation mit CCL3, CXCL1 oder PAF zu bestimmen, wurden die Endothelzellkontakte durch fluoreszierende, nicht-blockierende Antikörper gegen PECAM-1/CD31 visualisiert.

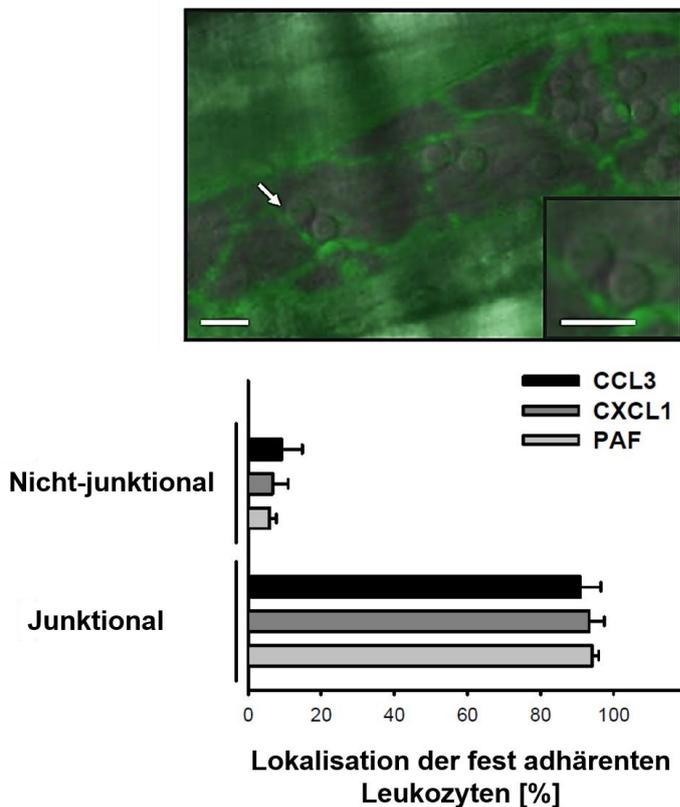


Abbildung 19: Transmigrationsrouten von Leukozyten nach Stimulation mit CCL3, CXCL1 oder PAF. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus der Intravitalmikroskopie des *M. cremaster* mit Darstellung der Endothelzellkontakte durch Superfusion mit einem nicht-blockierenden, fluoreszierenden Antikörper gegen PECAM-1/CD31 (grün) und zeitgleicher RLOT-Darstellung adhärenenten Leukozyten (Messbalken: 20 μ m, A). Der Pfeil deutet auf einen adhärenenten Leukozyten, welcher sich in direktem Kontakt mit einem angefärbten Endothelzellkontakt befindet. Die Graphen (B) zeigen die quantitative Auswertung der Lokalisation der adhärenenten Leukozyten in Relation zu den Endothelzellkontakten (Junktional vs. Nicht-junktional) nach Stimulation mit CCL3, CXCL1 oder PAF (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts für 3 Tiere pro Gruppe).

Ergebnisse

Durch Auswertung der Lokalisation von adhärenenten Leukozyten in Relation zu den fluoreszenzmikroskopisch dargestellten Endothelzellkontakten konnten Rückschlüsse auf die Art der präferierten Transmigrationsroute gezogen werden. Hierbei hat sich gezeigt, dass der Großteil von adhärenenten Leukozyten nach Stimulation mit CCL3, CXCL1 oder PAF in direktem Kontakt zu Endothelzellkontakten (junktionale) zu finden war ($90,8 \pm 5,7\%$ für CCL3; $93,3 \pm 4,2\%$ für CXCL1; $94,2 \pm 1,8\%$ für PAF) und nur sehr wenige Leukozyten entfernt von Endothelzellkontakten adhärenenten (nicht-junktionale). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Leukozyten im *M. cremaster* nach der Stimulation mit den oben genannten Entzündungsmediatoren über parazelluläre Wege ins umliegende Gewebe migrieren.

1.8 Phänotypisierung von adhärenenten und transmigrierten Leukozyten

Die Phänotypisierung der intravaskulär adhärenenten und transmigrierten Leukozyten im *M. cremaster* nach Stimulation mit den Chemokinen CCL3, CXCL1 oder dem Lipidmediator PAF erfolgte in Schnitten, welche in Paraffin eingebettet und mit Antikörpern angefärbt wurden. Hierbei zeigte sich, dass über 80% der adhärenenten und ins Gewebe transmigrierten CD45-positiven Leukozyten Ly6-G positive, neutrophile Granulozyten waren. Die restlichen 15-20% der Zellen erwiesen sich als F4/80 positive Monozyten oder Makrophagen.

1.9 Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen

Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Versuchsgruppen zu überprüfen, wurden in allen intravitalmikroskopischen Untersuchungen Geschwindigkeitsmessungen in der Mikrozirkulation durchgeführt. Zudem wurden die Gefäßdurchmesser bestimmt und somit die vorherrschenden Schergeschwindigkeiten berechnet. Nach jedem Experiment erfolgte eine Blutentnahme mit anschließender Bestimmung der systemischen Leukozytenzahl. Hierbei wurden keine signifikanten Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt (siehe Tabelle 2).

Ergebnisse

Tier	Stimulus	Behandlung	Innerer Gefäß- durchmesser [μm]	Vmean [mm s^{-1}]	Scherge- schwindigkeit [s^{-1}]	Systemische Leukozytenzahl [$\text{n} \times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$]
WT	PBS		24.6 \pm 0.9	1.3 \pm 0.1	2062.6 \pm 118.5	5.4 \pm 0.9
WT	CCL3		24.2 \pm 0.4	1.4 \pm 0.1	2252.1 \pm 87.5	4.6 \pm 0.9
CCR1 ^{-/-}	CCL3		24.0 \pm 1.2	1.4 \pm 0.1	2292.8 \pm 75.0	4.6 \pm 0.7
CCR5 ^{-/-}	CCL3		23.9 \pm 0.9	1.2 \pm 0.1	1926.8 \pm 190.6	5.3 \pm 0.9
WT	PBS		24.6 \pm 1.2	1.3 \pm 0.1	2077.0 \pm 184.3	5.7 \pm 1.3
WT	CCL3	Vehikel	24.0 \pm 1.3	1.3 \pm 0.1	2200.4 \pm 140.1	5.4 \pm 1.0
WT	CCL3	PTx	24.9 \pm 0.7	1.3 \pm 0.1	2006.1 \pm 96.3	5.8 \pm 1.6
WT	CXCL1	Vehikel	26.2 \pm 0.3	1.3 \pm 0.1	1979.0 \pm 14.2	2.9 \pm 0.8
WT	CXCL1	PTx	25.5 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	1880.9 \pm 123.6	4.3 \pm 1.5
WT	PAF	Vehikel	23.4 \pm 0.7	1.3 \pm 0.1	2110.0 \pm 40.7	5.1 \pm 0.6
WT	PAF	PTx	25.5 \pm 0.5	1.3 \pm 0.1	2007.6 \pm 60.1	5.7 \pm 0.5
WT	CCL3	Vehikel	24.3 \pm 0.4	1.3 \pm 0.1	1978.2 \pm 46.4	4.7 \pm 1.0
WT	CCL3	pan-PI3K- Inhibitor	25.0 \pm 0.6	1.3 \pm 0.1	2090.9 \pm 171.1	4.6 \pm 1.0
WT	CCL3	PI3Ky-Inhibitor	25.1 \pm 0.6	1.2 \pm 0.1	1865.6 \pm 214.0	4.0 \pm 1.2
WT	CCL3	PI3K δ -Inhibitor	25.5 \pm 0.4	1.3 \pm 0.1	1911.7 \pm 201.0	4.6 \pm 1.0
WT	CXCL1	Vehikel	25.2 \pm 0.7	1.5 \pm 0.1	2345.4 \pm 115.8	6.6 \pm 2.0
WT	CXCL1	pan-PI3K- Inhibitor	24.6 \pm 0.5	1.4 \pm 0.1	2274.2 \pm 136.0	2.7 \pm 1.2
WT	CXCL1	PI3Ky-Inhibitor	25.5 \pm 0.4	1.2 \pm 0.1	2154.3 \pm 158.6	5.2 \pm 1.3
WT	CXCL1	PI3K δ -Inhibitor	25.1 \pm 0.4	1.5 \pm 0.1	2204.4 \pm 142.7	3.6 \pm 0.8
WT	PAF	Vehikel	27.3 \pm 0.7	1.2 \pm 0.1	1737.3 \pm 70.6	4.0 \pm 1.2
WT	PAF	pan-PI3K- Inhibitor	26.5 \pm 0.6	1.3 \pm 0.1	1852.3 \pm 47.6	4.6 \pm 1.0
WT	PAF	PI3Ky-Inhibitor	25.5 \pm 0.6	1.3 \pm 0.1	1797.5 \pm 92.8	4.0 \pm 1.2
WT	PAF	PI3K δ -Inhibitor	26.0 \pm 0.6	1.1 \pm 0.1	1744.6 \pm 55.9	3.3 \pm 0.6
WT	CCL3	Isotyp Kontrolle	23.6 \pm 0.7	1.3 \pm 0.1	2190.2 \pm 153.9	4.2 \pm 0.9
WT	CCL3	anti-ICAM-1 mAb	24.6 \pm 0.8	1.3 \pm 0.1	2107.7 \pm 96.9	5.0 \pm 0.8
WT	CCL3	anti-Mac-1 mAb	23.4 \pm 0.4	1.3 \pm 0.1	2128.4 \pm 100.0	4.1 \pm 0.3
WT	CCL3	anti-VLA-4 mAb (R1-2)	24.1 \pm 1.5	1.5 \pm 0.1	2268.3 \pm 147.9	4.9 \pm 0.6
WT	CCL3	anti-VLA-4 mAb (PS/2)	24.3 \pm 1.1	1.0 \pm 0.1	1616.3 \pm 58.0	4.0 \pm 0.4
WT	CCL3	Isotyp Kontrolle	23.5 \pm 0.4	1.2 \pm 0.1	1994.3 \pm 60.5	3.5 \pm 1.0
WT	CCL3	anti-LFA-1 mAb	23.5 \pm 0.7	1.2 \pm 0.1	2183.1 \pm 33.2	3.4 \pm 0.8

Ergebnisse

WT	CCL3	anti-PECAM-1 mAb (Mec13.3)	23.1 ± 0.8	1.2 ± 0.1	2076.3 ± 71.6	4.1 ± 0.7
WT	CCL3	anti-PECAM-1 mAb (390)	23.5 ± 0.8	1.1 ± 0.1	1851.9 ± 118.9	5.1 ± 1.5
WT	CCL3	anti-ICAM-2 mAb	27.2 ± 0.2	1.4 ± 0.1	2122.1 ± 74.2	3.5 ± 0.2
WT	CCL3	anti-VCAM-1 mAb	25.5 ± 0.8	1.3 ± 0.1	2034.4 ± 122.7	3.5 ± 0.6

Tabelle 2: Hämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen der einzelnen Versuchsgruppen (Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts für 4 bis 6 Tiere pro Gruppe).

2 Effekte der lokalen Entzündung auf die mikrovaskuläre Thrombusbildung und physiologische Bedeutung der Immunthrombose

2.1 Mikrovaskuläre Thrombusbildung im entzündeten Gewebe

Die mikrovaskuläre Thrombusbildung ist als immunthrombotischer Prozess im Rahmen akuter Entzündungsreaktionen weit verbreitet. Bisherige Studien, welche die Immunthrombose in der Mikrozirkulation untersucht haben, bezogen sich auf die Thrombusbildung im peripheren Gewebe während einer systemischen Entzündung mit Endotoxämie [127-129, 147]. In den untersuchten peripheren Geweben liegt in diesem Fall keine lokale Entzündungsreaktion mit intravaskulärer Adhärenz und Transmigration von Leukozyten ins perivaskuläre Gewebe vor (siehe Abbildung 22 H, Kapitel V, 2.3). Stattdessen ist die Entzündungsreaktion bereits generalisiert und wirkt sich auf multiple Organsysteme aus. Die Mechanismen der Immunthrombose im peripheren Gewebe am Ort der Entzündungsentstehung, wo beispielsweise Pathogene in die Mikrozirkulation des Organismus eindringen, sind bislang nicht ausreichend untersucht worden. Um diese Prozesse genau zu analysieren, wurde die mikrovaskuläre Thrombusbildung im *M. cremaster* durch phototoxische Endothelzellaktivierung ausgelöst und untersucht. Eine akute Entzündungsreaktion wurde lokal am Ort des Geschehens durch eine intraskrotale Injektion von LPS hervorgerufen. Im Anschluss wurde nach 6 Stunden Stimulationszeit eine phototoxische Endothelzellaktivierung mit Thrombusbildung in der Mikrozirkulation induziert und mittels Fluoreszenzmikroskopie in Echtzeit visualisiert (siehe Kapitel IV, 3.3.3 und 5.4). In diesem Modell wurde im Gegensatz zu anderen Thrombosemodellen, wie beispielsweise der durch Eisenchlorid oder mechanischer endothelialer Denudation ausgelösten Thrombose, kein exzessiver Endothelzellschaden mit Freilegung subendothelialer Strukturen generiert, sondern lediglich eine Endothelzellaktivierung mit anschließender Thrombusbildung hervorgerufen.

Ergebnisse

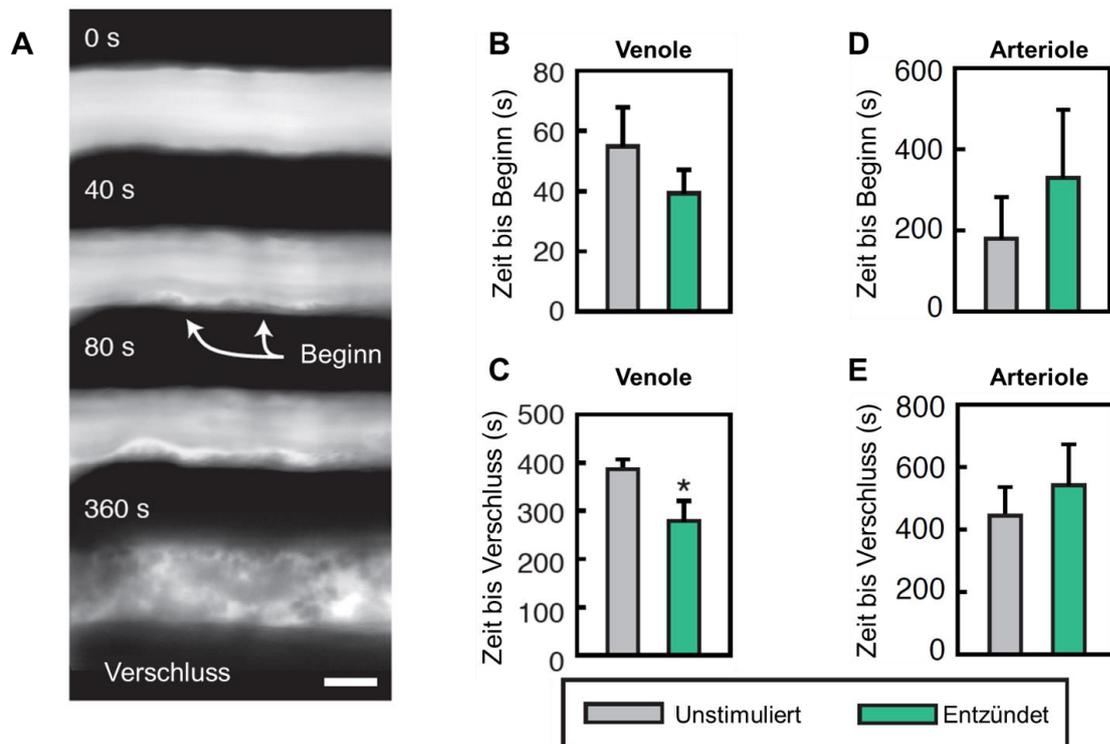


Abbildung 20: Dynamik der Thrombusbildung in der entzündeten Mikrozirkulation. Die mikrovaskuläre Thrombusbildung im *M. cremaster* wurde durch phototoxische Endothelzellaktivierung induziert und fluoreszenzmikroskopisch in Echtzeit aufgezeichnet, hier zu sehen in einer Venole (A, Messbalken 20 µm). Die Graphen zeigen die quantitative Auswertung der Zeiten bis zum ersten Auftreten von Thrombusmaterial am Endothel („Zeit bis Beginn“) und bis zum kompletten Gefäßverschluss („Zeit bis Verschluss“). Auf der linken Seite befinden sich die Ergebnisse für Venolen (B, C) und auf der rechten Seite die entsprechenden Ergebnisse in Arteriolen (D, E). Die Zeiten von mit PBS-vorbehandelten Kontrolltieren („Unstimuliert“) wurden mit den Zeiten von intraskrotal mit LPS stimulierten Tieren („Entzündet“) verglichen. (Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts für 9 Tiere pro Gruppe, * p < 0,05 vs. „Unstimuliert“).

In der Kontrollgruppe, welche mit einer intraskrotalen PBS-Injektion behandelt wurde („Unstimuliert“), hat sich bei der Thrombusbildung in Venolen gezeigt, dass erste Thrombusanteile kurzzeitig nach Beginn der Illumination mit Licht der Wellenlänge 488 nm an der endothelialen Oberfläche im Gefäß entstehen („Zeit bis Beginn“, 55 s ± 12 s). Der komplette Verschluss des entsprechenden Gefäßabschnitts durch den wachsenden Thrombus wurde zu einem späteren Zeitpunkt beobachtet („Zeit bis Verschluss“, 386 s ± 19 s). In Versuchsgruppen, die 6 Stunden zuvor mittels intraskrotaler LPS Injektion stimuliert wurden („Entzündet“), kam es zu einer signifikant beschleunigten Thrombusbildung mit deutlich kürzerer Dauer bis zum vollständigen Verschluss der Venole (279 s ± 39 s). Auch die Zeit bis zum Beginn der Thrombusbildung war verringert. Dieses Ergebnis war allerdings nicht statistisch signifikant (Abbildung 20 A, B, C). Die mikrovaskuläre Thrombusbildung in Arteriolen

Ergebnisse

war im Gegensatz zu den Ergebnissen in den Venolen deutlich langsamer und es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen lokal mit LPS stimulierten und PBS-behandelten Kontrolltieren beobachtet (Abbildung 20 D, E).

2.2 Die Bedeutung der Thrombozyten und der plasmatischen Gerinnung für die mikrovaskuläre Thrombusbildung

Die Thrombozytenaggregation und die plasmatische Gerinnung sind essentielle Mechanismen der Blutgerinnung und oftmals parallel ablaufende Prozesse (siehe Kapitel II, 3.1 und 3.2). Um die Bedeutung der einzelnen Prozesse für die mikrovaskuläre Thrombusbildung trennen zu können und deren Beitrag zur Immunthrombose in den Venolen des *M. cremaster* unter inflammatorischen Bedingungen beurteilen zu können, wurden folgende intravitalmikroskopische Untersuchungen durchgeführt:

Die Blockade der plasmatischen Gerinnung durch die Behandlung mit Heparin (und zusätzlicher Zerstörung potentiell vorhandener „NET“ Strukturen im entzündeten Gewebe sowie Inhibierung der Interaktion von Thrombozyten über Thrombin) führte weder in entzündeten, noch in unstimulierten Venolen zu einer signifikanten Verlängerung der induzierten Thrombose (Abbildung 21 A). Im Gegensatz dazu führte eine Thrombozytendepletion mit Elimination von über 90% der zirkulierenden Thrombozyten (siehe Tabelle 4, Kapitel V, 2.8) in der anschließend induzierten mikrovaskulären Thrombusbildung sowohl in der entzündeten als auch in der unstimulierten Mikrozirkulation zu einer hoch signifikanten Verlängerung der Zeiten bis zum Gefäßverschluss (Abbildung 21 B).

Ergebnisse

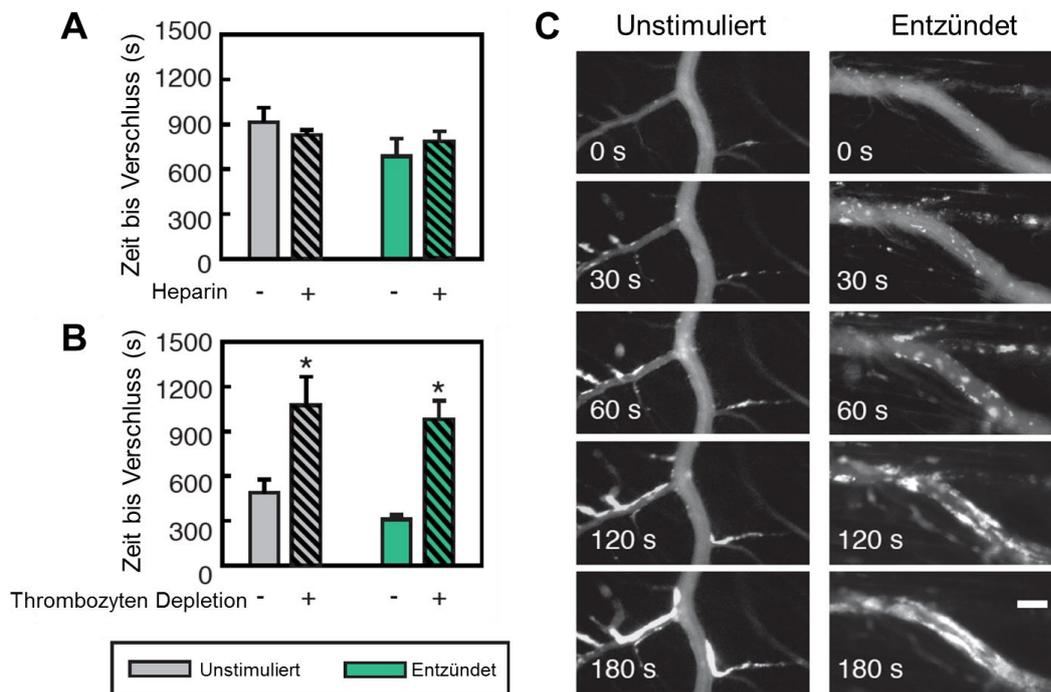


Abbildung 21: Bedeutung der plasmatischen Gerinnung und der Thrombozyten für die mikrovaskuläre Thrombusbildung. Nach Vollantikoagulation mit Heparin wurden die Effekte auf die phototoxisch-induzierte Thrombose in Venolen des *M. cremaster* nach lokaler Stimulation mit LPS („Entzündet“) im Vergleich zu der mit Vehikel behandelten Gruppe und in der PBS-behandelten Gruppe („Unstimuliert“) im Vergleich zu der mit Vehikel behandelten Gruppe untersucht (A). Des Weiteren wurde die Thrombusbildung nach Thrombozytendepletion mittels depletierenden Antikörpern analysiert und mit der Isotyp-Kontrollgruppe in entzündeten und unstimulierten Venolen (B) verglichen (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts für 4 Tiere pro Gruppe, * $p < 0,05$ vs. Isotyp-Kontrollantikörper). Der dynamische Ablauf der mikrovaskulären Thrombose wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie mit mehreren Farbkanälen (zur Darstellung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe) betrachtet. Die Thrombozyten sind auf den repräsentativen Aufnahmen aus der entzündeten und unstimulierten Mikrozirkulation in weiß dargestellt und die Zeitabfolge im linken unteren Bildrand eingeblendet (C, Messbalken 40 μm).

Zur weiteren Analyse der Funktion der Thrombozyten für die mikrovaskuläre Thrombose in den Venolen des *M. cremaster* wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mikrovaskulären Thrombose angefertigt, nachdem die Thrombozyten mit einem nicht-blockierenden, fluoreszierenden Antikörper markiert wurden. Hierbei hat sich gezeigt, dass Thrombozyten sowohl in der entzündeten als auch in der unstimulierten Mikrozirkulation die Hauptakteure der mikrovaskulären Thrombose sind. Interessanterweise hat sich auch gezeigt, dass sich der Ablauf der Thrombusbildung in entzündeten Gefäßen deutlich vom Ablauf der Thrombusbildung in unstimulierten Gefäßen unterscheidet. In unstimulierten Venolen zeigten sich anfangs nur in Kapillaren und kleinsten Venolen adhärenente Thrombozyten. Erst bei

Ergebnisse

voranschreitender Thrombose kam es zum Herauswachsen von Thrombusanteilen in größere Venolen, bis diese letztendlich verschlossen wurden. In entzündeten Venolen war im Gegensatz dazu die Thrombozytenadhäsion und Aggregation von Beginn an in multiplen Bereichen in den großen Venolen wie auch in den Kapillaren und kleinen Venolen zu beobachten. Dieser Prozess führte zu einer insgesamt effizienteren und beschleunigten mikrovaskulären Thrombusbildung in entzündetem Gewebe (Abbildung 21 C).

2.3 Funktion der Leukozyten bei der mikrovaskulären Thrombose unter inflammatorischen Bedingungen

In Prozessen der Immunthrombose spielen Leukozyten eine entscheidende Rolle. In diesem Kontext wurde die Bedeutung der Immunzellen bisher ausschließlich in Gefäßen mit geringen Schergeschwindigkeiten untersucht [34-36, 69]. Um die Bedeutung der Leukozyten in der Mikrozirkulation unter lokalen, inflammatorischen Bedingungen und bei hohen, dort vorherrschenden Schergeschwindigkeiten zu untersuchen, wurden weitere intravitalmikroskopische Aufnahmen angefertigt und analysiert. Die Leukozytenrekrutierung im *M. cremaster* wurde 6 Stunden nach lokaler Stimulation mittels intraskrotaler LPS Injektion („Entzündet“) quantitativ ausgewertet und mit PBS-behandelten Kontrolltieren („Unstimuliert“) verglichen.

Ergebnisse

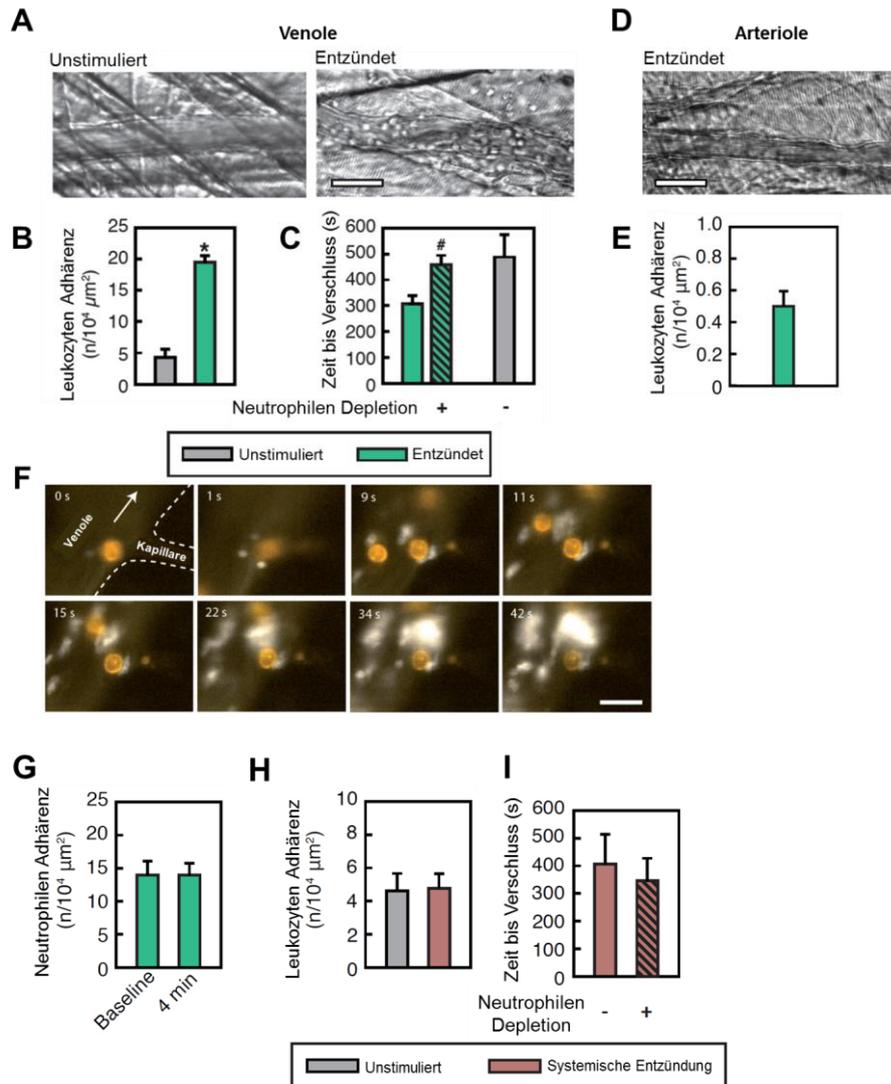


Abbildung 22: Funktion der neutrophilen Granulozyten für die mikrovaskuläre Thrombusbildung im lokal entzündeten Gewebe. Mittels RLOT Mikroskopie wurde die intravasale Adhärenz von Leukozyten in postkapillären Venolen untersucht. Lokal mit LPS stimulierte Tiere („Entzündet“) wurden mit PBS-behandelten Kontrolltieren („Unstimuliert“) verglichen (A, repräsentative RLOT Aufnahmen, Messbalken $40 \mu\text{m}$). Quantitative Auswertung der Leukozytenadhärenz nach lokaler Stimulation mit LPS verglichen mit PBS-behandelten Kontrolltieren (B, Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts für 4 Tiere pro Gruppe, * $p < 0,05$ vs. „Unstimuliert“). Nach Behandlung mit Neutrophilen-depletierenden Antikörpern wurden nach oben beschriebener Protokoll mikrovaskuläre Thrombosen ausgelöst und quantifiziert. Diese Ergebnisse wurden mit Tieren verglichen, welche mit Isotyp-Kontrollantikörpern behandelt wurden (# $p < 0,05$ vs. Isotyp-Kontrollantikörper). Die Adhärenz von Leukozyten in Arteriolen wurde in RLOT *In-vivo* Aufnahmen ausgewertet (D, E). Mehrfarbige fluoreszenzmikroskopische *In-vivo* Aufnahmen der mikrovaskulären Thrombusbildung in entzündeten Venolen dienen der Visualisierung von Interaktionen zwischen Thrombozyten (weiß) und neutrophilen Granulozyten (orange) während der Thrombusbildung (F, Zeitangaben oben links, der Pfeil deutet in Flussrichtung, Messbalken $20 \mu\text{m}$). Die Anzahl adhärenter neutrophiler Granulozyten im Verlauf der mikrovaskulären Thrombose wurde fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (G). Die Bedeutung der neutrophilen Granulozyten für die mikrovaskuläre Thrombusbildung in Tieren mit Endotoxämie (durch intraperitoneale LPS-Injektion, „Systemische Entzündung“) wurde anhand des Vergleichs von Neutrophilen-depletierten Tieren mit Tieren, welche mit Isotyp-Kontrollantikörpern behandelt wurden, untersucht. Die Adhärenz neutrophiler Granulozyten in Venolen nach systemischer Stimulation mit LPS wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert und mit Kontrolltieren („Unstimuliert“) verglichen (H, I).

Ergebnisse

In den postkapillären Venolen der unstimulierten Gruppe waren nur sehr wenige, am Endothel adhärenente Leukozyten ($4,4 \pm 1,2 \text{ n}/10^4 \mu\text{m}^2$) nachzuweisen. Im Gegensatz dazu war die Anzahl an adhärenenten Immunzellen in der Gruppe mit lokaler Entzündung ($19,5 \pm 1,1 \text{ n}/10^4 \mu\text{m}^2$) signifikant erhöht (Abbildung 22 A, B). Immunhistochemische Auswertungen haben ergeben, dass über 90% der adhärenenten Zellen Ly6-G-positive neutrophile Granulozyten sind. In Arteriolen hingegen war unter inflammatorischen Bedingungen keine signifikante Adhärenz ($0,4 \pm 0,2 \text{ n}/10^4 \mu\text{m}^2$) von Leukozyten zu beobachten (Abbildung 22 D, E). Um die potentielle Wirkung der adhärenenten Leukozyten auf die mikrovaskuläre Thrombose in postkapillären Venolen im *M. cremaster* unter lokal entzündeten Bedingungen zu untersuchen, wurde eine Depletion der neutrophilen Granulozyten durch Antikörper gegen Ly6-G durchgeführt. Auf diese Weise konnten über 90% der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten eliminiert werden (siehe Tabelle 5, Kapitel V, 2.8). Durch die Depletion der neutrophilen Granulozyten wurde die vorher gezeigte Beschleunigung der Thrombose in entzündeten Venolen wieder vollständig rückgängig gemacht (Abbildung 22 C). Durch *In-vivo*-Fluoreszenzmikroskopie mit Darstellung mehrerer Farben in unterschiedlichen Kanälen wurde die Thrombusbildung in lokal entzündeten Venolen nach Färbung der Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten mit fluoreszierenden Antikörpern visualisiert. Hierbei hat sich gezeigt, dass sich die Thrombozyten bei der Thrombusbildung im entzündeten Gewebe hauptsächlich im Bereich adhärenenter neutrophiler Granulozyten anlagern und dort auf der Blutstrom-abgewandten Seite Aggregate bilden. So entstehen an vielen Stellen im Gefäß kleinere Aggregate, welche im weiteren Verlauf verschmelzen und einen großen Thrombus bilden, der schlussendlich zum Verschluss der Venole führt (Abbildung 22 F). Die Anzahl adhärenenter neutrophiler Granulozyten änderte sich während des Prozesses der mikrovaskulären Thrombusbildung nicht signifikant (Abbildung 22 G). Im Falle der Endotoxämie (durch intraperitoneale LPS Injektion in hoher Dosis) hatte die Depletion der neutrophilen Granulozyten keine Auswirkung auf die beschleunigte mikrovaskuläre Thrombusbildung (Abbildung 22 I). Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit vorher beschriebenen Untersuchungen zur Thrombusbildung in der Mikrozirkulation bei früher Endotoxämie mit Depletion der neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Makrophagen (durch Antikörper gegen GR-1, [138]). Zudem hat sich gezeigt, dass eine intraperitoneale Injektion von LPS mit folgender Endotoxämie

Ergebnisse

in peripheren Geweben wie dem *M. cremaster* nicht zu einer signifikanten Leukozytenrekrutierung führt (Abbildung 22 H).

2.4 Einfluss der inneren Oberflächenstruktur von Kanälen auf die Thrombozytenanlagerung *In-vitro* in der Mikrofluidik

Aufgrund der Beobachtung in den vorher beschriebenen *In-vivo*-Versuchen, dass eine besonders ausgeprägte Thrombozytenanlagerung in der Umgebung neutrophiler Granulozyten und vor allem an ihrer strömungsabgewandten Seite stattfindet, wurden Untersuchungen zum Effekt von Oberflächenveränderungen der Gefäßinnenwand auf den Blutfluss und auf die Rekrutierung von Thrombozyten in einem *In-vitro* Modell durchgeführt. Um die Hypothese der effizienteren Thrombozytenadhäsion durch Veränderungen des Blutflusses im Bereich adhärenter Leukozyten zu überprüfen und zelluläre von physikalischen Effekten differenzieren zu können, wurden Mikrofluidik-Chips entworfen. Diese Mikrofluidikmatrizen aus dem Kunststoffpolymer Polydimethylsiloxan (PDMS) imitieren die Oberflächenstruktur von postkapillären Venolen. Vor den Experimenten wurden die Thrombozyten in murinem Blut mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper angefärbt. Das heparinisierte Blut wurde im Anschluss mit physiologischer Flussgeschwindigkeit und entsprechenden Schergeschwindigkeiten von 1500 s^{-1} durch 4 parallel geschaltete Kanäle mit $40 \text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser und unterschiedlichen Dichten von PDMS-*bump structures* ($8 \text{ }\mu\text{m}$ durchmessende, zylindrische Strukturen in den Kanälen 1-4 mit Dichten von 0, 10, 25 und 50 *bump structures* pro $10^4 \text{ }\mu\text{m}^2$ Kanaloberfläche, welche die adhärenenten Leukozyten in entzündeten Venolen simulieren, Abbildung 23 A, B) geleitet.

Ergebnisse

Adhärenz in Kanälen mit der höchsten *bump structure*-Dichte. In den hochauflösenden Aufnahmen vom Einfangen der Thrombozyten hat sich gezeigt, dass diese meist im zentralen Bereich der *bump structure* adhären (Abbildung 23 D, 4 min) und sich im weiteren Verlauf auf die stromabgewandte Seite bewegen (6,5 min). Außerdem kam es zur Ausbildung von GPIIb/IIIa-positiven membranösen Ausziehungen (sogenannten „*tethers*“), die als Anker der Thrombozyten dienen und ein weiteres „Abseilen“ stromabwärts erlauben (Abbildung 23 E). Auf diese Weise entstanden Thrombozyten-Gruppierungen und weitere Thrombozyten wurden von den bereits gebildeten Thrombozytenansammlungen eingefangen. Außerdem konnten sich Thrombozyten „abseilen“ und an der nächsten, stromabwärts gelegenen *bump structure* adhären (Abbildung 23 D, 13 min). Insgesamt wurde so die Anzahl der wachsenden Mikrothromben erhöht und immer mehr Thrombozyten in das thrombotische Geschehen involviert. Unsere *In-vivo* Beobachtungen haben den Thrombozytenrezeptor GPIIb/IIIa als wichtigsten Rezeptor für die Adhärenz und Aggregation identifiziert (siehe Kapitel V, 2.6). Auch in der Mikrofluidik führte eine Blockade dieses Rezeptors durch GPIIb/IIIa-Fab' Fragmente zu einer fast vollständigen Inhibition der Thrombozytenanlagerung (Abbildung 23 C).

2.5 Theoretische Analysen der Strömungsverhältnisse und Effekte auf die Thrombozytenanlagerung im Bereich eines *bump structure*

Eine Fluidynamik-Simulation wurde verwendet, um die hydrodynamischen Effekte einer *bump structure* auf im Blutstrom frei fließende Thrombozyten zu analysieren. Die Simulation beschreibt annähernd den Fluss einer Flüssigkeit (z. B. Blut), als auch der darin enthaltenen Teilchen (z. B. Thrombozyten) in einem Kanal mit 40 μm Durchmesser bei physiologischen Flussbedingungen (mit einer Schergeschwindigkeit von 1500 s^{-1}). Aufgrund der Ergebnisse vorheriger Studien (siehe Kapitel IV, 4.2.3) und unseren *In-vitro* und *In-vivo* Beobachtungen haben wir postuliert, dass eine Drehbewegung des Thrombozyten diesen in die Nähe der *bump structures* bringt. Um die Simulation zu vereinfachen haben wir uns auf theoretische Physik fokussiert, welche die Drehbewegung korrekt beschreibt. Andere physikalische Faktoren, wie die Braun'sche Molekularbewegung, die Elastizität, oder die Beeinflussung der

Ergebnisse

Thrombozyten durch andere feste Blutbestandteile, haben wir vernachlässigt. Des Weiteren haben wir die Simulation der Dynamik auf einen longitudinalen Schnitt durch den Kanal (2D, 160 x 40 μm) begrenzt.

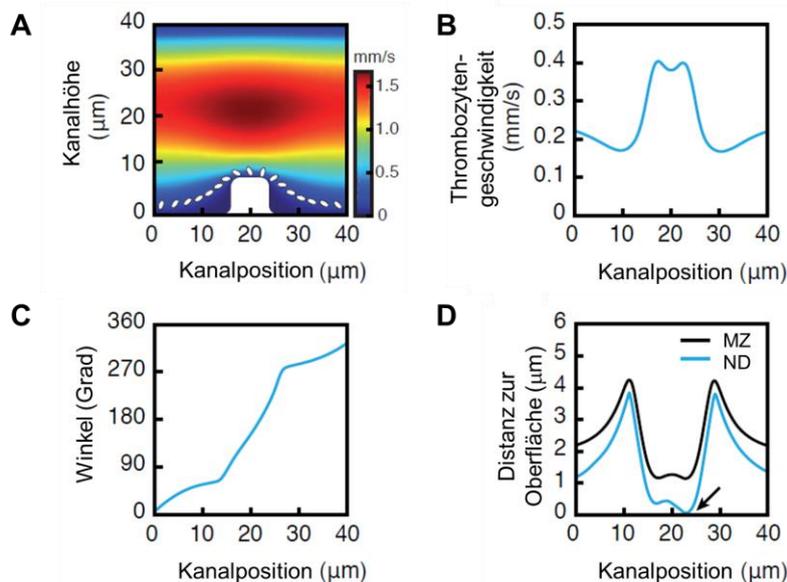


Abbildung 24: Theoretisches Modell der Thrombozytenanlagerung und -adhärenz durch *bump structures*. Das 2D Modell beschreibt den Längsschnitt eines Flusskanals von 40 μm Durchmesser mit einer 8 μm messenden *bump structure* (adhärenter Leukozyt). Ein im Blutstrom befindliches ellipsoides Partikel (Thrombozyt) bewegt sich mit dem Blutstrom über die *bump structure*. Das Geschwindigkeitsprofil ist mit der Farbskala dargestellt (A) und die Bewegung des Ellipsoids über die Struktur kann graphisch nachvollzogen werden (weißes Ellipsoid, welches sich von links nach rechts über die *bump structure* bewegt). Biomolekulare Interaktionen wurden für die Simulation außer Acht gelassen, um die physikalischen Effekte durch die Flussphänomene gesondert betrachten zu können. Die Geschwindigkeit (B) des Ellipsoids und die Änderung des Winkels (C) während der Bewegung sind dargestellt. Die Beschleunigung des Partikels und die Abnahme der Distanz zwischen Partikel- und Kanaloberfläche führen zu erleichterten molekularen Interaktionen zwischen beiden Oberflächen, da sowohl das Massenzentrum („MZ“), als auch das am nächsten kommende Areal des Partikels („ND“, engl. *nearest distance*, dt. kürzester Abstand) während der flippenden Bewegung des Ellipsoids bis auf Bruchteile eines μm an die Kanal- oder *bump structure*-Oberfläche herankommen.

Durch das laminare Strömungsprofil innerhalb eines Kanals wirkt auf die dem Zentrum des Kanals zugewandte Seite des Thrombozyten eine höhere Scherkraft als auf die dem Zentrum abgewandte Seite. Dadurch kommt es zu einer langsamen Drehbewegung des Thrombozyten um seinen Massenschwerpunkt. Wenn der Blutstrom nun auf eine *bump structure* trifft, führt dies zu einer lokalen Flussbeschleunigung (Abbildung 24 A) und der im Fluss befindliche Thrombozyt wird mitgezogen. Diese Beschleunigung führt in unserer Simulation zu einer Bewegung des Massenschwerpunkts des Thrombozyten in Richtung der *bump structure* (Abbildung

Ergebnisse

24 B, D). Aus diesen Kräften resultiert außerdem eine 180° Drehung des Thrombozyten, während sich dieser über die *bump structure* bewegt (Abbildung 24 C, D; türkise Linie). Durch diese Rotationsbewegung wird nicht nur der Massenschwerpunkt, sondern insbesondere ein Teil des Thrombozyten („nächste Distanz ND“, D) in direkten Kontakt mit der Oberfläche der *bump structure* gebracht. Auf diese Weise werden molekulare Bindungen ermöglicht und die Adhäsion des Thrombozyten begünstigt.

2.6 Molekulare Mechanismen der mikrovaskulären Thrombusbildung am Ort der Entzündungsreaktion

Eine Vielzahl an Oberflächenmolekülen und Rezeptoren, welche potentiell an der mikrovaskulären Thrombusbildung im entzündeten Gewebe beteiligten sind, wurden bezüglich ihrer Funktion untersucht. Die Moleküle spielen eine Rolle für Interaktionen zwischen Thrombozyten, Endothelzellen, Leukozyten und Faktoren der plasmatischen Blutgerinnung und sind in der Tabelle 1, Kapitel II, 3.1 näher beschrieben. Um die Phase der Entzündungsentstehung nach intraskrotaler Injektion von LPS (6 Stunden vor Thrombusbildung) nicht zu beeinflussen, wurden die Antikörper oder Inhibitoren erst 10 Minuten vor der phototoxischen Endothelzellaktivierung mit anschließender mikrovaskulärer Thrombusbildung verabreicht. Danach wurde die Thrombusbildung intravitalmikroskopisch aufgenommen und analysiert.

Ergebnisse

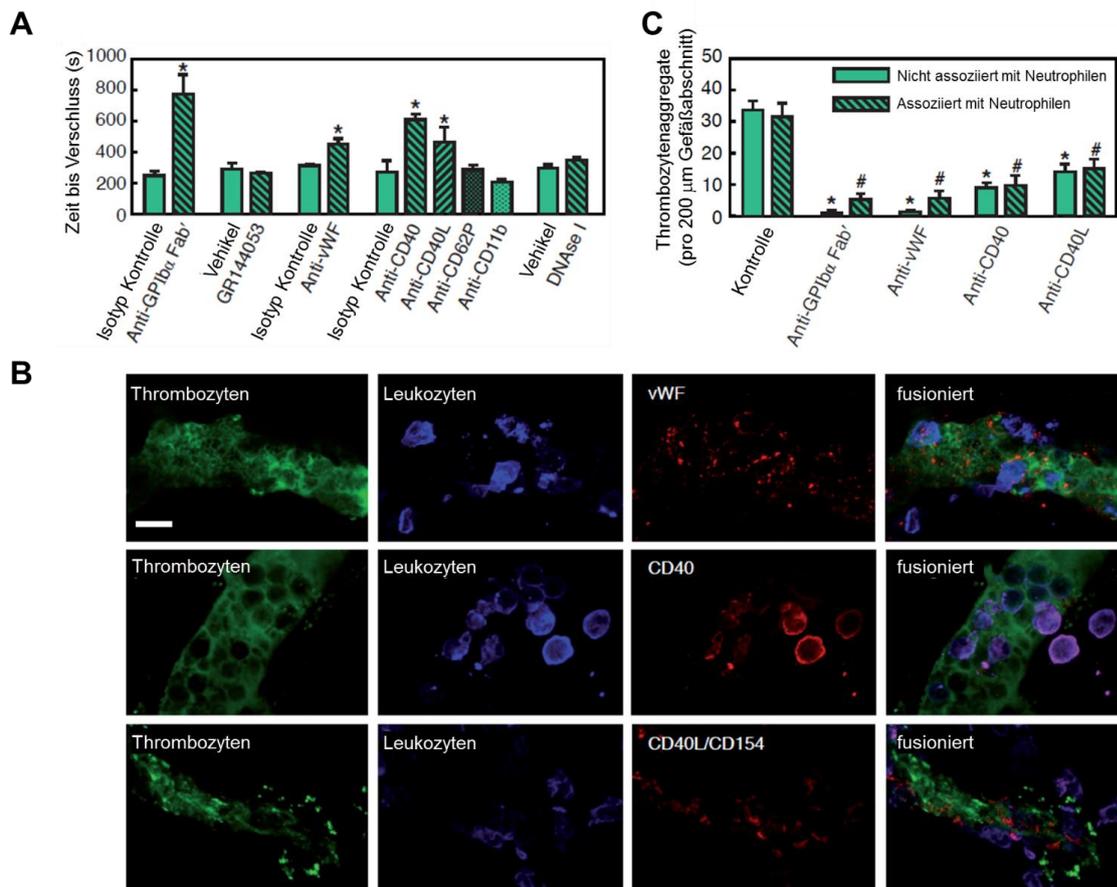


Abbildung 25: Molekulare Mechanismen bei der mikrovaskulären Thrombusbildung im lokal entzündeten Gewebe. Die mikrovaskuläre Thrombusbildung in entzündeten Venolen (6 Stunden nach intraskrotaler LPS Injektion) wurde untersucht. Fünf Minuten vor der phototoxischen Endothelzellaktivierung mit folgender Thrombusbildung wurden blockierende Antikörper gegen GPIIb α , CD40, CD40L/CD154, P-Selektin/CD62P und Mac-1/CD11b verabreicht und die Wirkung auf die mikrovaskuläre Thrombusbildung analysiert (A). Außerdem wurde ein Inhibitor des Thrombozytenrezeptors GPIIb/IIIa verabreicht. Potentiell vorhandene NETs („neutrophil extracellular traps“) wurden mittels DNase I (löst NET Strukturen auf) degradiert. Die jeweiligen Gruppen wurden mit Isotyp-Kontrollantikörpergruppen oder Vehikel Gruppen verglichen (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts für 4 Experimente pro Gruppe, * $p < 0,05$ vs. Vehikel oder Isotyp-Kontrollantikörper). Konfokalmikroskopische Aufnahmen in entzündeten Venolen nach phototoxischer Thrombose wurden angefertigt und eine Färbung von Thrombozyten (GPIIb β , grün), Leukozyten (Ly-6G/C blau) und vWF (1. Zeile, rot) oder CD40 (2. Zeile, rot) oder CD40L (3. Zeile, rot) vorgenommen, um die Verteilung der Moleküle im Thrombus und die genaue Lokalisation zu überprüfen (B, Messbalken 10 μ m). Mittels *In-vivo* Fluoreszenzmikroskopie mit mehreren Farbkanälen wurde die Lokalisation von adhärenenten Thrombozyten während der mikrovaskulären Thrombusbildung in entzündeten Venolen in Relation zu den adhärenenten Leukozyten untersucht. Die Ergebnisse zeigen die Lokalisation in Wildtyp-Tieren, die mit Isotyp-Kontrollantikörpern, Antikörpern gegen GPIIb α , vWF, CD40 und CD40L/CD154 behandelt wurden (C, Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts für 3 Experimente pro Gruppe, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, nicht-assoziiert mit Leukozyten, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, assoziiert mit Leukozyten).

Die Blockade von vWF (450 s \pm 33 s vs. 312 s \pm 6 s) oder des Thrombozytenrezeptors GPIIb α (773 s \pm 109 s) führte zu einer signifikant verlängerten Zeit der

Ergebnisse

Thrombusbildung verglichen mit der Isotyp-Kontrollgruppe (Abbildung 25 A). Dies war nicht der Fall bei Blockade des Thrombozytenrezeptors GPIIb/IIIa. Die Blockade von CD40 und dessen Bindungspartner CD40L/CD154 führte ebenfalls zu einer signifikanten Verlängerung der Zeiten bis zum Gefäßverschluss ($609 \text{ s} \pm 36 \text{ s}$ und $466 \text{ s} \pm 96 \text{ s}$) verglichen mit der Isotyp-Kontrollgruppe ($197 \text{ s} \pm 9 \text{ s}$). Nach Verabreichung von blockierenden Antikörpern gegen P-Selektin/CD62P oder Mac-1/CD11b kam es überraschenderweise nicht zu einer Verlängerung der Zeit bis zum Gefäßverschluss, obwohl in der Literatur mehrfach Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten über diese Rezeptoren beschrieben wurden (siehe Kapitel II, 3.1). Auch die Degradierung von potentiell im entzündeten Gewebe vorhandenen neutrophilen „NET“-Strukturen hatte keinen Effekt auf die mikrovaskuläre Thrombusbildung. Durch konfokalmikroskopische Aufnahmen des *M. cremaster* nach phototoxischer Okklusion von Venolen und Färbung mit Antikörpern gegen vWF, CD40 und CD40L/CD154 konnte die genaue Lokalisation dieser Moleküle im Thrombus und in Relation zu Leukozyten und Thrombozyten visualisiert werden (Abbildung 25 B). Hierbei hat sich gezeigt, dass vWF im gesamten Thrombus wie auch an den Kontaktflächen von Leukozyten und Thrombozyten zu finden ist. CD40 war vor allem auf Leukozyten und Thrombozyten nachweisbar. Dessen Ligand CD40L/CD154 war hauptsächlich auf Thrombozyten lokalisiert. Durch *In-vivo* Färbungen von Thrombozyten und Leukozyten und anschließender Photoaktivierung mit Thrombusbildung in entzündeten Venolen konnte die Bedeutung der Moleküle GPIIb α , vWF, CD40 und CD40L/CD154 für die Lokalisation der adhärenen Thrombozyten in Relation zu Leukozyten untersucht werden. Dabei hat sich ergeben, dass in den ersten beiden Minuten der Thrombusbildung die Thrombozytenadhärenz in den Gruppen, die mit Antikörpern gegen GPIIb α , vWF, CD40 oder CD40L/CD154 behandelt wurden, signifikant verringert war. Dies betraf sowohl die Thrombozytenanlagerung in der unmittelbaren Umgebung von Leukozyten als auch an der freien Wand des Endothels. Dabei war das Verhältnis von Thrombozyten mit direktem Kontakt zu Leukozyten zu frei am Endothel befindlichen Thrombozyten unverändert (Abbildung 25 C).

Ergebnisse

2.7 Einfangen von pathogenen Mikroorganismen durch verstärkte mikrovaskuläre Thrombose

Um die physiologische Relevanz einer beschleunigten und effizienteren mikrovaskulären Thrombusbildung unter inflammatorischen Bedingungen zu untersuchen, wurde analysiert, in wie weit die mikrovaskuläre Thrombose beim Einfangen von pathogenen Mikroorganismen eine Rolle spielt. Hierfür wurden fluoreszierende Mikrosphären oder pathogene Mikroorganismen (*E. coli*) vor der Thrombusbildung in die lokale Mikrozirkulation des *M. cremaster* injiziert.

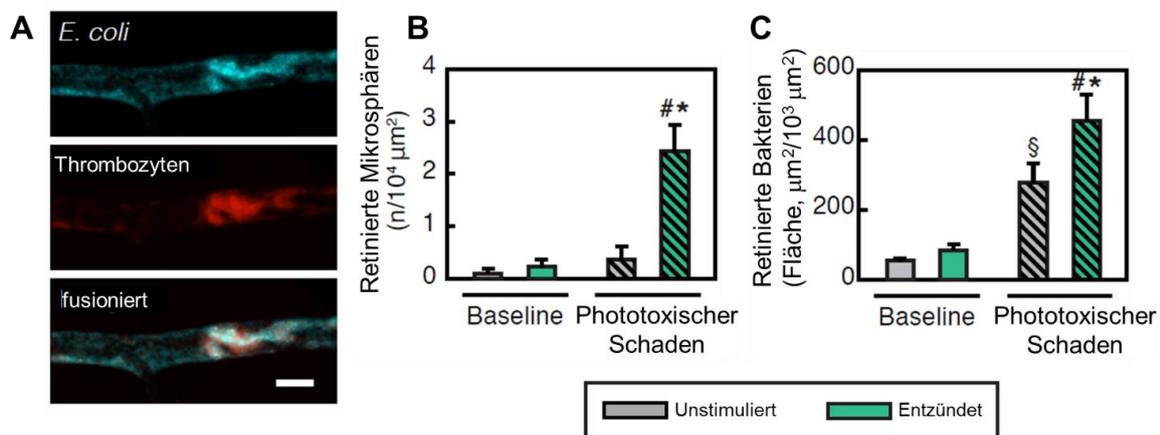


Abbildung 26: Einfangen von pathogenen Mikroorganismen durch Thrombusbildung in der entzündeten Mikrozirkulation. Mehrfarbige fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der phototoxisch induzierten mikrovaskulären Thrombose im entzündeten Gewebe wurden angefertigt. Zehn Minuten vor Induktion der Thrombusbildung wurden fluoreszierende Mikrosphären oder gefärbte *E. coli*-Bakterien injiziert und deren Deposition im Thrombus *In-vivo* beobachtet. Repräsentative Aufnahmen zeigen *E. coli*-Bakterien in türkis und Thrombozyten in rot (A, Messbalken: 40 μm). Die quantitative Auswertung zeigt die Deposition von fluoreszierenden Mikrosphären (B) oder gefärbten *E. coli*-Bakterien (C) vor und nach Thrombusbildung in Venolen unter entzündlichen Bedingungen (6 Stunden nach intraskrotaler LPS Injektion, „Entzündet“) oder in der PBS-behandelten Kontrollgruppe (Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwert für 4 Experimente pro Gruppe, § p<0,05 vs. „Unstimuliert“ vor Thrombusbildung, # p<0,05 vs. „Entzündet“ vor Thrombusbildung, * p<0,05 vs. „Unstimuliert nach Thrombusbildung“).

In der anschließenden *In-vivo*-Fluoreszenzmikroskopie wurden diese Partikel oder Organismen visualisiert und ein freies Durchfließen der Gefäße wurde beobachtet. Eine relevante Deposition der Partikel oder Organismen an der endothelialen Oberfläche war nicht zu sehen. Durch phototoxische Endothelzellaktivierung mit Ausbildung eines mikrovaskulären Thrombus kam es hingegen schnell zu einer signifikanten Retention von Mikrosphären oder *E. coli*-Bakterien im entstehenden Thrombus (Abbildung 26 A). Dieser Effekt war unter inflammatorischen Bedingungen

Ergebnisse

(nach Prästimulation mittels intraskrotaler LPS Injektion 6 Stunden vor der Thrombose) sehr viel stärker ausgebildet (Abbildung 26 B, C) und konnte so einer systemischen Dissemination von Pathogenen durch eine effektive Kompartimentalisierung entgegenwirken.

2.8 Systemische Leukozytenzahlen, mikrohämodynamische Parameter, Fluoreszenzintensität und Effekte der Thrombozyten- und Neutrophilendepletion

Um die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchsgruppen sicherzustellen, wurden die mikrohämodynamischen Parameter wie Blutflussgeschwindigkeiten, Gefäßdurchmesser, Schergeschwindigkeiten und die Fluoreszenzaktivität in den Gefäßabschnitten der Thromboseinduktion gemessen (Tabelle 3). Zwischen den einzelnen Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede. In Gruppen mit Thrombozytendepletion (Tabelle 4) oder Depletion der neutrophilen Granulozyten (Tabelle 5) wurde ein Differentialblutbild erstellt und der Erfolg der Depletion überprüft.

Behandlung	Durchmesser (μm)	Vmean (mm s^{-1})	Scherge- schwindigkeit (s^{-1})	Fluoreszenz- intensität (MFI)
Keine	38.8 \pm 0.7	1.5 \pm 0.1	1490.6 \pm 55.5	2077.0 \pm 123.2
Keine	38.2 \pm 0.7	1.3 \pm 0.1	1348.1 \pm 55.4	2064.9 \pm 103.9
Vehikel	38.6 \pm 0.3	1.4 \pm 0.1	1461.9 \pm 125.5	2063.4 \pm 50.3
Heparin	36.8 \pm 0.5	1.5 \pm 0.1	1575.7 \pm 56.6	2128.3 \pm 40.5
Vehikel	37.9 \pm 0.2	1.4 \pm 0.1	1502.0 \pm 112.8	2044.9 \pm 55.5
Heparin	36.6 \pm 0.6	1.3 \pm 0.1	1425.4 \pm 88.4	1962.5 \pm 39.2
Isotyp	37.4 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1	1792.9 \pm 49.0	1792.9 \pm 49.2

Ergebnisse

Anti-GPIIb α	37.2 \pm 0.6	1.4 \pm 0.1	1454.0 \pm 32.7	1999.8 \pm 68.7
Anti-Ly6G	38.6 \pm 0.7	1.4 \pm 0.1	1386.0 \pm 61.3	1954.3 \pm 52.1
Isotyp	38.4 \pm 0.4	1.6 \pm 0.1	1601.9 \pm 66.1	1930.7 \pm 25.9
Anti-GPIIb α	38.2 \pm 0.3	1.6 \pm 0.1	1633.1 \pm 29.1	1965.6 \pm 52.2
Anti-Ly6G	38.4 \pm 0.2	1.4 \pm 0.1	1426.2 \pm 54.5	1919.3 \pm 38.9
Isotyp	36.0 \pm 0.4	1.4 \pm 0.1	1504.3 \pm 89.7	1985.5 \pm 10.3
Anti-GPIIb α Fab'	35.8 \pm 0.3	1.4 \pm 0.1	1499.6 \pm 96.9	2213.8 \pm 292.0
Vehikel	35.5 \pm 0.4	1.2 \pm 0.1	1388.9 \pm 105.1	1989.3 \pm 43.5
GR144053	36.7 \pm 0.4	1.2 \pm 0.1	1230.3 \pm 117.4	2030.6 \pm 48.5
Isotyp	35.7 \pm 0.6	1.2 \pm 0.1	1299.2 \pm 42.2	1917.30 \pm 18.8
Anti-VWF	36.3 \pm 0.6	1.6 \pm 0.1	1710.9 \pm 103.5	1939.7 \pm 76.5
Isotyp	37.8 \pm 1.0	1.3 \pm 0.2	1310.9 \pm 246.7	2018.6 \pm 114.7
Anti-CD40	42.0 \pm 0.6	1.3 \pm 0.1	1204.0 \pm 45.0	1990.9 \pm 16.6
Anti-CD40L	41.7 \pm 1.0	1.1 \pm 0.1	1036.0 \pm 33.8	1984.2 \pm 10.6
Anti-CD62P	37.3 \pm 0.7	1.4 \pm 0.1	1233.5 \pm 119.0	2037.1 \pm 42.5
Anti-CD11b	35.8 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1	1210.2 \pm 35.6	1896.3 \pm 75.3
Vehikel	36.2 \pm 0.5	1.4 \pm 0.1	1458.6 \pm 64.4	1956.0 \pm 45.8
DNase I	36.3 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	1478.7 \pm 7.4	1954.2 \pm 25.9

Tabelle 3: Hämodynamische Parameter der einzelnen Versuchsgruppen (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts für 4 bis 9 Tiere pro Gruppe).

Ergebnisse

Stimulus	Behandlung	Thrombozyten (x 10 ³ /µl)	Leukozyten (x 10 ³ /µl)
Unstimuliert	Isotyp	730±47	4.97±0.26
Unstimuliert	Anti-GPIIbα	42±11	4.28±0.18
LPS 10 ng i.s.	Isotyp	608±55	5.29±0.56
LPS 10 ng i.s.	Anti-GPIIbα	59±18	4.14±0.99

Tabelle 4: Thrombozytenzahlen nach Depletion im Vergleich zu Isotyp-Kontrollgruppen (Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts für 4 Tiere pro Gruppe).

Stimulus	Behandlung	Leukozyten (x 10 ³ /µl)	Neutrophile (% an Leuko- zyten)	Neutrophile (x 10 ³ /µl)
Unstimuliert	Isotyp	4.97±0.26	25.80±2.00	1.3±0.1
LPS 10 ng i.s.	Isotyp	5.29±0.56	20.80±2.90	1.1±0.1
LPS 10 ng i.s.	Anti-Ly6G	4.20±0.38	2.90±0.41	0.1±0.1
LPS 1 mg i.p.	Isotyp	4.74±1.88	51.1±10.5	2.6±0.1
LPS 1 mg i.p.	Anti-Ly6G	3.11±1.04	9.7±4.2	0.3±0.0

Tabelle 5: Leukozytenzahlen und Anteil der neutrophilen Granulozyten nach Depletion im Vergleich zu Isotyp-Kontrollgruppen (Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts für 4 Tiere pro Gruppe).

VI Diskussion

1 Wissenschaftlicher Hintergrund

1.1 Akute Entzündungsreaktion mit Aktivierung neutrophiler Granulozyten

Die Migration von Leukozyten zum Ort einer Entzündungsreaktion und die dortige Auswanderung aus den Blutgefäßen in das Gewebe sind entscheidenden Schritte der angeborenen Immunabwehr zur Bekämpfung pathogener Mikroorganismen. Diese Vorgänge sollen bedrohliche Infektionen und deren Folgen verhindern [5-8, 156, 157]. Neutrophile Granulozyten sind initial als Kämpfer der „ersten Verteidigungslinie“ die Hauptakteure des Immunsystems [8, 54]. Auch andere Zellpopulationen, wie zum Beispiel inflammatorische Monozyten und Makrophagen, sind in der frühen Phase der Bekämpfung von Krankheitserregern beteiligt, jedoch zahlenmäßig weniger stark vertreten.

Damit Effektorzellen den Weg zum Ort der Entzündungsreaktion finden, müssen chemotaktische Moleküle exprimiert und präsentiert werden. Chemokine spielen als chemotaktisch wirksame Zytokine eine wesentliche Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen ins perivaskuläre Gewebe. Nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft wird angenommen, dass durch die große Anzahl verschiedener Chemokine und Chemokinrezeptoren sowie deren promiskuitives Bindungsverhalten und heterogene Expression auf verschiedenen Zellen, die gezielte Rekrutierung von Leukozyten-Subpopulationen an den Ort einer Entzündungsreaktion gesteuert werden kann [12, 14, 15, 64]. Bisher galt die Annahme, dass CC-Chemokine selektiv auf T-Zellen und Monozyten wirken [10, 12-14] und auf diese Weise die Migration und Aktivierung dieser Zellen beeinflussen. Neuere Studien haben allerdings CC-Chemokine in Zusammenhang mit der Rekrutierung von eosinophilen [15, 16], basophilen [17, 18] und neutrophilen Granulozyten [19-22] ins entzündete Gewebe bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen wie zum Beispiel allergischem Asthma, Atherosklerose, Ischämie-Reperfusion und allergischer Aspergillose gebracht und somit den Aufgabenbereich dieser Chemokine erweitert. Die genauere Wirkweise war hierbei allerdings noch unklar.

1.2 Immunthrombose in der akuten Entzündungsreaktion

Bei der Bekämpfung eindringender pathogener Mikroorganismen in den Organismus spielen zusätzlich zur oben beschriebenen initialen und akuten Entzündungsreaktion auch thrombotische Vorgänge eine wichtige Rolle. Während Pathogene, die bereits in die Blutzirkulation des Organismus gelangt sind, in Leber und Milz aus dem Blut gefiltert werden [32, 69, 158], ist die mikrovaskuläre Thrombusbildung am Ort der akuten Entzündungsreaktion von fundamentaler Bedeutung, um eine systemische Dissemination bereits zu Beginn zu verhindern [30, 33]. Bei diesen frühen Ereignissen der Pathogenbekämpfung kommt es zu Interaktionen des Immunsystems mit Prozessen der Hämostase. Diese Vorgänge werden Immunthrombose genannt und wurden bisher in Arterien, Venen und Lebersinusoiden mit niedrigen vorherrschenden Scherraten untersucht [34, 35, 37, 159, 160]. Die Mikrozirkulation ist jedoch meist Eintrittspforte für pathogene Mikroorganismen und die Mechanismen der Immunthrombose wurden in diesem Bereich des Gefäßbaums unter hohen Scherkräften bislang unzureichend erforscht.

2 Diskussion der verwendeten Methoden

2.1 Wahl des *M. cremaster* Modells für die Untersuchung der mikrovaskulären Entzündungsreaktion *In-vivo*

Um im ersten Teil der Arbeit die akuten Entzündungsreaktionen durch Chemokine als Ausdruck der frühen Phase einer Inflammation und die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung in der Mikrozirkulation zu untersuchen, wurde das Modell der Intravitalmikroskopie am *M. cremaster* der Maus nach Baez et al. [146] gewählt. Zum einen lassen sich hier aufgrund der anatomischen Gegebenheiten ohne größeres Trauma Entzündungsmediatoren (beispielsweise Chemokine durch intraskrotale Injektion) lokal verabreichen. Zum anderen kann bei vorsichtiger Präparation eine hervorragende Bildqualität der intravitalmikroskopischen Aufnahmen erreicht und eine detaillierte Auswertung der Leukozyten-Rekrutierungsschritte vorgenommen werden. Das Gewebe des *M. cremaster* lässt sich leicht von den benachbarten Gewebsstrukturen trennen und der dünne Muskel kann auf einer geeigneten Plattform

aufgespannt und während der gesamten Mikroskopie mit physiologischer warmer Kochsalzlösung superfundiert werden. Mit dieser Technik lassen sich Arteriolen, Venolen, Kapillaren sowie das umgebende Gewebe in hoher Bildqualität darstellen. Prozesse wie Leukozytenrollen, -adhärenz und -transmigration lassen sich direkt visualisieren [112]. Histologische Untersuchungen können mittels immunhistochemischer Färbungen vorgenommen werden und Zell-Transfer-Experimente mit Knochenmarksleukozyten eignen sich zur Differenzierung von endothelialen und leukozytären Effekten auf die Entzündungsreaktion. Mittels Fluoreszenzmikroskopie lassen sich Strukturen *In-vivo* darstellen, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt wurden (zum Beispiel in Form eines Antikörpers mit gebundenem Farbstoff). Andere Modelle, wie zum Beispiel das murine Ohrmodell, eignen sich ebenfalls für intravitalmikroskopische Aufnahmen von entzündetem Gewebe (zum Beispiel durch 2-Photonen-Mikroskopie, [89]), haben jedoch eine geringere zeitliche Auflösung und können deshalb schnell ablaufende Prozesse wie das Rollen von Leukozyten schlechter erfassen.

2.2 Wahl des Zell-Transfers von Knochenmarksleukozyten für die Unterscheidung der Bedeutung leukozytärer und nicht-leukozytärer Chemokinrezeptoren und G-Protein gekoppelter Signalwege

Durch die Verwendung einer Zell-Transfer-Methode konnten leukozytäre von nicht-leukozytären Auswirkungen der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 sowie der Pertussis-sensitiven G-Protein gekoppelten Signalwege unterschieden werden. Diese Methode ist bereits mehrfach erfolgreich angewandt worden [147, 161]. Hierfür werden Knochenmarksleukozyten von Wildtyp-Mäusen, *Ccr1^{-/-}*- oder *Ccr5^{-/-}*-Knockout-Mäusen gewonnen, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschließend Empfänger-mäusen verabreicht. Durch den identischen genetischen Hintergrund der Mäuse unterscheiden sich die verabreichten Zellen nur im entsprechenden Knockout-Gen oder durch eine Vorbehandlung mit einem Inhibitor. Die Knochenmarkszellen bestehen zu über 90% aus neutrophilen Granulozyten. Nach Stimulation mit dem Chemokin CCL3 können anschließend das Leukozytenrollen, die Adhärenz am Endothel und die Rekrutierung ins perivaskuläre Gewebe fluoreszenzmikroskopisch

Diskussion

untersucht werden. Diese Methode eignet sich sehr gut, um leukozytäre von nicht-leukozytären Auswirkungen der entsprechenden Chemokinrezeptoren oder Signalkaskaden zu unterscheiden. Eine Immunsuppression tritt hierbei nicht auf. Im Gegensatz dazu wird bei einem alternativen Verfahren, der Erstellung von Chimären durch Knochenmarkstransplantation, das Immunsystem zunächst supprimiert, indem die Empfängertiere mit einer letalen Strahlendosis behandelt werden. Somit werden alle Zellen des Knochenmarks und damit auch der größte Teil der Immunzellen zerstört [162]. Im Anschluss werden die Mäuse mit Spenderleukozyten behandelt. Hierbei ist eine prophylaktische Antibiotikagabe notwendig, um den immungeschwächten Organismus vor ungewollten Infektionen zu schützen. Durch die Bestrahlung entstehen weitere Auswirkungen auf den Organismus, wie zum Beispiel Entzündungen der Schleimhäute, entzündliche Veränderungen der Lunge bis hin zum Schock [163]. Dadurch können Verfälschungen bei der Untersuchung der Chemokinvermittelten Inflammation entstehen.

2.3 Wahl der phototoxischen Endothelzellaktivierung im *M. cremaster* zur Untersuchung der mikrovaskulären Thrombose im entzündeten Gewebe *In-vivo*

Zur Untersuchung des Einflusses akuter Entzündungsreaktionen auf die mikrovaskuläre Thrombusbildung im lokal entzündeten Gewebe wurde das Modell der phototoxischen Endothelzellaktivierung mit folgender Thrombose im *M. cremaster* gewählt. Das Modell erlaubt die Untersuchung der Thrombusbildung in Echtzeit mit detaillierter fluoreszenzmikroskopischer Beobachtung der Prozesse. Durch Injektion eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Zuckermoleküls (Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-Dextran) und anschließender Bestrahlung mit Licht des Anregungsspektrums des Fluorophors (mit einer Wellenlänge von 488 nm) wird im belichteten Areal ein phototoxischer Schaden des Gefäßendothels hervorgerufen, welcher zu einer gut reproduzierbaren Thrombose führt [164, 165]. Indem die Parameter wie Fluoreszenz-Aktivität, Lichtintensität, Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeiten konstant gehalten wurden, konnten mit dieser Methode stabile Messwerte erhoben und die Thrombose auf diese Weise quantitativ (Dauer bis zum ersten Auftreten von Thrombusanteilen am Endothel bzw. Dauer bis zum

Diskussion

kompletten Gefäßverschluss) ausgewertet werden. Durch Anfärben von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern konnten Interaktionen dieser Zellen mit hoher Auflösung visualisiert werden. In den meisten bisher publizierten Studien, welche sich der mikrovaskulären Thrombose gewidmet haben, wurde die Thrombusbildung unter systemisch-inflammatorischen Bedingungen untersucht [136-138, 166]. Ziel dieser Arbeit war es jedoch, die Mechanismen der mikrovaskulären Thrombose direkt am Ort der Entzündungsentstehung zu analysieren. Durch die Möglichkeit der Prästimulation des Gewebes durch eine intraskrotale Injektion von Entzündungsmediatoren (zum Beispiel LPS) und spätere Auslösung einer mikrovaskulären Thrombose eignet sich dieses Modell sehr gut für diese Zwecke. Im Gegensatz zur Thrombose durch Eisenchlorid [129] oder mechanischen Denudation des Endothels [167] kommt es bei der phototoxischen Reaktion nicht zu einer starken Schädigung des Endothels mit Freilegung subendothelialer Strukturen, sondern lediglich zu einer Endothelzellaktivierung [164]. Somit sind Wechselwirkungen zwischen subendothelialen Kollagenfasern und Thrombozytenrezeptoren zu vernachlässigen. Ein ähnlicher Thrombosemechanismus wird durch eine Laser-Aktivierung des Endothels hervorgerufen [168], denn auch hier werden keine subendothelialen Strukturen exponiert. Die tiefe Venenthrombose durch partielle Ligatur der *Vena cava inferior* ist ein weiteres, etabliertes Modell für die Untersuchung der Thrombusbildung *In-vivo*. Dieses analysiert jedoch die Thrombusbildung in einem großen Gefäß mit langsamen Fluss. Die dort vorzufindenden Scherkräfte an den Gefäßwänden sind um ein Vielfaches geringer als in der Mikrozirkulation und die Thrombose geschieht hauptsächlich durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade mittels freigelegtem *tissue factor*. Außerdem finden hier NET-Strukturen besseren Halt und tragen zur Blutgerinnung bei [34-38]. Die hochauflösende Mikroskopie der thrombotischen Vorgänge in diesen Systemen ist bisher nicht mit sehr hoher zeitlicher Auflösung durchführbar.

Zusammenfassend ist das Modell der Thrombusbildung durch phototoxische Endothelzellaktivierung zur Untersuchung immunthrombotischer Vorgänge im lokal entzündeten Gewebe sehr gut geeignet und bildet die physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge am besten ab. Durch die Echtzeit-Visualisierung

Diskussion

können schnell ablaufende Prozesse untersucht und deren Mechanismen abgebildet werden.

2.4 Benutzung von PDMS-Mikrofluidiken für *In-vitro*-Versuche der Thrombozytenadhärenz und Aggregation

Aufgrund der beobachteten Phänomene in den *In-vivo*-Experimenten hat sich die Hypothese ergeben, dass rheologische Effekte von adhärenenten neutrophilen Granulozyten maßgeblich an der verstärkten mikrovaskulären Thrombusbildung im lokal entzündeten Gewebe beteiligt sind. Um diese Beobachtung zu überprüfen, wurden Mikrofluidik-Chips aus PDMS-Kunststoff mit 4 parallel geschalteten Kanälen gebaut. Diese Kanäle mit einem Durchmesser von 40 μm und unterschiedlicher Dichte an *bump structures*, welche adhärenente Leukozyten imitieren, wurden mit heparinisiertem Mausblut bei physiologischen Schergeschwindigkeiten von 1500 s^{-1} (wie in der untersuchten Mikrozirkulation *In-vivo*) perfundiert und die Thrombozytenadhärenz und Aggregation visualisiert und quantifiziert. Durch diese maßstabsgetreue Simulation konnten physikalische von biologischen Effekten differenziert und analysiert werden und somit hydrodynamische Beobachtungen gemacht werden. In einer anschließenden Computersimulation konnten die physikalischen Gegebenheiten näherungsweise berechnet werden. Diese theoretischen Berechnungen basieren auf den zuvor in der Fluidik beobachteten Prozessen. Es handelt sich also um ein theoretisches Modell, das zum tieferen Verständnis der *In-vivo*-Vorgänge beiträgt, indem es auch physikalische Effekte integriert.

2.5 Benutzung der Konfokalmikroskopie zur Untersuchung der Lokalisation von Oberflächenmolekülen auf den Zellen im Thrombus

Um die Lokalisation der bei der Thrombusbildung beteiligten Moleküle (von-Willebrand-Faktor, CD40, CD40L) zu analysieren, wurde die Konfokalmikroskopie gewählt. Der Vorteil besteht darin, dass nach einer phototoxisch-induzierten Thrombose die entstandenen Thromben mit allen involvierten Zellen, wie beispielsweise Endothelzellen, Thrombozyten und Leukozyten, angefärbt und

Diskussion

untersucht werden können. So können die involvierten Oberflächenrezeptoren mit präziser örtlicher Auflösung dargestellt und in Zusammenschau mit den *In-vivo* Untersuchungen Rückschlüsse auf deren Interaktionen gezogen werden. Im Gegensatz zu durchflusszytometrischen Untersuchungen der Oberflächenmoleküle von einzelnen Zellen wird die physiologische Umgebung der Zellen bewahrt. Nur die tatsächlich in die Vorgänge eingebundenen zellulären Strukturen werden analysiert und nicht alle Leukozyten oder Thrombozyten des Tieres.

3 Diskussion der Ergebnisse

3.1 CC-Chemokin-vermittelte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten

Der erste Teil der Untersuchungsergebnisse befasst sich mit der Bedeutung des CC-Chemokins CCL3 und dessen Rezeptoren CCR1 und CCR5 für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ins Gewebe im Rahmen der frühen mikrovaskulären Entzündungsreaktion. Das Chemokin CCL3 führte in unseren Untersuchungen zu einer starken mikrovaskulären Entzündung mit intravaskulärer Adhärenz und anschließender Transmigration von neutrophilen Granulozyten in die perivaskuläre Umgebung. Mittels *Ccr1*^{-/-}- und *Ccr5*^{-/-}-Knockout-Mäusen konnten wir feststellen, dass die Entzündungsreaktion von beiden Rezeptoren abhängig ist. Diese Ergebnisse ergänzen vorangegangene Studien, welche gezeigt haben, dass die Blockade oder das Fehlen der Chemokinrezeptoren CCR1 oder CCR5 in unterschiedlichen Situationen zu abgeschwächten Entzündungsreaktionen mit signifikant geringerer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an den Ort des entzündlichen Geschehens verbunden ist. So hatte sich in einer Studie unserer Forschungsgruppe gezeigt, dass die Leukozyteninfiltration ins Gewebe des *M. cremaster* nach Ischämie und anschließender Reperfusion in CCR1- und CCR5-defizienten Mäusen signifikant verringert ist [20]. Auch für die Infiltration der Lunge durch neutrophile Granulozyten nach Ischämie-Reperfusionsschaden hat sich das Chemokin CCL3 als verantwortlicher Entzündungsmediator erwiesen [21]. Die Rekrutierung von Leukozyten ins Gewebe der Niere nach Ischämie-Reperfusion ist CCR1 abhängig [169]. Die genauen Wirkmechanismen und die beteiligten

Diskussion

Signaltransduktionsmoleküle und -kaskaden sind hierbei jedoch nicht ausreichend untersucht worden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Bindung von CC-Chemokinen an leukozytäre Chemokinrezeptoren zu schnellen Veränderungen der Konformation von Integrinen auf der Zelloberfläche führt und so umgehend das Rollen und die Adhärenz von Leukozyten am Endothel hervorrufen kann [12-14, 170].

Durch die Expression von CCR1 und CCR5 auf verschiedenen nicht-leukozytären Zellen des Organismus, wie auch zum Beispiel auf Endothelzellen [171] und Mastzellen [28, 29], stellt sich die Frage, ob leukozytär exprimierte Rezeptoren oder nicht-leukozytär exprimierte Rezeptoren für die entzündlichen Vorgänge verantwortlich sind. Die Bindung von CCL3 an nicht-leukozytäre Chemokinrezeptoren führt primär zur Generierung und Sezernierung von weiteren chemotaktischen Molekülen, welche wiederum auf Leukozyten wirken [172, 173]. Durch die Anwendung einer Zell-Transfer-Technik mit dem Transfer von Knochenmarksleukozyten aus Wildtyp-, Ccr1^{-/-}- und Ccr5^{-/-}-Knockout-Mäusen in Wildtyp-, Ccr1^{-/-}- und Ccr5^{-/-}-Knockout-Mäuse konnten wir feststellen, dass für die entzündliche Reaktion im *M. cremaster* nach Stimulation mit CCL3 sowohl CCR1-Rezeptoren auf Leukozyten als auch nicht-leukozytäre CCR5-Rezeptoren verantwortlich sind. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, welche nicht-leukozytären Zellen beteiligt sind und auf welche Weise die Zellen zur Entzündungsreaktion beitragen. Hierbei sind mehrere Szenarien denkbar. Es ist beispielsweise bekannt, dass der Rezeptor CCR2 auf Endothelzellen exprimiert wird und an inflammatorischen Reaktionen beteiligt ist [174]. Auch nach Stimulation mit CCL3 könnten Endothelzellen über den Chemokinrezeptor CCR5 aktiviert werden und zur lokalen Produktion und Sekretion von weiteren Entzündungsmediatoren (wie beispielsweise weitere Chemokine, Zytokine wie TNF, IL- β etc.) angeregt werden. Zudem könnte die Wirkung von CCL3 auf Endothelzellen direkt eine Expression von Selektinen und Adhäsionsmolekülen der Immunoglobulin-Superfamilie hervorrufen. Mastzellen sind im perivaskulären Gewebe des *M. cremaster* vertreten und können nach Aktivierung Immunreaktionen bewirken. Sie exprimieren CC-Chemokin-Rezeptoren. In Entzündungsreaktionen, wie zum Beispiel allergischen Reaktionen, spielt die Interaktion von Chemokinen mit den entsprechenden Rezeptoren auf Mastzellen eine wichtige Rolle [175]. Die Aktivierung von Mastzellen durch CCL3 könnte zur Degranulierung und Ausschüttung von Lipidmediatoren beitragen, welche

Diskussion

wiederum Leukozyten aktivieren können. Perizyten umgeben die Endothelzellen entlang der Mikrozirkulation und können durch parakrine Effekte auf das Endothel immunologische Reaktionen hervorrufen. Diese Zellen tragen Chemokinrezeptoren und können durch Chemokine beeinflusst werden [176]. Durch CCL3 könnten Perizyten aktiviert werden und durch die Produktion weiterer Entzündungsmediatoren die entzündliche Reaktion potenzieren. Diese oben beschriebenen, nicht-leukozytären Wirkungen von Chemokinen bieten einen Erklärungsansatz für unsere Beobachtung, dass die CCL3 induzierte Rekrutierung von Wildtyp-Leukozyten in CCR5^{-/-}-Tieren signifikant verringert ist. Andererseits hat sich auch gezeigt, dass CCR1^{-/-}-Leukozyten nach Stimulation mit CCL3 nicht ins perivaskuläre Gewebe rekrutiert werden. Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass CCR1 auf Leukozyten und CCR5 auf residenten Zellen für die CCL3-abhängige Entzündungsreaktion mit Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im *M. cremaster* verantwortlich sind.

Die beim Prozess der Entzündungsentstehung durch CCL3 involvierten Signalkaskaden und molekularen Interaktionen sind bislang nicht ausreichend untersucht worden. Es ist bekannt, dass viele Chemokinrezeptoren nach Bindung des entsprechenden Liganden über G α i-Proteine [12-14] und folgender Aktivierung der PI3-Kinase (insbesondere der γ -Isoform, [40]) Signale in die rezeptortragenden Zellen übertragen. In diesem Kontext hat sich ergeben, dass CCL3-abhängige Entzündungsmechanismen Pertussis-sensitive G α i-Proteine und eine weitere Aktivierung der PI3-Kinase γ (nicht jedoch der Isoform δ) benötigen. Interessanterweise wurde die durch PAF oder CXCL1 ausgelöste Entzündungsreaktion durch die Blockade von G α i-Proteinen nur teilweise und nicht vollständig blockiert. Auch die Blockade der PI3-Kinase hatte unterschiedliche Auswirkungen. Im Falle der CXCL1-ausgelösten Entzündung hatte die Blockade der PI3-Kinase keinen signifikanten Effekt auf die Entzündungsreaktion, sodass hier andere Signalkaskaden involviert sein müssen. Die PAF-induzierte Entzündungsreaktion wurde signifikant durch die Blockade aller PI3-Kinase Isoformen, nicht jedoch durch eine selektive Blockade der Isoformen γ oder δ gehemmt. Hier könnten andere Isoformen der PI3-Kinase (bspw. die PI3-Kinase α oder β) involviert sein, die auch unabhängig von G-Proteinen aktiviert werden können [177, 178]. Diese Ergebnisse zeigen, dass verschiedene Chemokine und chemotaktische Moleküle zum Teil über unterschiedliche Rezeptoren und Signaltransduktionsmoleküle auf die

Diskussion

rezeptortragenden Zellen wirken. Es gibt jedoch auch Gemeinsamkeiten in der Signaltransduktion, da zum Beispiel die Familie der PI3-Kinasen sowohl für die CCL3- als auch für die PAF-abhängige Entzündungsreaktion von essentieller Bedeutung sind. Die folgende Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das perivaskuläre Gewebe ist von Adhäsionsmolekülen und Integrinen abhängig. Hierbei hat sich gezeigt, dass insbesondere die β 2-Integrine Mac-1/CD11b und LFA-1/CD11a und ihr Rezeptor ICAM-1/CD54 für die Adhärenz und Transmigration der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit CCL3, aber auch nach Stimulation mit PAF oder CXCL1 benötigt werden. Unerwarteterweise hat sich gezeigt, dass α 4-Integrine (das α 4 β 1 Integrin VLA-4/CD49d und α 4 β 7 Integrin), welche hauptsächlich auf Lymphozyten und deutlich geringer auf neutrophilen Granulozyten exprimiert werden, sowohl in der von CCL3 als auch in der von PAF oder CXCL1 ausgelösten Entzündungsreaktion mit folgender Rekrutierung der Immunzellen ins Gewebe eine wichtige Rolle spielen. Auch der Bindungspartner VCAM-1/CD106 hat sich als wichtiges Molekül für diese entzündlichen Vorgänge erwiesen. In experimentellen Studien mit Fokus auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ins Gewebe im Rahmen von Vaskulitiden in den Nierenglomerula [179], der chemischen Peritonitis [180] und bei der Infiltration von Myokardgewebe nach Ischämie-Reperfusion [181] hat sich ein vergleichbarer Effekt der α 4-Integrine und des Rezeptors VCAM-1/CD106 auf die Entzündungsreaktion herausgestellt. Somit könnte die Rolle dieser Moleküle für die Neutrophilen-abhängige Inflammation bislang unterschätzt worden sein.

Nach der Adhärenz müssen die Leukozyten durch die Gefäßwand transmigrieren, um in das umliegende Gewebe zu gelangen. Man unterscheidet zwei mögliche Arten der Transmigration: eine parazelluläre Transmigration im Bereich der Endothelzellkontakte und eine transzelluläre Transmigration durch die Endothelzellen hindurch. Die parazelluläre Transmigration mit Öffnung der Endothelzellkontakte und dem Hindurchtreten der Leukozyten zwischen benachbarten Endothelzellen ist in den meisten Gewebearten (eine Ausnahme stellt zum Beispiel die Lymphozyteneinwanderung in Lymphknoten dar, [182]) dominierend und eine Stabilisierung der Endothelzellkontakte durch genetische Modifikationen des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes führt zu einer starken Blockade der Auswanderung von Leukozyten ins Gewebe der Haut, des *M. cremaster* und der Lunge [183]. In unserer Untersuchung transmigrierten sowohl in der CCL3- als auch in der CXCL1- oder PAF-

Diskussion

abhängigen Inflammation über 90% der Leukozyten an den Endothelzellkontakten ins Gewebe. Diese Ergebnisse lassen darauf rückschließen, dass die Zellen für ihre Auswanderung aus den Gefäßen primär die parazelluläre Transmigrationsroute wählen. Hierbei sind im Falle der CCL3-induzierten Rekrutierung die Moleküle PECAM-1/CD31 und ICAM-2/CD102 selektiv für die Transmigration verantwortlich. Im CXCL1-abhängigen Rekrutierungsprozess ist PECAM-1/CD31 bereits für die Adhärenz von Leukozyten von Bedeutung, während ICAM-2/CD102 nach der Stimulation mit PAF keine größere Bedeutung zeigte. ICAM-2/CD102 war sogar in beiden Fällen (Stimulation mit CXCL1 oder PAF) für die Leukozytentransmigration irrelevant. Diese Daten zeigen, dass unterschiedliche Stimuli über verschiedene Moleküle die Transmigration von Leukozyten ins perivaskuläre Gewebe bewirken können. Auch in anderen experimentellen Studien konnte demonstriert werden, dass PECAM-1/CD31 und ICAM-2/CD102 für die Leukozytentransmigration nach Stimulation mit IL-1 β , nicht jedoch mit TNF, von Bedeutung sind [161].

Diese Stimulus-spezifischen Mechanismen könnten aus mehreren Gründen vorliegen: die jeweiligen Entzündungsmediatoren könnten auf unterschiedliche Zellen wirken. So könnte eine stärkere Wirkung auf ortsansässige Zellen (beispielsweise Endothelzellen, Perizyten, Mastzellen etc.) primär zur Generation von Lipidmediatoren oder anderen Zytokinen führen, welche dann wiederum über weitere Rezeptorinteraktionen auf die Leukozyten wirken und somit deren Adhärenz und Transmigration bedingen. Eine direkte Wirkung der Entzündungsmediatoren auf Leukozyten könnte hingegen über andere molekulare Mechanismen mit Signaltransduktion ins Innere der Zellen und anschließender Aktivierung von Integrinen („*inside-out-signaling*“, zum Beispiel nach Chemokin-Rezeptor Wechselwirkungen [5]) zur sofortigen Adhärenz und Transmigration der Zellen beitragen. Insgesamt ergibt sich so eine Vielfalt an Möglichkeiten für Rekrutierungsmechanismen von Leukozyten ins perivaskuläre Gewebe, welche die Stimulus-spezifischen Unterschiede bei der Leukozytenrekrutierung erklären könnten. Festzuhalten bleibt, dass sowohl die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch das CC Chemokin CCL3 als auch durch die klassischen Entzündungsmediatoren CXCL1 und PAF ins umliegende Gewebe durch gemeinsame aber auch unterschiedliche Mechanismen erfolgt [184].

3.2 Mechanismen der neutrophilen Granulozyten-abhängigen Immunthrombose im akut entzündeten Gewebe und Einfangen von pathogenen Mikroorganismen

Der zweite Teil der Untersuchungen greift die oben beschriebenen Mechanismen der akuten Entzündungsreaktion auf und befasst sich mit den Vorgängen der mikrovaskulären Thrombusbildung im entzündeten Gewebe. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die Interaktionen zwischen neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten gelegt und der physiologische Nutzen einer gesteigerten Thrombusbildung am Ort der Entzündung, an welchem pathogene Mikroorganismen in den Organismus eindringen, untersucht.

In Experimenten mit Thrombozyten-depletierten Tieren oder nach Vollantikoagulation mit Heparin konnten wir zeigen, dass Thrombozyten die Hauptakteure der mikrovaskulären Thrombose in der Mikrozirkulation des *M. cremaster* unter hohen Schergeschwindigkeiten ($> 1500 \text{ s}^{-1}$) sind und die Fibrin-abhängige plasmatische Gerinnung in diesem Kontext eine vernachlässigbare Rolle spielt. Diese Befunde ergänzen experimentelle Studienergebnisse der mikrovaskulären Thrombusbildung unter systemisch-inflammatorischen Bedingungen [138] und stehen in deutlichem Kontrast zu Prozessen der Immunthrombose in größeren Arterien und Venen sowie Lebersinusoiden [30, 34, 35, 160], Gefäßen in denen deutlich niedrigere Scherkräfte vorzufinden sind. In diesen Gefäßen mit niedrigen Schergeschwindigkeiten spielt die plasmatische Gerinnung eine essentielle Rolle bei der Ausbildung eines Thrombus. So ist beispielsweise aus der Literatur bekannt, dass bei der tiefen Venenthrombose der extrinsische Weg der plasmatischen Blutgerinnung durch den Gewebefaktor („*tissue factor*“ (TF)) aus Leukozyten aktiviert wird und auf diese Weise zur Ausbildung eines Fibrinthrombus führt [34]. Auch in der *A. carotis* von Mäusen hat sich gezeigt, dass Serinproteasen, Elastase und extrazelluläre Nukleosomen aus neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Immunthrombose zu einer Aktivierung der plasmatischen Gerinnung über Gewebefaktor und Faktor XII führen und zeitgleich ein Abbau von Gewebefaktor durch den Gewebefaktor-Inhibitor („*tissue factor pathway inhibitor*“ (TFPI)) verhindern [160]. Somit unterscheidet sich die Thrombusbildung in diesen Gefäßen mit niedrigen Scherkräften maßgeblich von den Prozessen der

Diskussion

Thrombose in der Mikrozirkulation, welche einen Bereich des Gefäßbaums darstellt, wo hohe Scherkräfte bei geringen Gefäßdurchmessern wirken.

Interessanterweise haben wir im *M. cremaster* die Haupteffekte einer lokalen Entzündung auf die mikrovaskuläre Thrombose in den Venolen festgestellt, in welchen thrombotische Prozesse drastisch gesteigert ablaufen, während in Arteriolen keine signifikanten Effekte zu sehen sind. Durch genaue Untersuchungen dieser Vorgänge mit fluoreszenzmarkierten Thrombozyten hat sich gezeigt, dass in unstimulierten Gefäßen die Thrombusbildung zunächst in den Kapillaren und kleinsten Venolen beginnt und sich erst im Verlauf in größere Venolen fortsetzt. In direktem Kontrast dazu ist die Thrombusbildung in der entzündeten Mikrozirkulation sofort auch in größeren Venolen zu beobachten. Hierbei adhären und aggregieren die Thrombozyten an multiplen Bereichen des Gefäßendothels. Die mikrovaskuläre Thrombusbildung wird auf diese Weise effizient gesteigert. Diese Ergebnisse könnten auch zur Erklärung beitragen, warum entzündliche Erkrankungen als eigenständige Risikofaktoren für thromboembolische Erkrankungen gelten [185, 186].

Hervorzuheben ist, dass die meisten eindringenden Pathogene, wie zum Beispiel Bakterien, über die Schleimhaut der Harnwege, der Lunge oder über Hautverletzungen in den Organismus gelangen. In diesen Bereichen können Bakterien über die Mikrogefäße ihren Weg in die Zirkulation finden und so zu einer systemischen Entzündung im Sinne einer Sepsis mit bakteriellen Streuherden führen. Aus diesen Gründen erscheint es biologisch sinnvoll, dass die mikrovaskuläre Thrombusbildung im Rahmen einer Entzündungsreaktion im Bereich der drainierenden Venolen verstärkt abläuft. So kann eine bakterielle Streuung bereits bei Entzündungsbeginn verhindert werden.

Mechanismen der Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten, ins entzündete Gewebe wurden in den Untersuchungen zur Chemokin-induzierten Inflammation genau untersucht und sind Schlüsselereignisse einer Entzündungsreaktion. Dabei entsteht die Entzündung primär in den postkapillären Venolen, an deren Endothel Leukozyten rollen, adhären und ins umliegende Gewebe transmigrieren. In diesen Gefäßen wurde auch die gesteigerte mikrovaskuläre Thrombusbildung unter entzündlichen Bedingungen festgestellt. Diese Koinzidenz lässt die Hypothese zu, dass adhärente neutrophile Granulozyten an den Mechanismen der gesteigerten mikrovaskulären Thrombose beteiligt sind. Tatsächlich

Diskussion

verhindert eine Depletion der neutrophilen Granulozyten durch eine massive Abschwächung der lokalen Entzündungsreaktion nach LPS-Injektion die gesteigerte mikrovaskuläre Thrombusbildung vollständig. Diese Ergebnisse dokumentieren, dass neutrophile Granulozyten unerlässlich sind für immunthrombotische Vorgänge in der Mikrozirkulation und als Hauptakteure zur gesteigerten Thrombose in den Venolen beitragen. Untersuchungen mit verschiedenfarblich markierten Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten haben in diesem Kontext gezeigt, dass sich Thrombozyten verstärkt in Bereichen hinter adhärenenten neutrophilen Granulozyten anlagern, dort aggregieren und von diesen zahlreichen Herden ausgehend Thromben bilden. Diese konfluieren im weiteren Verlauf und größere, okkludierende Thromben bilden sich daraus. Im Gegensatz dazu ist bei systemischer Entzündung mit Endotoxämie keine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in peripheren Geweben (wie beispielsweise dem *M. cremaster*) zu beobachten. Dennoch ist die mikrovaskuläre Thrombose über andere Mechanismen beschleunigt. In diesem Fall kommt es nicht zu einer signifikanten Verlangsamung der mikrovaskulären Thrombusbildung im *M. cremaster* nach Depletion der neutrophilen Granulozyten. Für diese Beobachtung gibt es mehrere Erklärungen: Zum einen ist unter systemisch-inflammatorischen Bedingungen kein signifikanter Anstieg von adhärenenten und transmigrierten Leukozyten in den postkapillären Venolen des *M. cremaster* zu finden, sodass sich die Gegebenheiten in der Mikrozirkulation am Ort der Thrombusbildung deutlich unterscheiden. Zum anderen hat sich in experimentellen Studien gezeigt, dass TLR-4-abhängige und neutrophilen Granulozyten-unabhängige Mechanismen unter diesen Voraussetzungen entscheidende Bedeutung haben [138].

Unsere Daten, welche eine durch neutrophile Granulozyten verursachte, gesteigerte Thrombusbildung in entzündeten Venolen zeigen, tragen zur Erklärung bei, weshalb eine Neutropenie vor überschießender Thrombusbildung in der zerebralen Mikrozirkulation von Mäusen im experimentellen Sichelzell-Modell (mit assoziierter Ansammlung von neutrophilen Granulozyten in Mikrogefäßen) schützt [187].

Die physikalisch-rheologischen Einflüsse der Inflammation auf die mikrovaskuläre Thrombose wurde in unserer Arbeit zudem genau untersucht. Studien mit Experimenten zur Thrombozytenanlagerung in Mikrofluidik-Chips haben gezeigt, dass für die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten die vorherrschenden Scherkräfte eine entscheidende Rolle spielen und dass verschiedene Rezeptoren (bspw.

Diskussion

GPIb α /V/IX und GPIIb/IIIa), je nach Ausmaß der auf die Thrombozyten wirkenden Scherkräfte, mehr oder weniger für die Adhäsion von Bedeutung sind [128, 130, 188, 189]. Unsere *In-vivo*-Beobachtungen waren richtungsweisend für die Hypothese, dass intravaskulär adhärente neutrophile Granulozyten durch Änderungen der Scherkräfte im Bereich der Gefäßoberfläche in der Mikrozirkulation eine Thrombozytenadhäsion begünstigen könnten. Um die hydrodynamischen Gegebenheiten in postkapillären Venolen mit adhärenenten neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, haben wir Mikrofluidik-Chips entworfen, die Flusskanäle mit 40 μm Durchmesser parallel angeordnet haben und verschiedene Dichten an *bump structures* (als Korrelat für adhärente Leukozyten) auf der Oberfläche aufweisen. Diese Strukturen von 8 μm Höhe simulieren adhärente neutrophile Granulozyten und lassen auf diese Weise eine Beurteilung der rheologischen Auswirkung der adhärenenten Zellen auf die Rekrutierung von Thrombozyten zu. Nach Perfusion der Kanäle mit Mausblut unter physiologischen Bedingungen (mit Schergeschwindigkeiten von 1500 s^{-1}) hat sich gezeigt, dass die Thrombozytenadhäsion in Kanälen mit *bump structures* hoch signifikant verstärkt ist mit bis zu 100-facher Steigerung der Thrombozytenadhärenz und -aggregation in Kanälen mit der höchsten Dichte an *bump structures*. In unseren fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen hat sich hierbei gezeigt, dass Thrombozyten meist in der zentralen Region einer *bump structure* adhäreren und auf die Blutfluss-abgewandte Seite gelangen. In einigen Fällen bilden die Thrombozyten membranöse Ausziehungen (sogenannte „*tethers*“), welche an der *bump structure* verankert sind und ein „Abseilen“ des Thrombozyten mit dem Blutstrom mit potentieller Adhärenz an weiteren, stromabwärts gelegenen *bump structures* erlaubt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen haben gezeigt, dass von-Willebrand-Faktor an die PDMS-Kunststoff-Oberfläche bindet und die Plättchenadhäsion (analog zur *In-vivo*-Thrombusbildung in der Mikrozirkulation) GPIb α - und vWF-abhängig verläuft. Nach Blockade von GPIb α war die Thrombozytenadhärenz in den Mikrofluidiken aufgehoben. Eine Ausbildung von vWF-Filamenten war in der Fluidik nicht zu beobachten, am ehesten bedingt durch eine schnellen Spaltung von vWF durch die vWF-spaltende Protease ADAMTS13 im Blutplasma [190].

Diese Ergebnisse im Bereich der Mikrozirkulation mit Flussgeschwindigkeiten und Scherkräften analog zu entzündeten Venolen sind neu. Durch unsere Untersuchungen wird die Situation in entzündeten Venolen der peripheren Mikrozirkulation

Diskussion

widergespiegelt und somit ein pathophysiologischer Mechanismus der Immunthrombose aufgezeigt. In der Literatur ist in den vergangenen Jahren die Thrombozytenaggregation im Bereich von Gefäßstenosen beschrieben und mit Mikrofluidiken untersucht worden. Im Gegensatz zu unseren Experimenten sind die *In-vivo*-Untersuchungen in Arteriolen gemacht und eine einzelne Stenose in diesen Gefäßen untersucht worden. Zudem war die Vorwölbung der Stenose ins Gefäßlumen verhältnismäßig viel höher (bis zu 90% Stenose) als unsere *bump structures*. Auch in diesen Untersuchungen hat sich eine Beeinflussung der Thrombozytenanlagerung durch Scherkräfte gezeigt und GPIIb/IIIa wurde als primärer Rezeptor für die Thrombozytenadhäsion identifiziert [188]. Somit ergänzen unsere Ergebnisse diese Arbeiten.

Hydrodynamische Simulationen der physikalischen Flussverhältnisse in den Kanälen haben ergeben, dass die auf Thrombozyten wirkenden Kräfte in Anwesenheit von *bump structures* eine Annäherung von Thrombozyten an die Oberfläche der Kanäle begünstigt. Dieser Effekt wird maßgeblich durch die Flussbeschleunigung im Bereich der *bump structures* mit verstärkter Auslösung einer Rotationsbewegung von Thrombozyten in der Nähe der *bump structures* hervorgerufen. Auf diese Weise kommt die Thrombozytenoberfläche in Kontakt mit den *bump-structures* oder der angrenzenden Kanalwand und molekulare Bindungen können über vWF und GPIIb/IIIa entstehen, welche eine Thrombozytenadhäsion erlauben.

Um diese molekularen Mechanismen der mikrovaskulären Thrombusbildung in der lokal entzündeten Mikrozirkulation besser zu verstehen, wurden systematisch die potentiell beteiligten Moleküle kurz vor der Thrombusbildung blockiert und die Auswirkung auf die Thrombose untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die mikrovaskuläre Thrombusbildung in entzündeten Venolen von GPIIb/IIIa- und vWF-Interaktionen getragen werden und unabhängig von GPIIb/IIIa verlaufen. Die Blockade des β 2-Integrin Mac-1/CD11b oder P-Selektin/CD62P, welche potentiell zu Interaktionen zwischen neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten führen [134, 137, 191-194], hatte überraschenderweise keine Auswirkung auf die Thrombusbildung in unseren Untersuchungen.

Auch CD40- und CD40L/CD154-Interaktionen hatten in experimentellen Studien signifikante Effekte auf die mikrovaskuläre Thrombose gezeigt [195]. Die mikrovaskuläre Thrombusbildung unter Endotoxämie war in der oben genannten

Diskussion

Studie in CD40^{-/-}-und CD40L^{-/-}-Knockout-Tieren deutlich abgeschwächt im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, vor allem in zerebralen Arteriolen.

In unseren konfokal-mikroskopischen Analysen mit Anfärbung dieser Moleküle hat sich gezeigt, dass CD40 auf Leukozyten und Thrombozyten und CD40L hauptsächlich auf Thrombozyten in mikrovaskulären Thromben der entzündeten Venolen vorzufinden sind. Unsere quantitativen Daten nach Blockade von CD40 und CD40L zeigen, dass diese Moleküle einen signifikanten Einfluss auf die mikrovaskuläre Thrombose haben, jedoch von deutlich geringer Bedeutung sind als Interaktionen zwischen GPIIb/IIIa und vWF. Diese Ergebnisse ergänzen vorangegangene Untersuchungen und unterstreichen die Bedeutung von CD40 und CD40L für die mikrovaskuläre Thrombusbildung unter entzündlichen Bedingungen.

In aktuellen Studien wurde vielfach die Bildung von NET-Strukturen durch neutrophile Granulozyten als entscheidender Mechanismus der intravaskulären Pathogenbekämpfung [42, 69, 71, 159] beschrieben und die starke prothrombotische Wirkung dieser Strukturen [34-36] gezeigt. In Hautentzündungen durch grampositive Bakterien hat sich gezeigt, dass neutrophile Granulozyten in kurzer Zeit NET-Strukturen ausschütten können [42]. Dadurch können Bakterien (wie zum Beispiel Staphylokokken) eingefangen und effizient eliminiert werden. Während einer schweren Sepsis akkumulieren neutrophile Granulozyten in den Sinusoiden der Leber und bilden dort NET-Strukturen aus, welche Bakterien einfangen und deren Beseitigung fördern. Interaktionen von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten sind hierbei verantwortlich für die NET-Bildung in diesen Gefäßen [69]. Untersuchungen zur tiefen Venenthrombose haben bestätigt, dass NET-Strukturen aus neutrophilen Granulozyten zu einer Aktivierung von Faktor XII führen und so die plasmatische Blutgerinnung aktivieren. Eine Interaktion von Thrombozyten mit neutrophilen Granulozyten über GPIIb/IIIa verstärkt die NET-Bildung und Aktivierung des Faktor XII [34]. Auch Experimente zur tiefen Venenthrombose in Pavianen haben gezeigt, dass NETs die Fibrin-Ablagerung fördern und maßgeblich zur Entstehung eines roten Thrombus beitragen [35].

Überraschenderweise hatte in unseren Experimenten eine Degradierung von NET-Strukturen mittels DNAse-I sowie mit Heparin keine Auswirkung auf die mikrovaskuläre Thrombose in entzündeten Venolen. Dieses Ergebnis könnte mit der mechanischen Instabilität von NET-Strukturen unter hohen, in der Mikrozirkulation vorherrschenden

Diskussion

Scherkräften zusammenhängen [196], denn in den bisher beschriebenen Studien hat sich der Effekt von NETs auf die Thrombusbildung ausschließlich in Gefäßen mit niedrigen Scherkräften gezeigt.

Zuletzt wird die physiologische Bedeutung der verstärkten Thrombose in der entzündeten Mikrozirkulation betrachtet. Die mikrovaskuläre Thrombusbildung am Ort der Entzündungsreaktion könnte ein entscheidender Faktor zur Verhinderung der systemischen Dissemination von pathogenen Mikroorganismen sein. Durch Gefäßverschlüsse noch vor dem Eindringen von pathogenen Organismen in die systemische Zirkulation kann eine Eingrenzung der Krankheitserreger erreicht und auf diese Weise die septische Streuung verhindert werden. Dieser Vorgang könnte ein Basis-Abwehrmechanismus des Körpers sein, um jegliche Streuung von Krankheitserregern vom Ort der Entzündung in den Kreislauf zu unterbinden. Um zu überprüfen, ob pathogene Mikroorganismen in entstehenden Thromben gefangen werden können, haben wir fluoreszenzmarkierte *E. coli*-Bakterien in die lokale Mikrozirkulation des *M. cremaster* injiziert und deren Deposition in Thromben quantitativ ausgewertet. Diese ist im lokal entzündeten Gefäßbett unter Anwesenheit von adhärenenten neutrophilen Granulozyten signifikant erhöht verglichen mit der Deposition von *E. coli*-Bakterien in Thromben, welche in unstimulierten Venolen entstehen. Zusammenfassend lässt sich durch unsere Ergebnisse die Hypothese generieren, dass das Einfangen von eindringenden Pathogenen durch Mechanismen der Immunthrombose, welche durch neutrophile Granulozyten vermittelt werden, effizient gesteigert ist und auf diese Weise eine systemische Dissemination mit der Folge einer oft lebensbedrohlichen Sepsis verhindert werden kann.

Kardiovaskuläre Erkrankungen mit Thrombenbildung in Gefäßen gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Die Thrombenbildung in größeren Gefäßen, wie beispielsweise in Koronararterien [197] oder hirnversorgenden Arterien [198, 199], kann oftmals durch interventionelle Behandlungsverfahren therapiert werden. Im Gegensatz dazu sind mikrovaskuläre Angiopathien für interventionelle Verfahren nicht zugänglich. Diese Arbeit zeigt die Bedeutung von neutrophilen Granulozyten im Kontext der mikrovaskulären Thrombusbildung im entzündeten Gewebe. Somit sollten in Zukunft pharmakologische Therapien zur Behandlung mikrovaskulärer Angiopathien die neutrophilen Granulozyten als Zielzellen mitberücksichtigen. Die Bedeutung dieser Zellen in mikroangiopathischen Pathologien sollte in Zukunft weiter

Diskussion

erforscht werden, um die Bedeutung immunthrombotischer Prozesse besser zu verstehen und neue Behandlungsstrategien zu entwickeln.

VII Zusammenfassung

Eine Entzündung ist eine Reaktion des Organismus auf eine Organ- oder Gewebeschädigung. Die Schädigung kann in Form von mechanischer, chemischer oder physikalischer Verletzung sowie durch krankheitserregende Mikroorganismen hervorgerufen werden. Die Kardinalsymptome dieser Reaktion (Rötung „*rubor*“, Überwärmung „*calor*“, Schwellung „*tumor*“, Schmerz „*dolor*“ und beeinträchtigte Funktion des betroffenen Körperteils „*functio laesa*“) sind bereits in der Antike beschrieben worden. Entzündungsreaktionen mit dem Ziel der Bekämpfung von Krankheitserregern sind von besonderer Bedeutung für das Überleben eines Individuums.

Mit wachsendem Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge einer Entzündung sind chemotaktische Moleküle und deren Wirkung auf Immunzellen in den Fokus vieler Untersuchungen gerückt. In dieser Arbeit wurde die Entstehung einer Entzündungsreaktion durch chemotaktisch wirkende Zytokine (Chemokine) mit den beteiligten Molekülen und Signalkaskaden genau untersucht. Außerdem spielen thrombotische Prozesse im entzündeten Gewebe eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Krankheitserregern. Dieser Prozess wird Immunthrombose genannt und beschreibt die eng verwobenen Mechanismen der Hämostase und Entzündungsreaktion. In diesem Kontext haben wir die mikrovaskuläre Thrombusbildung im entzündeten Gewebe analysiert und die Interaktionen von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten untersucht.

Zusammenfassend haben unsere *In-vivo*-Daten gezeigt, dass das Chemokin CCL3 über die Chemokinrezeptoren CCR1 (auf Leukozyten) und CCR5 (auf nicht-leukozytären Zellen) zur intravaskulären Adhärenz und folgenden parazellulären Transmigration von neutrophilen Granulozyten ins perivaskuläre Gewebe führt. Dieser Prozess erfordert die Beteiligung von Pertussis-sensitiven G_{α_i} -Proteinen und der PI3-Kinase γ . Im Gegensatz dazu hat sich gezeigt, dass die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ins Gewebe durch das Chemokin CXCL1 und den Lipidmediator PAF nur partiell von G-Proteinen abhängig ist. Die Blockade der G-Proteine führte hier nur zu einem partiellen Rückgang der Adhärenz und transendothelialen Migration von Leukozyten. Auch die Blockade der PI3-Kinase zeigte unterschiedliche Ergebnisse: die Blockade der PI3-Kinase γ und aller Isoformen führte nach Stimulation mit CXCL1

Zusammenfassung

zu einer partiellen Verringerung der Adhärenz, die Transmigration ins Gewebe wurde nicht inhibiert. Nach Stimulation mit PAF wurde die Adhärenz und Transmigration durch die Blockade aller PI3-Kinase-Isoformen teilweise verringert. Die Blockade der Isoformen γ und δ hatte dagegen keinen Effekt auf die Rekrutierung von Leukozyten in das entzündete Gewebe. Nach Stimulation mit dem Chemokin CCL3 sind die Adhäsionsmoleküle ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 sowie deren Bindungspartner Mac-1/CD11b, LFA-1/CD11a und α 4-Integrine für die folgende Adhärenz der neutrophilen Granulozyten unerlässlich. Auch nach Stimulation mit CXCL1 oder PAF sind diese Moleküle für die Rekrutierung von Leukozyten ins entzündete Gewebe essentiell. Nach Stimulation mit CCL3 ist die Transmigration von PECAM-1/CD31 und ICAM-2/CD102 abhängig und verläuft über parazelluläre Transmigrationswege (Abbildung 27). Nach Stimulation mit PAF oder CXCL1 sind PECAM-1/CD31 und ICAM-2/CD102 nicht selektiv für die Transmigration bedeutsam, sondern zeigen lediglich geringe Einflüsse auf die Adhärenz von Leukozyten.

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Wirkung des Chemokins CCL3 auf neutrophile Granulozyten Gemeinsamkeiten in der Signaltransduktion und den beteiligten Oberflächenmolekülen zu den klassischen Entzündungsmediatoren wie CXCL1 oder PAF aufweist, jedoch auch erhebliche Unterschiede in den involvierten Molekülen bestehen.

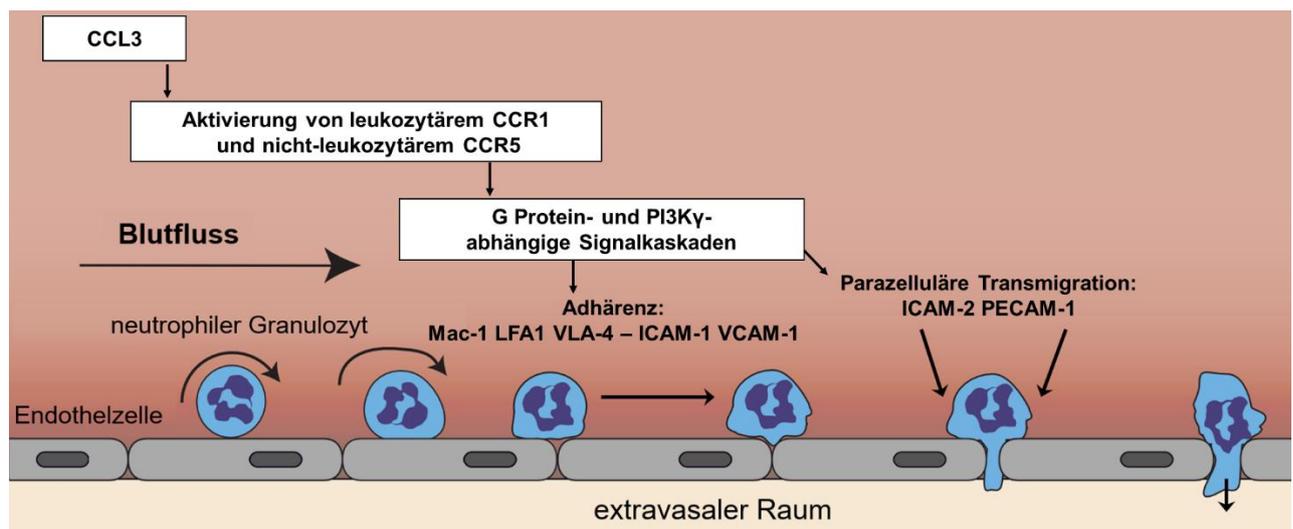


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Mechanismen der CCL3-abhängigen Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das perivaskuläre Gewebe.

VIII Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS13	vWF-spaltende Protease (<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
Ccr1-/-	Homozygoter Ccr1-Knockout
Ccr5-/-	Homozygoter Ccr5-Knockout
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
DAMP	Molekül, welches bei Schäden auftritt (<i>damage associated molecular pattern</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESAM	Endotheliales zellselektives Adhäsionsmolekül (<i>endothelial cell-selective adhesion molecule</i>)
ESL	E-Selektin-Ligand
Fab'	Bindender Teil eines IgG Antikörpers (<i>Fragment antigen binding</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GDP	Guanosindiphosphat
GPIb α /V/IX	Glykoprotein Ib α /V/IX
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIa/IIIb
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HPF	Haupt Gesichtsfeld (<i>high-power field</i>)
i.a.	intra-arteriell
i.p.	intraperitoneal

Abkürzungsverzeichnis

i.s.	intraskrotal
i.v.	intravenös
ICAM	interzelluläres Zelladhäsionsmolekül (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
IL-1 β	Interleukin-1 β
I.E.	internationale Einheiten
IVM	Intravitalmikroskopie
JAM	junktionales Adhäsionsmolekül (<i>junctional adhesion molecule</i>)
LAD	Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-Erkrankungen (<i>Leukocyte adhesion deficiency</i>)
LFA	Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen (<i>leukocyte function associated molecule</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
LY96	Lymphozytenantigen 96
<i>M. cremaster</i>	<i>Musculus cremaster</i>
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
Mac	Makrophagen-Antigen (<i>macrophage antigen</i>)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
NA	numerische Apertur
NADPH	Nicotinamindadenindinukleotidphosphat
ND	kürzester Abstand (<i>nearest distance</i>)
NET	neutrophile Granulozyten Netz-Struktur (<i>neutrophil extracellular trap</i>)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor (<i>platelet activating factor</i>)

Abkürzungsverzeichnis

PAMP	Pathogen-assoziierte Moleküle (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDMS	Polydimethylsiloxan-Kunststoff
PECAM	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PSGL	P-Selektin Glykoprotein Ligand (<i>p-selectin glykoprotein ligand</i>)
PTx	Pertussistoxin
RLOT	Mikroskopietechnik mit schräg reflektiertem Licht (<i>reflected light oblique transillumination</i>)
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of mean</i>)
Src-Kinase	Sarkom-Kinase
TFPI	Inhibitor des Gewebefaktors (<i>tissue factor pathway inhibitor</i>)
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (<i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VLA	$\alpha 4\beta 1$ -Integrin (<i>very late antigen</i>)
Vmean	mittlere Geschwindigkeit
Vcenterline	Geschwindigkeit in der Gefäßmitte
vWF	von-Willebrand-Faktor
WBC	Leukozytenzahl (<i>white blood cell count</i>)
WT	Wildtyp

Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

IX Literaturverzeichnis

1. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 801-10.
2. Martin, G.S., et al., *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000*. N Engl J Med, 2003. **348**(16): p. 1546-54.
3. Engel, C., et al., *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Med, 2007. **33**(4): p. 606-18.
4. Fleischmann, C., et al., *Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis*. Dtsch Arztebl Int, 2016. **113**(10): p. 159-66.
5. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
6. Nourshargh, S., P.L. Hordijk, and M. Sixt, *Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 366-78.
7. Phillipson, M. and P. Kubes, *The neutrophil in vascular inflammation*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1381-90.
8. Nauseef, W.M. and N. Borregaard, *Neutrophils at work*. Nat Immunol, 2014. **15**(7): p. 602-11.
9. Weber, M., et al., *Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients*. Science, 2013. **339**(6117): p. 328-32.
10. Bromley, S.K., T.R. Mempel, and A.D. Luster, *Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 970-80.
11. Thelen, M. and J.V. Stein, *How chemokines invite leukocytes to dance*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 953-9.
12. Viola, A. and A.D. Luster, *Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008. **48**: p. 171-97.
13. Rot, A. and U.H. von Andrian, *Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 891-928.
14. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 610-21.

Literaturverzeichnis

15. Lukacs, N.W., et al., *Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation*. J Immunol, 1997. **158**(9): p. 4398-404.
16. Rot, A., et al., *RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1489-95.
17. Iikura, M., et al., *Transendothelial migration of human basophils*. J Immunol, 2004. **173**(8): p. 5189-95.
18. Heinemann, A., et al., *Basophil responses to chemokines are regulated by both sequential and cooperative receptor signaling*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 7224-33.
19. Drechsler, M., et al., *Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis*. Circulation, 2010. **122**(18): p. 1837-45.
20. Reichel, C.A., et al., *Chemokine receptors Ccr1, Ccr2, and Ccr5 mediate neutrophil migration to postischemic tissue*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(1): p. 114-22.
21. Krishnadasan, B., et al., *Beta-chemokine function in experimental lung ischemia-reperfusion injury*. Ann Thorac Surg, 2004. **77**(3): p. 1056-62.
22. Standiford, T.J., et al., *Macrophage inflammatory protein-1 alpha mediates lung leukocyte recruitment, lung capillary leak, and early mortality in murine endotoxemia*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1515-24.
23. Cheng, S.S., et al., *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor up-regulates CCR1 in human neutrophils*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 1178-84.
24. Ottonello, L., et al., *CCL3 (MIP-1alpha) induces in vitro migration of GM-CSF-primed human neutrophils via CCR5-dependent activation of ERK 1/2*. Cell Signal, 2005. **17**(3): p. 355-63.
25. Johnston, B., et al., *Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1269-76.
26. Hartl, D., et al., *Infiltrated neutrophils acquire novel chemokine receptor expression and chemokine responsiveness in chronic inflammatory lung diseases*. J Immunol, 2008. **181**(11): p. 8053-67.

Literaturverzeichnis

27. Speyer, C.L., et al., *Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis*. Am J Pathol, 2004. **165**(6): p. 2187-96.
28. Alam, R., et al., *Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo*. J Immunol, 1994. **152**(3): p. 1298-303.
29. Oliveira, S.H. and N.W. Lukacs, *Stem cell factor and igE-stimulated murine mast cells produce chemokines (CCL2, CCL17, CCL22) and express chemokine receptors*. Inflamm Res, 2001. **50**(3): p. 168-74.
30. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2012.
31. Jenne, C.N. and P. Kubes, *Platelets in inflammation and infection*. Platelets, 2015. **26**(4): p. 286-92.
32. Clark, S.R., et al., *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nat Med, 2007. **13**(4): p. 463-9.
33. Pfeiler, S., S. Massberg, and B. Engelmann, *Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis*. Thromb Res, 2014. **133 Suppl 1**: p. S35-7.
34. von Bruhl, M.L., et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 819-35.
35. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(36): p. 15880-5.
36. Fuchs, T.A., A. Brill, and D.D. Wagner, *Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(8): p. 1777-83.
37. Martinod, K., et al., *Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(21): p. 8674-9.
38. Martinod, K. and D.D. Wagner, *Thrombosis: tangled up in NETs*. Blood, 2014. **123**(18): p. 2768-76.
39. Wagner, D.D., *New links between inflammation and thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(7): p. 1321-4.

40. Liu, L., et al., *Leukocyte PI3Kgamma and PI3Kdelta have temporally distinct roles for leukocyte recruitment in vivo*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1191-8.
41. Petri, B., M. Phillipson, and P. Kubes, *The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6439-46.
42. Yipp, B.G., et al., *Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo*. Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1386-93.
43. Abtin, A., et al., *Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection*. Nat Immunol, 2014. **15**(1): p. 45-53.
44. Halle, S., et al., *In Vivo Killing Capacity of Cytotoxic T Cells Is Limited and Involves Dynamic Interactions and T Cell Cooperativity*. Immunity, 2016. **44**(2): p. 233-45.
45. Hickman, H.D., et al., *CXCR3 chemokine receptor enables local CD8(+) T cell migration for the destruction of virus-infected cells*. Immunity, 2015. **42**(3): p. 524-37.
46. Rubin-Bejerano, I., et al., *Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(1): p. 55-67.
47. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
48. Uribe-Querol, E. and C. Rosales, *Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 983698.
49. Tecchio, C., et al., *On the cytokines produced by human neutrophils in tumors*. Semin Cancer Biol, 2013. **23**(3): p. 159-70.
50. Granot, Z., et al., *Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung*. Cancer Cell, 2011. **20**(3): p. 300-14.
51. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
52. McDonald, B., et al., *Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation*. Science, 2010. **330**(6002): p. 362-6.
53. Imhof, B.A. and M. Aurrand-Lions, *Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 432-44.
54. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 657-70.

Literaturverzeichnis

55. Hickey, M.J. and P. Kubes, *Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 364-75.
56. Metcalf, D., *Hematopoietic cytokines*. Blood, 2008. **111**(2): p. 485-91.
57. Jiao, J., et al., *Central role of conventional dendritic cells in regulation of bone marrow release and survival of neutrophils*. J Immunol, 2014. **192**(7): p. 3374-82.
58. Semerad, C.L., et al., *G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 413-23.
59. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2010. **116**(4): p. 625-7.
60. von Vietinghoff, S. and K. Ley, *Homeostatic regulation of blood neutrophil counts*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5183-8.
61. Furze, R.C. and S.M. Rankin, *The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse*. FASEB J, 2008. **22**(9): p. 3111-9.
62. Uhl, B., et al., *Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response*. Blood, 2016.
63. Middleton, J., et al., *Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells*. Cell, 1997. **91**(3): p. 385-95.
64. De Filippo, K., et al., *Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation*. Blood, 2013. **121**(24): p. 4930-7.
65. Briheim, G., et al., *Exudate polymorphonuclear leukocytes isolated from skin chambers are primed for enhanced response to subsequent stimulation with chemoattractant f-Met-Leu-Phe and C3-opsonized yeast particles*. Inflammation, 1988. **12**(2): p. 141-52.
66. Kuhns, D.B. and J.I. Gallin, *Increased cell-associated IL-8 in human exudative and A23187-treated peripheral blood neutrophils*. J Immunol, 1995. **154**(12): p. 6556-62.
67. Hirche, T.O., et al., *Myeloperoxidase plays critical roles in killing Klebsiella pneumoniae and inactivating neutrophil elastase: effects on host defense*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1557-65.

Literaturverzeichnis

68. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3007-17.
69. McDonald, B., et al., *Intravascular Neutrophil Extracellular Traps Capture Bacteria from the Bloodstream during Sepsis*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(3): p. 324-33.
70. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
71. Pilsczek, F.H., et al., *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7413-25.
72. Bow, E.J., *Infection in neutropenic patients with cancer*. Crit Care Clin, 2013. **29**(3): p. 411-41.
73. White, L. and M. Ybarra, *Neutropenic fever*. Emerg Med Clin North Am, 2014. **32**(3): p. 549-61.
74. Tsou, C.L., et al., *Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites*. J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 902-9.
75. Yang, J., et al., *Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases*. Biomark Res, 2014. **2**(1): p. 1.
76. Pamer, E.G., *Immune responses to Listeria monocytogenes*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 812-23.
77. Lauvau, G., P. Loke, and T.M. Hohl, *Monocyte-mediated defense against bacteria, fungi, and parasites*. Semin Immunol, 2015. **27**(6): p. 397-409.
78. Robben, P.M., et al., *Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis*. J Exp Med, 2005. **201**(11): p. 1761-9.
79. Auffray, C., et al., *Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior*. Science, 2007. **317**(5838): p. 666-70.
80. Galli, S.J., M. Tsai, and A.M. Piliponsky, *The development of allergic inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 445-54.
81. Gounni, A.S., et al., *High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites*. Nature, 1994. **367**(6459): p. 183-6.

82. Vaglio, A., C. Buzio, and J. Zwerina, *Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss): state of the art*. Allergy, 2013. **68**(3): p. 261-73.
83. Rezaizadeh, H., et al., *Acute eosinophilic myocarditis: diagnosis and treatment*. Acute Card Care, 2010. **12**(1): p. 31-6.
84. Pennock, N.D., et al., *T cell responses: naive to memory and everything in between*. Adv Physiol Educ, 2013. **37**(4): p. 273-83.
85. Klein, L., et al., *Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 377-91.
86. LeBien, T.W. and T.F. Tedder, *B lymphocytes: how they develop and function*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1570-80.
87. Cooper, M.D., *The early history of B cells*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 191-7.
88. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. Blood, 2008. **112**(3): p. 461-9.
89. Stark, K., et al., *Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs*. Nat Immunol, 2012.
90. Davies, L.C., et al., *Tissue-resident macrophages*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 986-95.
91. Weninger, W., et al., *Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 665-76.
92. Willeke, T., et al., *A role for Syk-kinase in the control of the binding cycle of the beta2 integrins (CD11/CD18) in human polymorphonuclear neutrophils*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(2): p. 260-9.
93. Weckbach, L.T., et al., *The cytokine midkine supports neutrophil trafficking during acute inflammation by promoting adhesion via beta2 integrins (CD11/CD18)*. Blood, 2014. **123**(12): p. 1887-96.
94. Sundd, P., M.K. Pospieszalska, and K. Ley, *Neutrophil rolling at high shear: flattening, catch bond behavior, tethers and slings*. Mol Immunol, 2013. **55**(1): p. 59-69.
95. Sundd, P., et al., *'Slings' enable neutrophil rolling at high shear*. Nature, 2012. **488**(7411): p. 399-403.

Literaturverzeichnis

96. Woodfin, A., et al., *The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 761-9.
97. Wessel, F., et al., *Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin*. Nat Immunol, 2014. **15**(3): p. 223-30.
98. Mamdouh, Z., A. Mikhailov, and W.A. Muller, *Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment*. J Exp Med, 2009. **206**(12): p. 2795-808.
99. Kishimoto, T.K., et al., *Heterogeneous mutations in the beta subunit common to the LFA-1, Mac-1, and p150,95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency*. Cell, 1987. **50**(2): p. 193-202.
100. van Vliet, D.N., A.E. Brandsma, and N.G. Hartwig, *[Leukocyte-adhesion deficiency: a rare disorder of inflammation]*. Ned Tijdschr Geneesk, 2004. **148**(50): p. 2496-500.
101. Campa, C.C., et al., *Rac signal adaptation controls neutrophil mobilization from the bone marrow*. Sci Signal, 2016. **9**(459): p. ra124.
102. Kufareva, I., *Chemokines and their receptors: insights from molecular modeling and crystallography*. Curr Opin Pharmacol, 2016. **30**: p. 27-37.
103. Zarbock, A., et al., *Galpha2 is required for chemokine-induced neutrophil arrest*. Blood, 2007. **110**(10): p. 3773-9.
104. Sayeed, H.M., et al., *The role of CCR1 and therapeutic effects of anti-CCL3 antibody in herpes simplex virus-induced Behcet's disease mouse model*. Immunology, 2019. **158**(3): p. 206-218.
105. Rossato, C., et al., *Early Peritoneal CC Chemokine Production Correlates with Divergent Inflammatory Phenotypes and Susceptibility to Experimental Arthritis in Mice*. J Immunol Res, 2019. **2019**: p. 2641098.
106. Diab, A., et al., *Neutralization of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and MIP-1alpha attenuates neutrophil recruitment in the central nervous system during experimental bacterial meningitis*. Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2590-601.
107. Kasama, T., et al., *Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha*. J Exp Med, 1993. **178**(1): p. 63-72.

108. Kaufmann, A., D. Gemsa, and H. Sprenger, *Differential desensitization of lipopolysaccharide-inducible chemokine gene expression in human monocytes and macrophages*. Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1562-7.
109. Jing, H., E. Vassiliou, and D. Ganea, *Prostaglandin E2 inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(5): p. 868-79.
110. Dhariwal, J., et al., *Nasal Lipopolysaccharide Challenge and Cytokine Measurement Reflects Innate Mucosal Immune Responsiveness*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0135363.
111. Means, T.K., et al., *The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5165-75.
112. Khandoga, A.G., et al., *In vivo imaging and quantitative analysis of leukocyte directional migration and polarization in inflamed tissue*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4693.
113. Reichel, C.A., et al., *Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(4): p. 864-74.
114. Jonsson, F., et al., *Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis*. J Clin Invest, 2011. **121**(4): p. 1484-96.
115. Stafforini, D.M., et al., *Deficiency of platelet-activating factor acetylhydrolase is a severity factor for asthma*. J Clin Invest, 1999. **103**(7): p. 989-97.
116. Singh, P., et al., *Platelet-activating factor (PAF)-antagonists of natural origin*. Fitoterapia, 2013. **84**: p. 180-201.
117. Raetz, C.R. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 635-700.
118. Qureshi, S.T., et al., *Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)*. J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 615-25.
119. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
120. Nagai, Y., et al., *Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 667-72.

Literaturverzeichnis

121. Bryant, C.E., et al., *The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(1): p. 8-14.
122. van Deuren, M., P. Brandtzaeg, and J.W. van der Meer, *Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(1): p. 144-66, table of contents.
123. Karaghiosoff, M., et al., *Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 471-7.
124. Zhang, L., et al., *Sphingosine kinase 2 (Sphk2) regulates platelet biogenesis by providing intracellular sphingosine 1-phosphate (S1P)*. Blood, 2013. **122**(5): p. 791-802.
125. Lefrancais, E., et al., *The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors*. Nature, 2017. **544**(7648): p. 105-109.
126. Rossaint, J. and A. Zarbock, *Platelets in leucocyte recruitment and function*. Cardiovasc Res, 2015. **107**(3): p. 386-95.
127. Zarbock, A., R.K. Polanowska-Grabowska, and K. Ley, *Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation*. Blood Rev, 2007. **21**(2): p. 99-111.
128. Jackson, S.P., *The growing complexity of platelet aggregation*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5087-95.
129. Ni, H., et al., *Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen*. J Clin Invest, 2000. **106**(3): p. 385-92.
130. Maxwell, M.J., et al., *Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation*. Blood, 2007. **109**(2): p. 566-76.
131. Reininger, A.J., et al., *Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3537-45.
132. Dopheide, S.M., M.J. Maxwell, and S.P. Jackson, *Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor*. Blood, 2002. **99**(1): p. 159-67.

133. Kanaji, S., et al., *Contribution of platelet vs. endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(8): p. 1646-52.
134. Sreeramkumar, V., et al., *Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation*. Science, 2014. **346**(6214): p. 1234-8.
135. Zuchtriegel, G., et al., *Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation*. PLoS Biol, 2016. **14**(5): p. e1002459.
136. Stark, R.J., N. Aghakasiri, and R.E. Rumbaut, *Platelet-derived Toll-like receptor 4 (Tlr-4) is sufficient to promote microvascular thrombosis in endotoxemia*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41254.
137. Patel, K.N., et al., *Differential role of von Willebrand factor and P-selectin on microvascular thrombosis in endotoxemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(12): p. 2225-30.
138. Rumbaut, R.E., et al., *Endotoxin enhances microvascular thrombosis in mouse cremaster venules via a TLR4-dependent, neutrophil-independent mechanism*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(4): p. H1671-9.
139. Dahlback, B., *Blood coagulation*. Lancet, 2000. **355**(9215): p. 1627-32.
140. Mann, K.G. and L. Lorand, *Introduction: blood coagulation*. Methods Enzymol, 1993. **222**: p. 1-10.
141. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. N Engl J Med, 2008. **359**(9): p. 938-49.
142. Mackman, N., *Triggers, targets and treatments for thrombosis*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 914-8.
143. Schulz, C., B. Engelmann, and S. Massberg, *Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis*. J Thromb Haemost, 2013. **11 Suppl 1**: p. 233-41.
144. Loof, T.G., et al., *Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense*. Blood, 2011. **118**(9): p. 2589-98.
145. Luckow, B., et al., *Reduced intragraft mRNA expression of matrix metalloproteinases Mmp3, Mmp12, Mmp13 and Adam8, and diminished transplant arteriosclerosis in Ccr5-deficient mice*. Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2568-78.
146. Baez, S., *An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy*. Microvasc Res, 1973. **5**(3): p. 384-94.

147. Woodfin, A., et al., *JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration*. Blood, 2007. **110**(6): p. 1848-56.
148. Mempel, T.R., et al., *Visualization of leukocyte transendothelial and interstitial migration using reflected light oblique transillumination in intravital video microscopy*. J Vasc Res, 2003. **40**(5): p. 435-41.
149. Sperandio, M., et al., *Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro*. Methods Enzymol, 2006. **416**: p. 346-71.
150. Mody, N.A. and M.R. King, *Platelet adhesive dynamics. Part I: characterization of platelet hydrodynamic collisions and wall effects*. Biophys J, 2008. **95**(5): p. 2539-55.
151. Mody, N.A. and M.R. King, *Influence of Brownian motion on blood platelet flow behavior and adhesive dynamics near a planar wall*. Langmuir, 2007. **23**(11): p. 6321-8.
152. Sweet, C.R., et al., *Modelling platelet-blood flow interaction using the subcellular element Langevin method*. J R Soc Interface, 2011. **8**(65): p. 1760-71.
153. Sorensen, E.N., et al., *Computational simulation of platelet deposition and activation: I. Model development and properties*. Ann Biomed Eng, 1999. **27**(4): p. 436-48.
154. Wang, W., et al., *Simulation of platelet, thrombus and erythrocyte hydrodynamic interactions in a 3D arteriole with in vivo comparison*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76949.
155. Popel, A.S. and P.C. Johnson, *Microcirculation and Hemorheology*. Annu Rev Fluid Mech, 2005. **37**: p. 43-69.
156. Kolaczkowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
157. Nourshargh, S. and R. Alon, *Leukocyte migration into inflamed tissues*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 694-707.
158. Pelkonen, S. and G. Pluschke, *Roles of spleen and liver in the clearance of Escherichia coli K1 bacteraemia in infant rats*. Microb Pathog, 1989. **6**(2): p. 93-102.

159. Kolaczowska, E., et al., *Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6673.
160. Massberg, S., et al., *Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases*. Nat Med, 2010. **16**(8): p. 887-96.
161. Woodfin, A., et al., *Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1*. Blood, 2009. **113**(24): p. 6246-57.
162. Brown, C.R. and S.L. Reiner, *Bone-marrow chimeras reveal hemopoietic and nonhemopoietic control of resistance to experimental Lyme arthritis*. J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1446-52.
163. Duran-Struuck, R. and R.C. Dysko, *Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2009. **48**(1): p. 11-22.
164. Rumbaut, R.E., D.W. Slaff, and A.R. Burns, *Microvascular thrombosis models in venules and arterioles in vivo*. Microcirculation, 2005. **12**(3): p. 259-74.
165. Holzer, M., et al., *Carbon-based nanomaterials accelerate arteriolar thrombus formation in the murine microcirculation independently of their shape*. J Appl Toxicol, 2014. **34**(11): p. 1167-76.
166. Patel, K.N., et al., *Polymicrobial sepsis and endotoxemia promote microvascular thrombosis via distinct mechanisms*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(6): p. 1403-9.
167. Massberg, S., et al., *Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice*. Blood, 2004. **103**(1): p. 136-42.
168. Atkinson, B.T., et al., *Laser-induced endothelial cell activation supports fibrin formation*. Blood, 2010. **116**(22): p. 4675-83.
169. Furuichi, K., et al., *Chemokine receptor CCR1 regulates inflammatory cell infiltration after renal ischemia-reperfusion injury*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8670-6.
170. Weber, C., *Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules*. J Mol Med (Berl), 2003. **81**(1): p. 4-19.

Literaturverzeichnis

171. Hwang, J., et al., *Human CC chemokine CCL23, a ligand for CCR1, induces endothelial cell migration and promotes angiogenesis*. Cytokine, 2005. **30**(5): p. 254-63.
172. Ramos, C.D., et al., *MIP-1alpha[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(1): p. 167-77.
173. Reichel, C.A., et al., *Ccl2 and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid mediators*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(11): p. 1787-93.
174. Weber, K.S., et al., *Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(9): p. 2085-93.
175. Price, K.S., et al., *CC chemokine receptor 3 mobilizes to the surface of human mast cells and potentiates immunoglobulin E-dependent generation of interleukin 13*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **28**(4): p. 420-7.
176. Bonacchi, A., et al., *Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 9945-54.
177. Marone, R., et al., *Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1784**(1): p. 159-85.
178. Morello, F., A. Perino, and E. Hirsch, *Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system*. Cardiovasc Res, 2009. **82**(2): p. 261-71.
179. Kuligowski, M.P., et al., *Antimyeloperoxidase antibodies rapidly induce alpha-4-integrin-dependent glomerular neutrophil adhesion*. Blood, 2009. **113**(25): p. 6485-94.
180. Henderson, R.B., et al., *The use of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice to determine the role of LFA-1, Mac-1, and alpha4 integrin in the inflammatory response of neutrophils*. J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 219-26.
181. Bowden, R.A., et al., *Role of alpha4 integrin and VCAM-1 in CD18-independent neutrophil migration across mouse cardiac endothelium*. Circ Res, 2002. **90**(5): p. 562-9.

Literaturverzeichnis

182. Kuppers, V., D. Vestweber, and D. Schulte, *Locking endothelial junctions blocks leukocyte extravasation, but not in all tissues*. *Tissue Barriers*, 2013. **1**(1): p. e23805.
183. Schulte, D., et al., *Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability*. *EMBO J*, 2011. **30**(20): p. 4157-70.
184. Reichel, C.A., et al., *C-C motif chemokine CCL3 and canonical neutrophil attractants promote neutrophil extravasation through common and distinct mechanisms*. *Blood*, 2012. **120**(4): p. 880-90.
185. Lagrand, W.K., et al., *C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon?* *Circulation*, 1999. **100**(1): p. 96-102.
186. Pai, J.K., et al., *Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(25): p. 2599-610.
187. Gavins, F.N., et al., *Mechanisms of enhanced thrombus formation in cerebral microvessels of mice expressing hemoglobin-S*. *Blood*, 2011. **117**(15): p. 4125-33.
188. Nesbitt, W.S., et al., *A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation*. *Nat Med*, 2009. **15**(6): p. 665-73.
189. Tovar-Lopez, F.J., et al., *An investigation on platelet transport during thrombus formation at micro-scale stenosis*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e74123.
190. Zheng, Y., J. Chen, and J.A. Lopez, *Flow-driven assembly of VWF fibres and webs in in vitro microvessels*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 7858.
191. Wang, Y., et al., *Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Ibalpha via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury*. *Circulation*, 2005. **112**(19): p. 2993-3000.
192. Simon, D.I., et al., *Platelet glycoprotein Ibalpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. *J Exp Med*, 2000. **192**(2): p. 193-204.
193. Evangelista, V., et al., *Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule*. *Blood*, 1999. **93**(3): p. 876-85.
194. Polanowska-Grabowska, R., et al., *P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(12): p. 2392-9.

Literaturverzeichnis

195. Gavins, F.N., et al., *Microvascular thrombosis and CD40/CD40L signaling*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(3): p. 574-81.
196. Longstaff, C., et al., *Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones*. J Biol Chem, 2013. **288**(10): p. 6946-56.
197. Gershlick, A.H., et al., *Reperfusion therapy for STEMI: is there still a role for thrombolysis in the era of primary percutaneous coronary intervention?* Lancet, 2013. **382**(9892): p. 624-32.
198. Campbell, B.C., et al., *Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection*. N Engl J Med, 2015. **372**(11): p. 1009-18.
199. Goyal, M., et al., *Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke*. N Engl J Med, 2015. **372**(11): p. 1019-30.

X Danksagung

Mein Dank gilt zunächst den Herren Prof. Dr. Ulrich Pohl als Institutsleiter a. D. des Walter-Brendel-Zentrums für experimentelle Medizin und dem aktuellen Institutsleiter Prof. Dr. med. Markus Sperandio, die es mir ermöglicht haben, an diesem Institut eine grundlagenwissenschaftliche experimentelle Dissertation zur medizinischen Promotion anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Christoph A. Reichel und meinem Doktorarbeitsbetreuer Prof. Dr. F. Krombach. Beide haben mich stets sowohl in theoretischen wissenschaftlichen Fragen als auch bei der experimentellen Durchführung tatkräftig unterstützt und haben es mir ermöglicht, wissenschaftliche Projekte zu entwickeln und umzusetzen. Mit ihrer hervorragenden Expertise in den Bereichen der Entzündungsforschung, Leukozytenmigration und Thrombusbildung begleiteten sie mich intensiv in allen Projektphasen. Sie haben mich gelehrt, Experimente durchzuführen, wissenschaftliche Daten zu erheben, korrekt zu interpretieren, statistisch auszuwerten und zu präsentieren. Ihre wissenschaftliche Betreuung und der damit verbundene gemeinsame Diskurs, ihre Ideen, ihr Wissen und ihr Einfluss haben meine Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen nachhaltig geprägt und werden meinen weiteren akademischen Werdegang begleiten.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Mitdoktoranden und Kollegen des Walter-Brendel-Zentrums bedanken, vor allem bei Herrn Dr. B. Uhl, Frau Dr. G. Zuchriegel, Herrn M. Fabritius, Herrn Dr. M. Hessenauer, Frau L. Mittmann, unserem medizinisch-technischen Assistenten G. Adams und bei D. Müller. Unsere gemeinsamen Arbeitsstunden im Labor waren mir stets eine große Freude.

Mein herzlicher Dank gilt auch den Mitarbeitern der Tierhaltung des Instituts, die ein tierexperimentelles Arbeiten erst ermöglichen.

Den Leitern des Graduiertenkolleg IRTG (*integrated research training group*) des Sonderforschungsbereichs 914 („*leukocyte trafficking*“) gebührt ebenso mein herzlicher

Danksagung

Dank für die Aufnahme und Unterstützung während meiner experimentellen Doktorarbeit.

Schließlich möchte ich meiner Frau, Dr. Annekathrin Eckart, meinen Eltern und meinem Bruder aus tiefstem Herzen danken, die mich immer unterstützt und sich stets für meine wissenschaftliche Arbeit interessiert haben.

XI Publikationen

1 Aus der Dissertation hervorgegangene/hervorgehende Publikationen

1. Reichel, C. A., **Puhr-Westerheide, D.**, Zuchtriegel, G., Uhl, B., Berberich, N., Zahler, S., Wymann, M. P., Luckow, B., Krombach, F. C-C motif chemokine CCL3 and canonical neutrophil attractants promote neutrophil extravasation through common and distinct mechanisms. **Blood**. 2012. 120(4): 880-890.
2. **Puhr-Westerheide, D.**, Schink, S. J., Fabritius, M., Hessenauer, M. E. T., Pircher, J., Zuchtriegel, G., Uhl, B., Holzer, M., Massberg, S., Krombach, F., Reichel, C. A. Neutrophils promote thrombosis in the venular microvasculature by shaping the rheological environment for platelet aggregation.
Publikation wird aktuell eingereicht.

2 Weitere Publikationen

3. Reichel, C. A., Uhl, B., Lerchenberger, L. **Puhr-Westerheide, D.**, Rehberg, M., Liebl, J., Khandoga, A., Schmalix, W., Zahler, S. Deindl, E., Lorenzl, S. Declerck, P. J., Kanse, S., Krombach, F. Urokinase-type plasminogen activator promotes paracellular transmigration of neutrophils via Mac-1, but independently of urokinase-type plasminogen activator receptor. **Circulation**. 2011. 124(17): 1848-1859.
4. Lerchenberger, M., Uhl, B., Stark, K., Zuchtriegel, G., Eckart, A., Miller, M., **Puhr-Westerheide, D.**, Praetner, M., Rehberg, M., Khandoga, A. G., Lauber, K., Massberg, S., Krombach, F., Reichel, C. A. Matrix metalloproteinases modulate ameboid-like migration of neutrophils through inflamed interstitial tissue. **Blood**. 2013. 122(5): 770-780.
5. Uhl, B., Zuchtriegel, G., **Puhr-Westerheide, D.**, Praetner, M., Rehberg, M., Fabritius, M., Hessenauer, M., Holzer, M., Khandoga, A., Furst, R., Zahler, S., Krombach, F., Reichel, C. A. Tissue-Type Plasminogen Activator Promotes Postischemic Neutrophil Recruitment via Its Proteolytic and Nonproteolytic Properties. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. 2014. 34(7):1495-504.

Publikationen

6. Zuchtriegel, G., Uhl B., **Puhr-Westerheide D.**, Pörnbacher M., Lauber K., Krombach F., Reichel C. A. Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. **PLoS Biology**. 2016. 14(5): e1002459.