

Aus dem Walter Brendel Zentrum für experimentelle Medizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Markus Sperandio

**Einfluss von TLR2 und DHEA auf die
Leukozytenadhäsion *in vivo***



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

vorgelegt von
Johannes Roman Wießner
aus Nürnberg

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Sperandio
Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen
PD Dr. med. Arndt Schottelius

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2021

Eidesstattliche Versicherung

Wießner, Johannes Roman

Name, Vorname

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

Einfluss von TLR2 und DHEA auf die Leukozytenadhäsion in vivo

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, 04.12.2021

Ort, Datum

Johannes Wießner

Unterschrift Doktorand

Teile der vorgelegten Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

DHEA Inhibits Leukocyte Recruitment through Regulation of the Integrin Antagonist DEL-1.

Ziogas A, Maekawa T, **Wiessner JR**, Le TT, Sprott D, Troullinaki M, Neuwirth A, Anastasopoulou V, Grossklaus S, Chung KJ, Sperandio M, Chavakis T, Hajishengallis G, Alexaki VI.

J Immunol. 2020 Mar 1;204(5):1214-1224. doi: 10.4049/jimmunol.1900746. Epub 2020 Jan 24. PMID: 31980574

A novel pathway of rapid TLR-triggered activation of integrin-dependent leukocyte adhesion that requires Rap1 GTPase.

Chung KJ, Mitroulis I, **Wiessner JR**, Zheng YY, Siegert G, Sperandio M, Chavakis T.

Mol Biol Cell. 2014 Oct 1;25(19):2948-55. doi: 10.1091/mbc.E14-04-0867. Epub 2014 Jul 23. PMID: 2505702

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Rekrutierung von Leukozyten.....	1
1.2 Einfangen (capture) und Rollen	2
1.3 Aktivierung und Adhäsion.....	4
1.4 Kriechen (crawling) und Transmigration.....	6
1.5 Toll-like Rezeptoren.....	7
1.5.1 Aufbau und Lokalisation der TLRs.....	8
1.6 Dehydroepiandrosteron	9
1.7 Ziele dieser Arbeit.....	9
2. Material und Methoden.....	11
2.1 Versuchstiere	11
2.2 Untersuchung der Leukozytenrekrutierung anhand des Cremaster-Modells der Maus	11
2.2.1 Präparation der Arteria carotis sowie Tracheotomie.....	11
2.2.2 Präparation des Musculus Cremaster.....	13
2.2.3 Intravitalmikroskopie.....	14
2.4 TLR2 Stimulation im Trauma-Modell.....	16
2.4 DHEA mit Stimulation durch LPS	16
2.4.1 DHEA Versuchsaufbau.....	16
2.4.2 Perivaskuläre Leukozyten	17
2.5 Datenanalyse.....	18
2.5.1 Intravitalmikroskopie.....	18
2.5.2 Extravasation von Leukozyten.....	20
3. Ergebnisse.....	22
3.1 TLR2 induzierte Leukozytenadhäsion in Cremastermuskel -Venolen <i>in vivo</i>	22
3.1.1 Adhäsionseffizienz	22
3.1.2 Leukozytenrollen.....	22
3.2 Einfluss von DHEA auf die Leukozytenadhäsion <i>in vivo</i>	25
3.2.1 Adhäsionseffizienz und adhärente Zellen.....	25
3.2.2 Fraktion der rollenden Leukozyten im Blutstrom	25
3.2.3 Rollgeschwindigkeit	25

3.2.4 Extravasation.....	27
4. Diskussion	29
4.1 Limitationen der Videobildanalyse.....	29
4.2 Limitationen der <i>in vivo</i> Versuche	29
4.2.1 Limitationen der histologischen Versuche zur Extravasation	30
4.3 Einfluss von DHEA auf die Leukozytenrekrutierung.....	30
4.4 Der Einfluss von TLR2 auf die Leukozytenaktivierung	34
5. Ausblick	36
6. Abkürzungen	37
7. Literaturverzeichnis	39
7. Danksagung.....	50

Zusammenfassung

Für die Adhäsion und Rekrutierung von Leukozyten im Rahmen von inflammatorischen Erkrankungen, z.B. bei Infektionen, ist eine schnelle Aktivierung von β_2 -Integrinen eine wesentliche Voraussetzung. Diese wird bekanntermaßen durch Chemokine oder P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) induziertes inside-out signaling vermittelt. In dieser Arbeit konnte mittels intravitalmikroskopischer Versuche im Cremastermodell der Maus gezeigt werden, dass nach Applikation des Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) Agonisten Pam3CSK4 eine schnell einsetzende Verringerung der Rollgeschwindigkeit wie auch eine vermehrte Adhäsion von Leukozyten an das Endothel stattfindet. Nach Injektion eines TLR9 Agonisten, welcher als Kontrolle diente, konnten genannte Effekte nicht gezeigt werden.

Des Weiteren wurde der Einfluss des Steroidhormons Dehydroepiandrosteron (DHEA) auf die Leukozytenadhäsion *in vivo* untersucht. Eine frühere Arbeit hatte gezeigt, dass DHEA die Expression von TLR2 und TLR4 in myeloiden Zellen reduziert. Auch hier war das Cremastermodell Grundlage der intravitalmikroskopischen Untersuchungen. Nach intraperitonealer Injektion von 2mg DHEA wurden 50ng Lipopolysaccharid (LPS) intrascrotal injiziert. 180 Minuten nach LPS Applikation wurden die intravitalmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt. Auch hier fand sich eine signifikante Änderung der Leukozytenadhäsion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die mit DHEA vorbehandelte Gruppe zeigte eine signifikant verminderte Adhäsionseffizienz, was sich zudem in höheren Rollgeschwindigkeiten wie auch einem erhöhten Anteil rollender Leukozyten zeigte.

Histologische Untersuchungen des Cremasters konnten keine Unterschiede zwischen der DHEA-Gruppe und der Kontrollgruppe in der Extravasation von Leukozyten nachweisen, was wir am ehesten methodenbedingt interpretieren.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Aktivierung von TLR2 zu einer schnellen Zunahme der Leukozytenadhäsion wie auch verminderten Leukozyten-Rollgeschwindigkeit *in vivo* führt. Des Weiteren fand sich in DHEA vorbehandelten Mäusen nach LPS-Stimulation eine verminderte Leukozytenadhäsion mit erhöhten Leukozyten-Rollgeschwindigkeiten *in vivo*.

1. Einleitung

1.1 Die Rekrutierung von Leukozyten

Die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut zum Entzündungsgeschehen ist ein entscheidender Schritt der Immunantwort, welcher in den letzten Jahren eingehend erforscht wurde [1, 2]. Neutrophile Granulozyten (= polymorphonukleäre Leukozyten, PMN) sind meist die Zellen der Leukozyten Subpopulationen, welche zuerst an den Ort der Entzündung rekrutiert werden [3]. Sie haben entscheidenden Anteil an der Immunantwort gegen bakterielle und fungale Pathogene [4] und sind mit einem Anteil von 55-70% die größte humane Leukozytensubpopulation. Auch die Rekrutierung anderer Leukozytensubpopulationen erfolgt auf ähnlichem Weg [2]. Die Rekrutierung von Leukozyten geschieht in einer mehrstufigen Kaskade (Einfangen, Rollen, Adhäsion, Crawling, Transmigration), deren erste Beschreibungen, wie in einem Review von Ley erwähnt [5], bis in das neunzehnte Jahrhundert zurückreichen. Nachfolgend sollen die einzelnen Schritte der Rekrutierung näher erläutert werden.

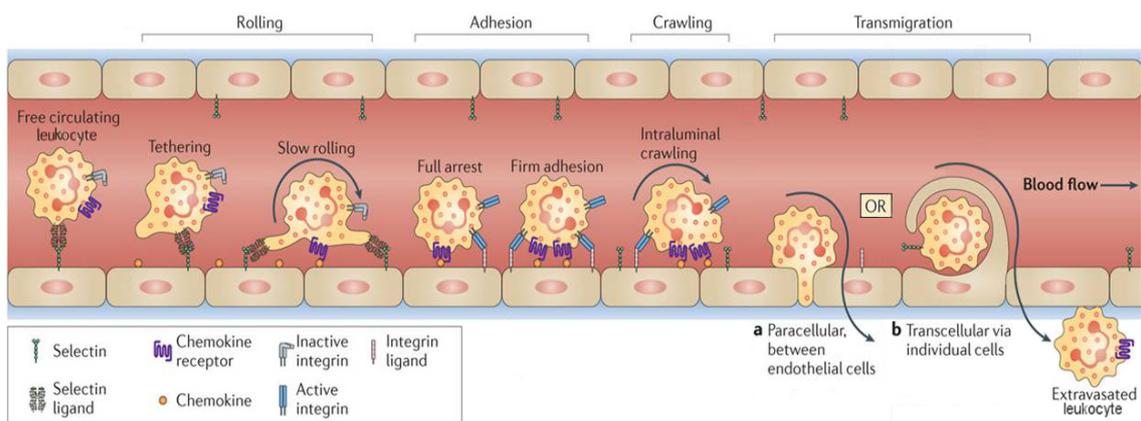


Abbildung 1: Die Leukozytenrekrutierung, modifiziert nach Kolaczowska & Kubes [6]. Die Rekrutierung beginnt mit dem Einfangen (capture) der Leukozyten, auf welches das Rollen am Endothel folgt. Diese Prozesse sind überwiegend durch Selektine vermittelt. Während des Rollens werden Integrine auf Leukozyten aktiviert, was eine Verlangsamung der Rollgeschwindigkeit zur Folge hat und nach dem Anhalten schließlich zur festen Adhäsion von Leukozyten führt. Nach dieser kriechen die Leukozyten (crawling) zur entsprechenden Stelle des Endothels, von der die Auswanderung aus dem Gefäß stattfindet. Dies geschieht entweder para- oder transzellulär.

1.2 Einfangen (capture) und Rollen

Bei Entzündungsprozessen erfolgt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten hauptsächlich in postkapillären Venolen [7, 8] unter idealen hämodynamischen Bedingungen [2]. Bei dem Margination genannten Prozess, werden PMN durch die sich zentral im Gefäß befindlichen Erythrozyten an den Rand gedrängt und so in engen Kontakt (primary capture) zum inflammatorisch veränderten Endothel gebracht [9]. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Leukozyten-Endothel-Interaktion. Ebenso kann ein Einfangen frei im Blutstrom befindlicher PMN durch bereits adhärenente PMN vermittelt werden (secondary capture, secondary tethering) [10]. Der initiale Schritt des Einfangens von PMN wird vorwiegend von einer Klasse von Adhäsionsmolekülen vermittelt, den Selektinen [11]. Es sind drei verschiedene Selektine bekannt: L-, E- und P-Selektin. Sie sind calciumabhängige Typ I transmembrane Glykoproteine welche an sialylierte Kohlenhydratketten ihrer Liganden binden [11]. Die Benennung der drei bekannten Selektine bezieht sich auf den Zelltyp, auf dem sie erstmalig entdeckt wurden. L-Selektin kommt auf nahezu allen Leukozyten vor, E-Selektin wird auf aktiviertem Endothel exprimiert und P-Selektin wurde in α -Granula von Thrombozyten (englisch platelets) erstmalig beschrieben. Letzteres kann ebenso von aktiviertem Endothel exprimiert werden [12]. Der extrazellulär gelegene N-Terminus von Selektinen dient mit seiner Lektin-Domäne der Erkennung der Kohlenhydratketten seiner Liganden [11]. Hierauf folgt eine epidermal growth factor (EGF)-like domain (EGF-like-Domäne) sowie eine variable Anzahl von short consensus repeats (SCRs). Diese sind charakteristisch für die verschiedenen Selektine und verbinden die EGF-like Domäne mit der Transmembrandomäne. An diese angeschlossen ist die C-terminale zytoplasmatische Kette, welche verschiedene modulatorische Eigenschaften hat: Zum einen Interaktionen mit dem Zytoskelett [13], zum anderen aber auch Signaling Funktion, dies konnte beispielsweise bei L-Selektin gezeigt werden [14].

Das Einfangen von Leukozyten wird durch Oberflächenveränderungen des Endothels initiiert [6]. Die Stimulation durch inflammatorische Mediatoren wie Histamin und Zytokine oder direkt durch Erkennen von Pathogenen via pattern-recognition receptors (PRRs) führt zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen wie E- oder P-Selektin [6]. E-Selektin wird *de novo* synthetisiert und 2-3 Stunden nach Stimulation durch proinflammatorische

Zytokine, wie beispielsweise Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), auf der luminalen Seite des Endothels exprimiert [15]. Es kann jedoch auch wieder internalisiert und in Lysosomen abgebaut werden [16].

Die Mobilisation von P-Selektin aus den Weibel-Palade Körperchen, wo es gespeichert wird [17], an die luminal Endotheloberfläche, geschieht innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Stimulation [18]. Überdies kann es durch Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) oder TNF- α durch Aktivierung von NF- κ B [19] transkriptionell hochreguliert werden und erreicht so nach 3-4 Stunden seine maximale Expression [20]. Die Hochregulation auf Transkriptionsebene im Rahmen von Entzündung wurde bisher nur in Mäusen, im Menschen wurde sogar eine Verminderung der P-Selektin Expression beobachtet [21]. Im Gegensatz zu E-Selektin kann P-Selektin wieder internalisiert werden und erneut in den Weibel-Palade Körperchen gespeichert werden [16].

L-Selektin wird konstitutiv auf den apikalen Enden der Mikrovilli der meisten Leukozyten exprimiert [22]. Die Interaktion von frei fließenden Leukozyten mit bereits adhären Leukozyten wird ebenso durch L-Selektin auf den frei fließenden Leukozyten vermittelt ("secondary tethering") [23]. Des Weiteren ist L-Selektin bei der Vermittlung des Lymphocyte-Homing [24] in hochendothelialen Venolen (HEV) von entscheidender Bedeutung.

Der wichtigste Ligand aller drei Selektine ist P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1). Als mit Disulfidbrücken ausgestattetes homodimeres Transmembranprotein wird PSGL-1 auf fast allen Leukozyten exprimiert [25]. Das Einfangen und Rollen wird durch Interaktion von P- und E-Selektin mit PSGL-1 vermittelt [26]. Durch seine Lokalisation an den Fortsätzen der Leukozyten ist PSGL-1 besonders für einen „Erstkontakt“ mit dem Endothel exponiert [27]. PSGL-1 ist der Hauptligand für P-Selektin [28]. E-Selektin vermag zudem mit dem E-Selectin Ligand 1 (ESL-1) und CD44 zu interagieren [2, 29]. Diese beschriebenen Interaktionen sind für das langsame E-Selektin abhängige Rollen verantwortlich ($\approx 5 \mu\text{m/s}$) [29, 30]. Das P-Selektin abhängige Rollen ist mit $> 20 \mu\text{m/s}$ deutlich schneller [29]. „Secondary capture“ wird durch L-Selektin auf frei fließenden Leukozyten an PSGL-1 adhären Leukozyten vermittelt [31].

Von besonderer Bedeutung für das Rollen ist eine hohe Anzahl von neu gebildeten wie auch sich lösender Bindungsereignisse [5, 32]. Die Bindungen zwischen Selektinen und PSGL-1 zeigen einige Besonderheiten. Sie werden unter

mechanischer Belastung stärker [33] und lösen sich bei niedrigen Scherkräften, beispielsweise bei langsamen Blutstromgeschwindigkeiten [34]. Bei hohen Scherkräften, wie sie bei hohen Blutstromgeschwindigkeiten vorkommen, kommt es mitunter zur Abflachung und Ausbildung schlingenähnlicher Fortsätze der PMN, welche auch unter diesen Bedingungen ein Rollen ermöglichen [35-37]. Letztlich wird der Vorgang des Rollens durch ein biomechanisches Gleichgewicht zwischen neu entstehenden Bindungen an der Vorderseite des PMN sowie sich lösender Bindungen an der Hinterseite ermöglicht [38]. Neben Selektin-vermitteltem Rollen haben auch Integrine Einfluss auf das Rollen [2, 39].

1.3 Aktivierung und Adhäsion

Das Rollen von Leukozyten auf aktiviertem Endothel verstärkt die Interaktion von Leukozyten und endothelial präsentierten Chemokinen. Der Kontakt mit Chemokinen führt über Chemokinrezeptoren (G-Protein gekoppelte Rezeptoren, GPCRs) zur einer Aktivierung von Integrinen (Chemokin-induziertes inside-out signaling) und schließlich zu einer integrinvermittelten Adhäsion von Leukozyten [5]. Die chemokininduzierte Integrinaktivierung geschieht mit Hilfe von Talin-1, Kindlin-3, der GTPase Ras-related protein 1 (Rap1) und dem Effektorprotein Rap1-GTP-interacting adapter molecule (RIAM) [40-43]. Neben der GPCR-abhängigen β_2 -Integrin Aktivierung können β_2 -Integrine ebenso durch E-Selektin - PSGL-1 Interaktion aktiviert werden. Dies beinhaltet eine autokrine Aktivierung via TLR4-Signaling durch Freisetzung von S100A8/A9 [39]. Zur Familie der Integrine gehören bei Säugern mehr als 20 heterodimere Transmembranproteine. Die wichtigsten Familien stellen für die Leukozytenadhäsion die β_2 -Integrine und β_1 -Integrine dar, welche Leukozyten-Endothel-Interaktionen vermitteln. Sie bestehen aus einer α und einer β Untereinheit [46]. Die α -Kette beinhaltet im extrazellulären Bereich sieben Schleifen, welche im N-terminalen Bereich eine β -Propeller-Struktur aufweisen und die für die Ligandenbindung notwendige I-Domäne enthalten. Für die Ligandenerkennung ist die I-like Domäne der β_2 -Kette zuständig, diese beinhaltet wie auch die I-Domäne Bindungsstellen für Kationen (Mg^{2+}), welche für die Funktion zwingend notwendig sind [47]. Die nicht-kovalente Bindung zwischen der α - und β -Kette wird durch die GFFKR-Region im zytoplasmatischen Abschnitt der α -Kette vermittelt. Genannt seien als wichtigste Integrine auf Neutrophilen die β_2 -Integrine lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1; $\alpha_L\beta_2$ bzw. CD11a/CD18) und macrophage antigen-1 (Mac-1; $\alpha_M\beta_2$

bzw. CD11b/CD18) sowie das very late antigen 4 (VLA-4; $\alpha_4\beta_1$) [46]. Während des Rollens durchlaufen die auf Leukozyten exprimierte Integrine unterschiedliche Stadien mit zunehmender Affinität zu ihrem Liganden. Dies geht mit Änderungen der Konformation einher; von einem geschlossenen Zustand niedriger Affinität über einen intermediären zu einem komplett geöffneten Zustand hin mit hoher Bindungsaffinität zu den jeweiligen Liganden, welcher letztlich ein langsames Rollen und schließlich die Adhäsion vermittelt [48]. Im Rahmen der Adhäsion und Transmigration binden Leukozyten an verschiedene Adhäsionsmoleküle. Von wesentlicher Bedeutung sind hierbei die inter-cellular adhesion molecules -1 und -2 (ICAMs), welche auf dem Endothel exprimiert werden [6] und von LFA-1 gebunden werden. Die Bindung von aktiviertem LFA-1 an ICAM-1 sowie die Bindung des receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) an Mac-1 sind essentiell für eine feste Leukozytenadhäsion [49, 50]. Erwähnt sei ebenso, dass Integrine auch Zielstrukturen endogener antiinflammatorischer Mediatoren sind. Das insbesondere von Endothelzellen und Makrophagen sezernierte Glykoprotein developmental endothelial locus-1 (DEL-1) blockiert die Bindung von LFA-1 an seine Liganden und inhibiert so die feste Adhäsion und Transmigration von Leukozyten [51]. So konnte bei Mäusen mit genetischer DEL-1 Deletion unter verschiedenen inflammatorischen Bedingungen eine verstärkte Leukozyteninfiltration in entzündliche Gewebe nachgewiesen werden [51]. Durch eine Hemmung der endothelialen DEL-1 Expression begünstigen inflammatorische Zytokine wie Interleukin-17 (IL-17) und TNF die Leukozytenrekrutierung und somit Inflammation [52].

Defekte während der Leukozytenrekrutierung führen zu Immundefizienz - Syndromen und sind als leukocyte adhesion deficiencies (LADs) bekannt. Gemeinsam sind diesen rekurrente Infektionen [53]. Bisher wurden drei verschiedene LADs beschrieben, welche nachfolgend in der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung aufgeführt werden. Der LAD-I liegt ein Funktionsverlust der β_2 -Kette von Integrinen zugrunde [54]. Bei der LAD-II besteht ein Defekt in der posttranslationalen Fukosylierung, welcher mit einer deutlichen Verminderung des Leukozyten-Rollens einher geht [55, 56]. Die LAD-III ist durch eine verminderte Aktivierung von Integrinen charakterisiert. Ursächlich ist hierbei ein Funktionsverlust des Integrin-Adapter Moleküls Kindlin-3 [57-59].

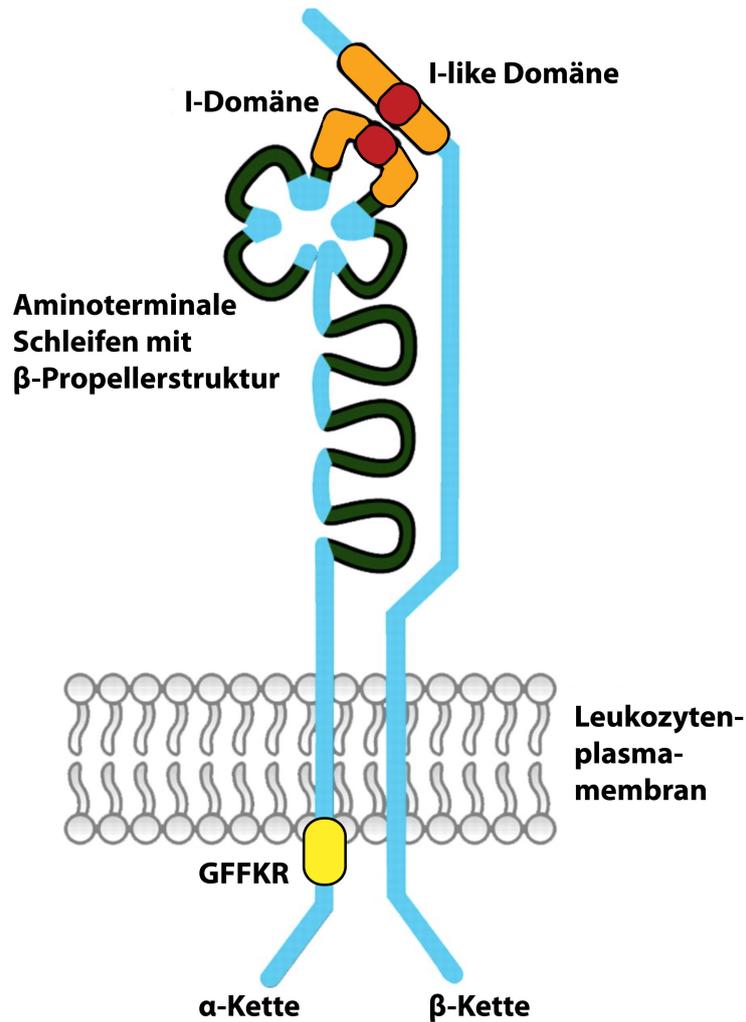


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines β_2 -Integrins modifiziert nach Harris [47]. Der N-terminale, extrazelluläre Anteil der α -Kette beinhaltet sieben homologe Schleifen, vier dieser Schleifen sind in einer Propeller-Struktur angeordnet. Die I-Domäne der α -Kette ist für die Ligandenbindung zuständig, für die Ligandenerkennung ist die I-like Domäne der β -Kette zuständig. Im zytosolischen Schwanz der α -Kette befindet sich die GFFKR Sequenz (gelb), welche eine Aktivierungsfunktion besitzt. Die Darstellung zeigt den geschlossenen, inaktiven Zustand eines β_2 -Integrins.

1.4 Kriechen (crawling) und Transmigration

Der letzte Schritt der Leukozyten-Rekrutierung ist die Transmigration durch die Gefäßwand. Zuvor jedoch kriechen (engl. crawling) Leukozyten an der luminalen Gefäßoberfläche, um einen geeigneten Ort für die Diapedese zu finden. Es konnte für Neutrophile gezeigt werden, dass dieser Vorgang Mac-1 abhängig ist und eine Hemmung des Crawlings eine deutliche Verzögerung der Transmigration bewirkt

[50]. Die Extravasation beinhaltet das Überwinden von drei Barrieren: die Endothelzellen, die Basalmembran sowie die Perizyten [5]. Für die Transmigration sind zwei alternative Wege durch die endotheliale Zellbarriere beschrieben: ein parazellulärer (zwischen Zell-Zell Verbindungen) und ein transzellulärer Weg (direkt durch Zellen)[6]. Für Neutrophile scheint die parazelluläre gegenüber der transzellulären Migration zu überwiegen [50, 60].

1.5 Toll-like Rezeptoren

Eine wichtige Rolle im Rahmen von Immunantworten auf Pathogene erfüllen Toll-like Rezeptoren (TLRs). TLRs sind Teil des angeborenen Immunsystems und gehören zu den pattern-recognition receptors (PRRs), welche Mikroorganismen erkennen. PRRs zeigen charakteristische Eigenschaften. Hierzu gehört das Erkennen von mikrobiellen Bestandteilen, welche als pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) bezeichnet werden. Überdies erkennen PRRs damage-associated molecular pattern (DAMPs), welche als körpereigene Molekülstrukturen bei Gewebeschäden frei werden [61]. Die unterschiedlichen PRRs erkennen spezifische PAMPs/DAMPs und aktivieren nachfolgend Signalwege, welche zu unterschiedlichen Immunantworten führen [62]. Für den Menschen sind bisher zehn TLRs (TLR1-TLR10) beschrieben, zwölf für die Maus (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13) [61, 63]. Die von TLRs erkannten PAMPs beinhalten unter anderem Lipoproteine (TLR1, TLR2 und TLR6), doppelsträngige RNA (dsRNA; TLR3), Lipopolysaccharide (LPS; TLR4), Flagellin (TLR5), einzelsträngige RNA (ssRNA; TLR7 und TLR8), und DNA (TLR9) [62, 64]. Nach Bindung an den entsprechenden TLR werden verschiedene Adaptermoleküle aktiviert. Hierzu gehören myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88), Toll-Interleukin 1 (IL-1) Rezeptor (TIR)-domain-containing adaptor protein inducing beta interferon (TRIF), TIR-domain-containing adaptor protein (TIRAP), oder TIR-domain containing adaptor molecule (TRAM). Die downstream aktivierten Signalwege induzieren inflammatorische Cytokine, Chemokine, Interferone und andere induzierbare Proteine [65].

1.5.1 Aufbau und Lokalisation der TLRs

TLRs sind Typ I Transmembranproteine, an deren Ektodomäne sich leucinreiche Sequenzen (leucine-rich repeats) befinden, welche für die Erkennung von PAMPs eine wichtige Funktion ausüben. Daran anschließend folgen eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Toll-Interleukin 1 (IL-1) Rezeptor (TIR) Domäne. Letztere ist für das downstream-signaling bedeutsam [64].

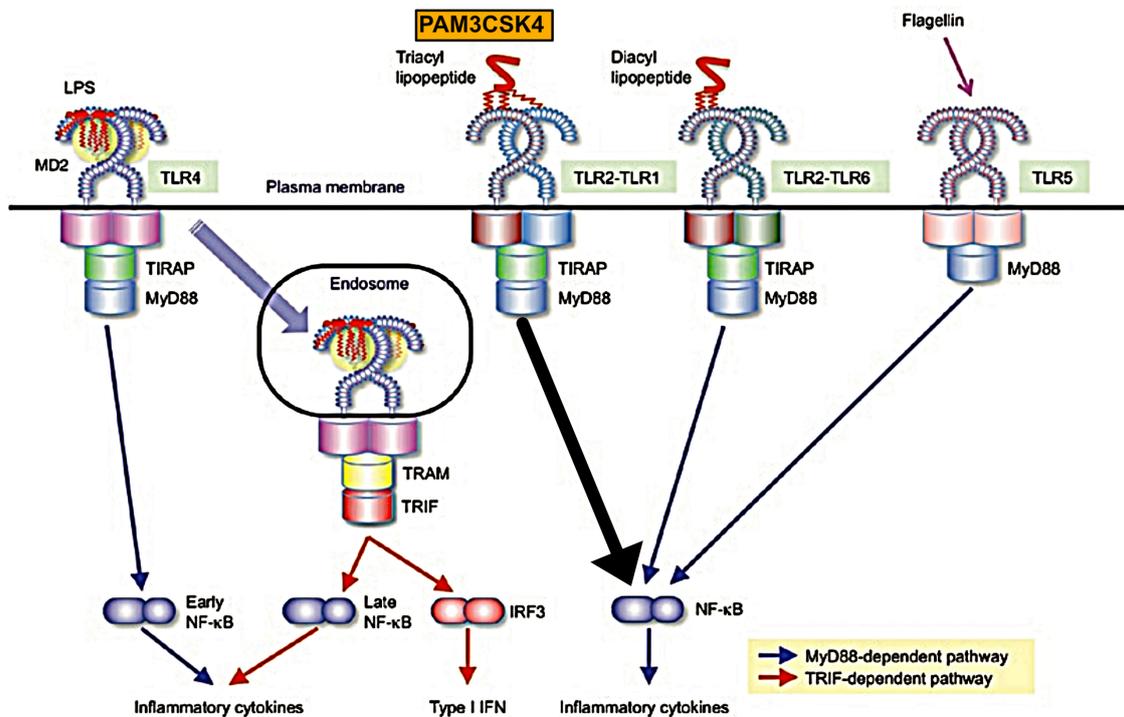


Abbildung 3: Erkennung von PAMPs durch TLRs, modifiziert nach Kawai [64]. TLR2-TLR1 Heterodimere erkennen triacylierte Lipopeptide. Zwei der drei Lipidketten der triacylierten Lipopeptide interagieren mit TLR2, die dritte Lipidkette bindet an den hydrophoben Kanal von TLR1. TLR2-TLR1 induzieren eine NF-κB Aktivierung durch die Rekrutierung von TIRAP und MyD88. In den nachfolgend erläuterten Experimenten wurde der potente TLR2 Agonist PAM3CSK4, ein triacyliertes Lipoprotein, verwendet.

TLRs werden auf zahlreichen Zellen des Immunsystems exprimiert, genannt seien Makrophagen, Granulozyten, Dendritische Zellen, B-Zellen, T-Zellen wie auch Fibroblasten und Epithelzellen [62]. Anhand der jeweiligen Lokalisation lassen sich zwei Subgruppen von TLRs bilden. An Zelloberflächen exprimiert werden TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11, die andere Gruppe, bestehend aus TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9, wird nahezu ausschließlich auf intrazellulären

Kompartimenten exprimiert, wie dem Endoplasmatischen Retikulum, den Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen [64].

1.6 Dehydroepiandrosteron

Das Steroidhormon Dehydroepiandrosteron (DHEA) sowie dessen sulfatierte Ester-Form (DHEA-S) sind die meist vorkommenden zirkulierenden Steroidhormone des ausgewachsenen Menschen, mit im Alter abnehmender Konzentration [66]. Ebenso konnten im Rahmen inflammatorischer Erkrankungen wie beispielsweise bei Systemischem Lupus Erythematoses oder Arthritis deutlich verringerte Konzentrationen von DHEA nachgewiesen werden [67, 68]. Im Menschen wird DHEA im adrenalen Kortex, den Gonaden und dem Zentralen Nervensystem produziert [66, 69]. Neben seiner Funktion als Vorläuferhormone der Sexualhormone, zeigt DHEA antiinflammatorische Eigenschaften in Geweben, hierzu gehören auch die Leukozytenrekrutierung hemmende Eigenschaften [70, 71]. Neben der Bindung an nukleäre Rezeptoren wie Estrogen-Receptor α (ER α) und ER β [72, 73], konnte auch eine Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren in endothelialen- und neuronalen Zellen gezeigt werden [74, 75]. Auch der nerve growth factor (NGF) receptor sowie die tropomyosin-related kinase A (TRKA) in neuronalen und Microglia-Zellen werden gebunden wie auch aktiviert und bewirken ein downstream AKT-(auch Protein-Kinase B genannt) signalling [76-78]. Die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch größtenteils unverstanden [79-81].

1.7 Ziele dieser Arbeit

Sowohl β_2 -Integrine als auch TLRs sind an der angeborenen Immunantwort gegen Pathogene unmittelbar beteiligt. Ein Zusammenhang zwischen TLR-Aktivierung und schneller integrinvermittelter Leukozytenrekrutierung im Rahmen einer Immunantwort auf eine Infektion ist noch nicht ausreichend erklärt.

Ebenso unklar ist die Regulation von DEL-1. Durch Vorarbeiten unserer Kooperationspartner (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Triantafyllos Chavakis, Direktor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Dresden) konnte bereits TLR2 als möglicher Aktivator einer Integrin-vermittelten Leukozytenadhäsion ermittelt werden. Ebenso wurde DHEA

als ein die TLR2/4 und DEL-1 Expression beeinflussender Faktor identifiziert. Unsere Hypothese war nun, dass nach Applikation eines TLR2 Agonisten eine schnelle Zunahme der Leukozytenadäsion zu beobachten ist. Die Vorbehandlung mit DHEA und nachfolgende Stimulierung mit LPS sollte eine verminderte Leukozytenadhäsion im Vergleich zu nicht mit DHEA vorbehandelten Mäusen zeigen.

Ziel dieser Arbeit war es somit, die Auswirkungen einer TLR2 Stimulation sowie den Einfluss von DHEA auf die Leukozytenadhäsion *in vivo* im Mausmodell zu erfassen mit dem Ziel, unsere Hypothese experimentell zu überprüfen.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Wild-Typ Mäuse der Kolonie *C57BL/6NRj*, im Alter von 10-30 Wochen und einem Gewicht von 20-40 g. Diese erhielten wir von Janvier Labs (Saint-Berthevin, Frankreich). Die Versuchstiere befanden sich stets unter veterinärmedizinischer Betreuung des Walter Brendel Zentrums für experimentelle Medizin. In einem Plastik-Käfig (Typ II, 370cm², Tecniplast GmbH, Deutschland) mit Holzeinstreu wurden die Versuchstiere bei simuliertem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus und einer Temperatur von 22 ± 2 °C sowie relativen Luftfeuchtigkeit von 54-58% gehalten. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und autoklavierten Futterpellets. Die Tierversuche wurden gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes i.d.F. vom 25.05.1998 (BGBl I S. 1105) nach Erteilung der Genehmigung (Gz:55.2-1-54-2532-149-10) durch die Regierung von Oberbayern durchgeführt. Nach den Experimenten wurden die Tiere unmittelbar mittels zervikaler Dislokation getötet.

2.2 Untersuchung der Leukozytenrekrutierung anhand des Cremaster-Modells der Maus

Alle intravital mikroskopischen Versuche wurden anhand des Cremaster-Modells der Maus durchgeführt. Daher sei dies im Allgemeinen nachfolgend beschrieben. Die experimentellen Rahmenbedingungen entsprachen denen wie von Sperandio et al. [38] beschrieben. Aufgrund der Bedeutung der Tageszeit für die Leukozytenrekrutierung [82], wurden sämtliche Versuche zwischen 9:00 und 18:00 Uhr durchgeführt. Die chirurgische Präparation wurde unter Zuhilfenahme von mikrochirurgischem Instrumentarium (F.S.T. Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

2.2.1 Präparation der Arteria carotis sowie Tracheotomie

Für die Narkose der Maus wurde eine Kombination aus Ketamin (Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland) und Xylazin (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) intraperitoneal injiziert (0.1ml/8gKG der Maus, detaillierte Zusammensetzung siehe Tabelle 1). Vorab erfolgte hierfür die Ermittlung des

Gewichts der Maus mit einer Feinwaage (A&D GR-202; A&D Instruments, Ltd, Abingdon, Oxfordshire, Großbritannien).

	Wirkstoff	Menge
Ketavet (10mg/ml)	Ketamin	0.1 ml
Rompun (2%)	Xylazin	0.1 ml
NaCl	NaCl 0.9%	0.8 ml

Tabelle 1: Wirkstoffkombination zur Narkose der Maus.

Während des Versuchs wurde die ausreichende Narkosetiefe durch wiederholte Nachinjektionen von etwa einem Zehntel der Initialdosis gewährleistet. Nach Sicherstellung einer adäquaten Narkosetiefe (Fehlen des Zwischenzehenreflexes), wurde die Maus in Rückenlage auf eine Wärmeplatte (35°C) verbracht und die vorderen Extremitäten mit Klebeband fixiert. Der Kopf wurde mittels Fadenfixierung an den Incisivi des Oberkiefers sowie der Wärmeplatte in überstreckter Position fixiert. Dies erleichterte die nachfolgende Präparation der A. carotis und Trachea. Die nun folgenden Schritte wurden unter dem Stereomikroskop durchgeführt (Olympus SZ61 oder Olympus SZX7). Durch Entfernen der Haut im Bereich der ventralen Halsregion wurden die Speicheldrüsen sichtbar (Glandulae mandibulares/submandibulares). Nach stumpfer Präparation wurden diese nach lateral verlagert, um eine bessere Sicht auf Trachea und A. carotis zu gewinnen.

Nach Vorlegen zweier Fäden unter die Trachea wurde eine Inzision zwischen den Ringknorpeln der Trachea durchgeführt und ein Polyethylenschlauch (ID: 0.76 mm; OD: 1.22 mm) eingeführt und mit den Fäden fixiert.

Dies diente zur Sicherstellung des Atemwegs. Des Weiteren werden durch Verringerung des Totraumes die bildqualitätsbeeinträchtigende Atemexkursionen reduziert. Nach stumpfer Präparation und leichtem Spannen der A. carotis unter Verwendung eines caudal angebrachten Haltefadens wurde das Gefäß inzidiert, ein Polyethylenschlauch (ID: 0.28 mm; OD: 0.61 mm) eingeführt und mittels vorgelegter Fäden fixiert. Nachfolgend wurde die vorab cranial der Inzision gesetzte Gefäßklemme geöffnet. Der Polyethylenschlauch war mit einer Spritze mit NaCl-Heparin Lösung (20 U/ml Heparin, Ratiopharm, Ulm, Deutschland)

verbunden. Durch Aspiration von Blut konnte die korrekte Lage des Schlauches verifiziert werden.

2.2.2 Präparation des Musculus Cremaster

Hiernach wurde die Maus auf eine mikroskopfähige, eigens für das Cremaster-Modell gefertigte Plattform aus Acrylglas (Eigenanfertigung des Walter Brendel Zentrums) gelegt. Die Präparation wurde dann modifiziert nach der Erstbeschreibung von Baez [83] durchgeführt.

In Rückenlage wurde das Skrotum durch eine Inzision eröffnet und der Hoden mit umgebenden Hüllen auf das transparente Plateau der Acrylglas-Platte mobilisiert und fixiert. Um eine Austrocknung des freigelegten Hodens zu verhindern, wurde dieser mit einem vorgewärmten und begasten (95% N₂, 5% CO₂) Superfusionspuffer (siehe Tabelle 2, modifiziert gemäß [84, 85]) feucht gehalten. Die bindegewebige, den Hoden umhüllende Schicht, wurde ohne Traumatisierung des Musculus cremaster entfernt und dieser, an einer gefäßarmen Stelle eröffnet und über das transparente Plateau der Platte aufgespannt. Im Anschluss an den mikrochirurgischen Teil wurde durch eine Blutabnahme aus dem Katheter in der A. carotis die systemische Leukozytenzahl (WBC) bestimmt. Hierfür wurden ca. 50µl Blut in ein heparinisiertes Röhrchen (BD Mikrotainer K2E Tubes; Becton, Dickinson and Company, USA) entnommen und in einem Analysegerät ausgewertet (IDEXX ProCyte Dx, IDEXX Europe B.V.). Die Plattform mit der daraufliegenden Maus wurde nun zu dem für die Versuchsaufzeichnung vorgesehenen Mikroskop transferiert und das entsprechende Experiment gestartet.

Zusammensetzung	Molarität [mM]
NaCl	131.89
KCl	4.68
CaCl ₂	2.66
MgCl ₂	2.13
NaHCO ₂	18

Tabelle 2: Inhaltsstoffe und deren Molarität (in mM) des Superfusionspuffers in finaler Konzentration.

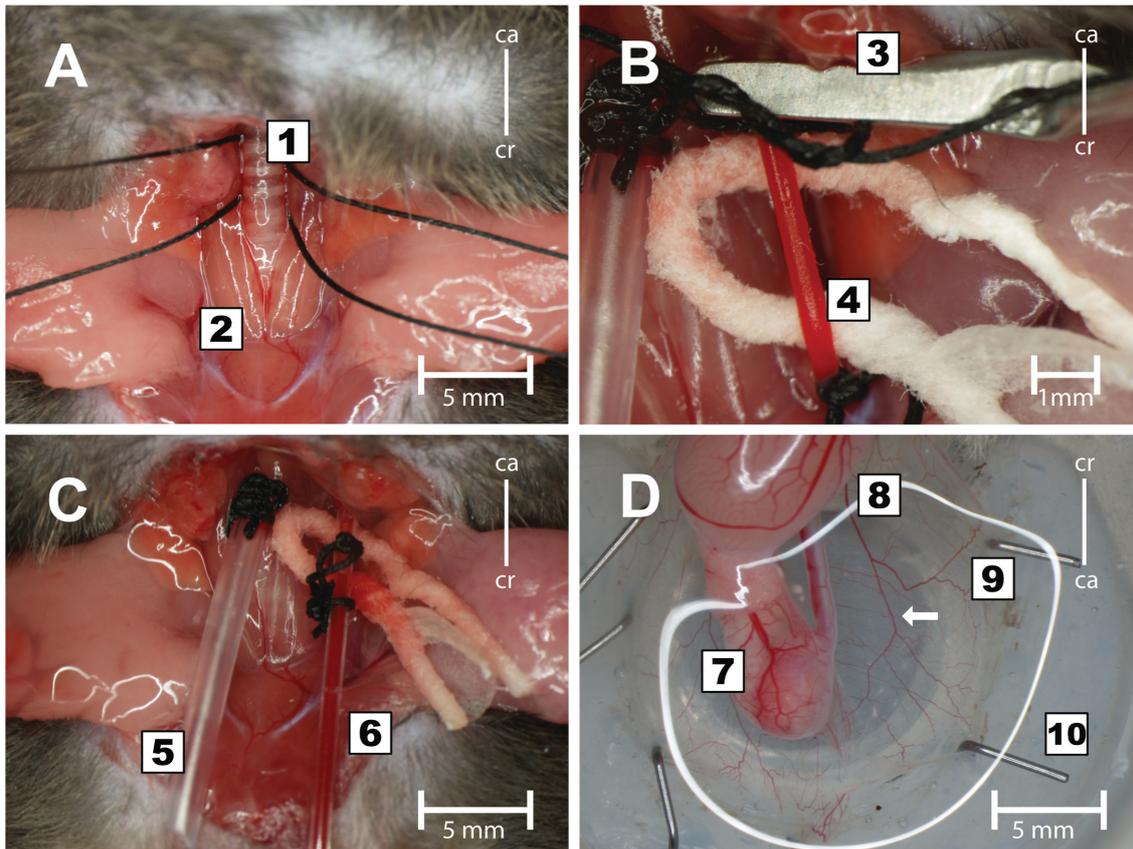


Abbildung 4: Präparation der Maus. **A:** Freigelegte Trachea mit vorgelegten Haltefäden zur anschließenden Fixierung der Trachealkanüle; **1:** Trachea; **2:** umgebende Muskulatur; **B:** Freipräparierte A. carotis mit caudal gesetzter Gefäßklemme und cranialer Ligation sowie untergelegtem Küchenpapier zum Anheben der A. carotis; **3:** Gefäßklemme; **4:** A. carotis; **C:** Situs nach Tracheotomie und Katheterisierung; **5:** Trachealtubus; **6:** Kanülierte A. carotis; **D:** Auf Acrylglas-Platte fixierter M. cremaster, **7:** Epididymis; **8:** Testis; **9:** Fixierter M. cremaster mit sichtbaren Gefäßen (Pfeil) und Superfusionspuffer zur Befeuchtung; **10:** Silikonring zur Fixierung des M. cremaster; **ca:** Caudal; **cr:** Cranial.

2.2.3 Intravitalmikroskopie

Die Dauer der kompletten mikrochirurgischen Präparation variierte zwischen 20 - 40 Minuten, abhängig von der Erfahrung des Präparierenden sowie der spezifischen anatomischen Gegebenheiten.

Alle Experimente wurden unter dem gleichen Mikroskop durchgeführt (Olympus BX51 WI), welches mit einem 40x Objektiv (Olympus Mplan FI/RI; 0.8 NA; Wasserobjektiv) und einer CCD Kamera (KAPPA CF 8 HS) ausgestattet war. Während des Versuchs wurde eine stete Superfusion durch eine Schlauchpumpe (Stöckert Instrumente, München, Deutschland) mit dem erwärmten

Superfusionspuffer gewährleistet. Die postkapillären Venolen wurden für mindestens eine Minute mit Virtual-Dub (Version 1.9.11) sowie einem VC-Recorder (Panasonic Video Cassette Recorder AG-5700; Panasonic Europe GmbH, Wiesbaden, Deutschland) als Backup aufgezeichnet. Die Blutflussgeschwindigkeit des aufgenommenen Gefäßes wurde vor und nach der Aufnahme gemessen. Dies geschah mittels einer dualen Photodiode, welche in Verbindung mit einer Auswertungssoftware ein unmittelbares Ablesen der entsprechenden Flussgeschwindigkeit möglich machte (on-line cross correlation program, Circusoft Instrumentation, Hockessin, USA; ursprünglich entwickelt von Wayland & Johnson 1967). Es wurden ausschließlich Gefäße mit einer Blutflussgeschwindigkeit zwischen 800 und 5500 $\mu\text{m/s}$ ausgewählt, da eine Mindestflussgeschwindigkeit, respektive Scherkraft an der Gefäßwand, notwendig ist, um ein Rollen von Leukozyten erst möglich zu machen [34, 86, 87]. Der Gefäßdurchmesser betrug 25-45 μm .

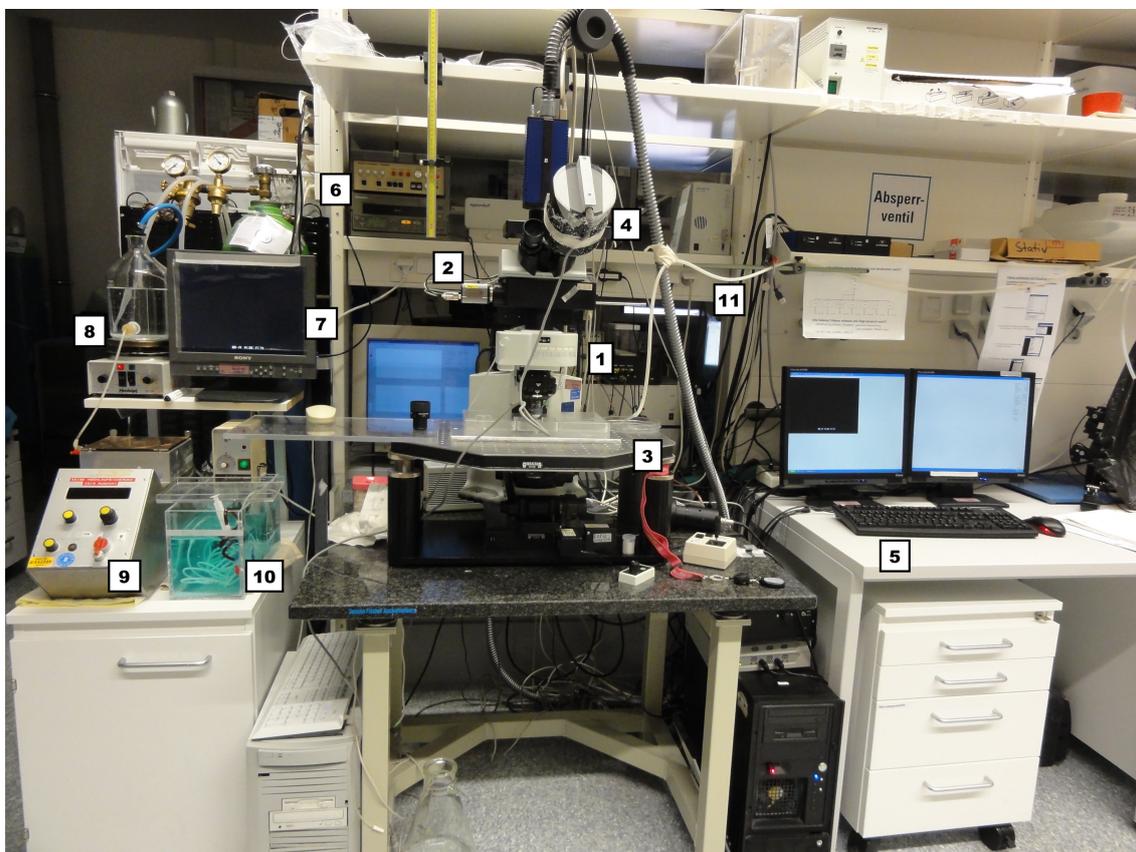


Abbildung 5: Intravitalmikroskop. **1:** Olympus BX51 WI Mikroskop ausgestattet mit einem 40x Objektiv (Olympus Mplan FI/RI; 0.8 NA; w) **2:** CCD Kamera (Kappa CF 8 HS) **3:** motorisierte xy Mikroskop-Bühne **4:** abnehmbare duale Photodiode zur Messung der Blutflussgeschwindigkeit **5:** Computer zur digitalen Aufnahme **6:** Videorekorder mit Timer **7:** Monitor für das Mikroskopsignal **8:** Superfusionspuffer mit Wärmeplatte, konstante Gaseinleitung von 95% N₂, 5% CO₂ **9:**

Schlauchpumpe für den Superfusionspuffer **10**: erwärmtes Wasserbad (Julabo EM; Julabo, Seelbach, Deutschland) für den Superfusionspuffer **11**: Absaugung für den Superfusionspuffer

2.4 TLR2 Stimulation im Trauma-Modell

Die in **2.2.2** beschriebene Verlagerung des M. Cremasters nach extern (Trauma-Modell) führt zur einer Mobilisation von P-Selectin an die luminale Seite des Endothels; dieser Vorgang dauert einige Minuten, da P-Selectin in Weibel-Palade Körperchen [6, 88] in Endothelzellen gespeichert ist. Deshalb wurde auf gleiche Untersuchungsbedingungen geachtet und der externalisierte M. Cremaster für 15-20 Minuten unter Superfusion belassen. Erst dann wurde mit den nachfolgend beschriebenen Schritten fortgefahren. Um zu sehen, ob eine Stimulation von TLR2/1 zu einer Änderung der Leukozytenverhaltens *in vivo* führt, injizierten wir via Carotis-Katheter 250 ng des TLR2-Agonisten Pam3CSK4 (InvivoGen, San Diego, CA, USA) intraarteriell, in den Kontrollgruppen wurden 250ng des TLR9 Agonisten ODN1668 (InvivoGen, San Diego, CA, USA) injiziert, je in 199 µl NaCl 0,9% (Gesamtmenge 200 µl). Nachfolgend wurde die Minute 1-2 nach Injektion aufgezeichnet. Bei Pam3CSK4 handelt es sich um ein synthetisches, triacyliertes Lipoprotein, welches dem acylierten Amino-Terminus von bakteriellen Lipoproteinen entspricht und so u. a. ein potenter Aktivator des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-κB ist [89]. Die Erkennung von Pam3CSK4 erfolgt durch TLR2, welcher mit seiner cytoplasmatischen Domäne mit TLR1 dimerisiert und so letztlich die NF-κB aktivierende Signalkaskade initiiert [90]. ODN1688 ist ein Oligonucleotid, dessen repetitive CpG-Motive (nichtmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide) sind bei murinen Zellen als TLR9 Agonist immunstimulatorisch wirksam [91].

2.4 DHEA mit Stimulation durch LPS

2.4.1 DHEA Versuchsaufbau

Vor Intravitalmikroskopie wurden 2 mg Dehydroepiandrosteron (Sigma-Aldrich, München, Deutschland, gelöst in 22.5 µl Ethanol + 477.5 µl 1% BSA/PBS) intraperitoneal injiziert. Dreißig Minuten nach Injektion von DHEA wurden 50 ng Lipopolysaccharid (LPS, *Escherichia coli* O111:B4; Sigma-Aldrich, München,

Deutschland) intrascrotal appliziert. Vier Stunden nach Injektion von DHEA wurden die intravitalmikroskopischen Untersuchungen, nach M. Cremaster-Präparation, wie in **2.2.2** beschrieben, begonnen.

Minute	Maßnahme
0	DHEA/Kontrolle i.p.
30	LPS i.s.
180	Narkose
200	Präparation
240	Versuch: Intravitalmikroskopie bzw. whole mounts

Tabelle 3: Zeitlicher Ablauf der Versuche.

2.4.2 Perivaskuläre Leukozyten

Um den möglichen Effekt von DHEA auf die Extravasation von Leukozyten zu untersuchen, wurde der M. cremaster mit 4% PFA (Paraformaldehyd, in 1x PBS) fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Der Versuchsaufbau war wie in **Tabelle 3** beschrieben, die Tracheotomie sowie die Katheterisierung der A. carotis wurden jedoch nicht durchgeführt, da dies für die Frage der Extravasation nicht notwendig war. Die Präparation des M. Cremaster wurde wie in **2.2.2** beschrieben durchgeführt. Nach Fixierung des M. cremaster auf der Mikroskop-Plattform erfolgte eine Fixierung mit 4% PFA (4°C). Hiernach wurden Testis und Epididymis vorsichtig vom M. cremaster abgelöst, der M. cremaster schließlich abgetrennt und auf einen Objekträger verbracht. Nachdem ein Antrocknen der Außenränder des M. cremaster auf dem Objekträger sichtbar war, wurde dieser bis zur Färbung (mindestens über Nacht) in 4% PFA bei 4°C gelagert. Für die Färbung wurde der Cremaster aus der PFA-Lösung entnommen und 3 mal für 5 Minuten in Phosphatpuffer (0,1M, pH 7,4) mit 5% Ethanol gewaschen. Nach vorsichtigem Trocknen wurden die Präparate mit Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblaulösung; Merck, Darmstadt, Deutschland) für etwa 3 Minuten gefärbt. Danach wurde die überschüssige Lösung unter fließendem, demineralisiertem Wasser abgewaschen, sodass in einem weiteren Schritt eine Differenzierung in 0,03% Essigsäure für 20-30 Minuten, bis rötliche gefärbte Zellstrukturen sichtbar wurden, durchgeführt werden konnte. Nun erfolgte die Dehydrierung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Ethanol, je 1

Minute), danach in Xylene (zweimalig, je 5 Minuten) bis schließlich eine Einbettung mit Eukitt®-Medium erfolgte (O. Kindler GmbH; Freiburg, Deutschland).

2.5 Datenanalyse

2.5.1 Intravitalmikroskopie

Anhand der aufgezeichneten Videos wurden verschiedene Parameter erhoben und berechnet (gemäß [38]). Abbildung 6 zeigt einen Ausschnitt aus einem Video. Sowohl rollende als auch adhärente Leukozyten sind in der Venole sichtbar. Mit der Software Fiji (ImageJ) wurden Gefäßdurchmesser und -länge sowie auch die Rollgeschwindigkeit der Leukozyten gemessen. Zur Ermittlung des Gefäßdurchmessers wurde das entsprechende Gefäß an drei unterschiedlichen Stellen gemessen und ein Mittelwert gebildet. Es wurden ausschließlich Gefäße mit einem Durchmesser zwischen 25 – 45 μm analysiert.

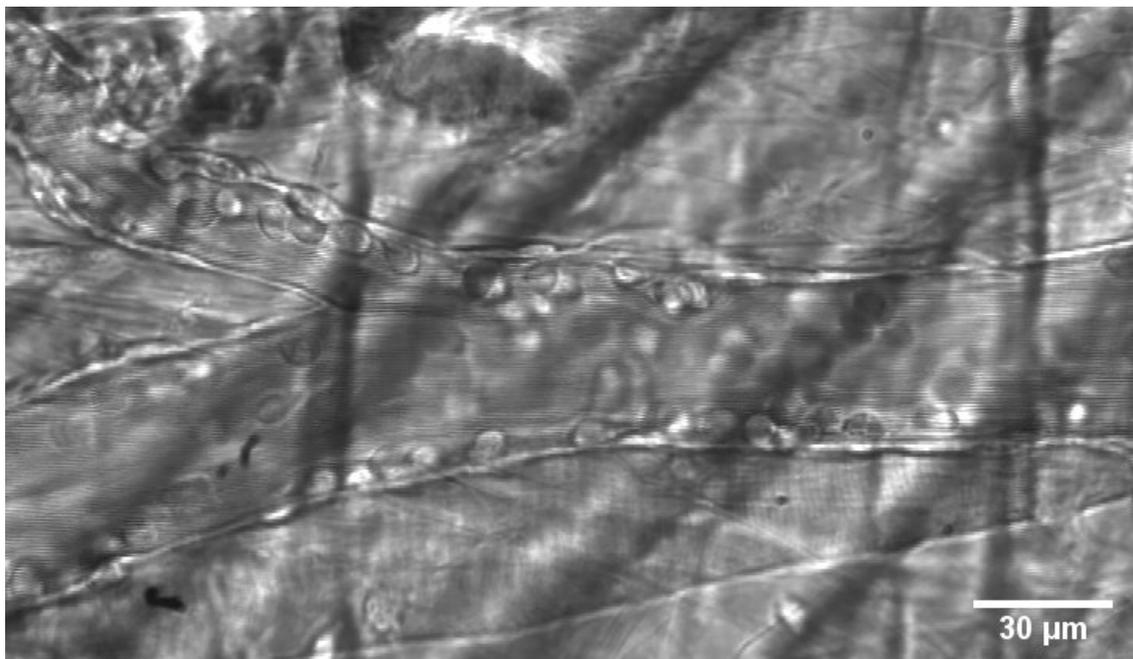


Abbildung 6: Ausschnitt aus einem aufgezeichneten Video. Die Venole ist deutlich zu erkennen, in ihr sind rollende und adhärente Leukozyten sichtbar. Die Venole ist von Bindegewebe und Muskulatur umgeben.

Anhand der Software Fiji plug-in MTtrackJ wurden die Rollgeschwindigkeiten der Leukozyten ermittelt [92]. Hierfür wurden nach Möglichkeit zehn verschiedene Leukozyten pro Gefäß erfasst. Die gemessenen Werte wurden dann prozentual in

verschiedene Geschwindigkeitsgruppen zusammengefasst (z.B. $2 \mu\text{m/s} \leq x < 4 \mu\text{m/s}$; x ist hierbei der Anteil der Zellen innerhalb des Intervalls). Des Weiteren wurde die Anzahl der rollenden Leukozyten mit dem VLC Player erfasst, definiert als die innerhalb einer Minute eine gezogene Linie passierenden Leukozyten (= leukocyte rolling flux; [38]). Mit diesem Wert konnte nun der Anteil an rollenden Leukozyten berechnet werden:

$$\text{Rolling Flux Fraction} = \frac{\textit{leukocyte rolling flux}}{WBC \cdot (v_{bl}/1.6) \cdot r^2 \cdot \pi}$$

Abbildung 7:

v_{bl} : Blutstromgeschwindigkeit des entsprechenden Gefäßes; **1.6**: Korrekturfaktor zur Umrechnung der gemessenen Blutstromgeschwindigkeit in der Gefäßmitte in die Durchschnittsblutstromgeschwindigkeit des Gesamtgefäßes [93]; r : Durchschnitt des Gefäßradius

Darüberhinaus wurden in jeder Venole die adhärennten Leukozyten erfasst. Als adhärennte Leukozyten wurden Zellen definiert, welche sich innerhalb einer Minute um weniger als einen Zelldurchmesser fortbewegten. Über die so ermittelbaren adhärennten Zellen pro Gefäßoberfläche kann somit die Adhäsionseffizienz (der Anteil der adhärennten Zellen in Bezug auf den WBC) berechnet werden.

$$\text{Adhäsionseffizienz} = \frac{\textit{Adhärennte Zellen}}{d \cdot l \cdot \pi} \cdot WBC^{-1}$$

Abbildung 8:

d : mittlerer Gefäßdurchmesser; l : Länge des Gefäßes

Obwohl Neutrophile die ersten Leukozyten sind, welche an den Ort der Entzündung rekrutiert werden [94], folgen andere Leukozyten-Subpopulationen auf ähnlichem Weg [2]. Da aufgrund der verwendeten Intravitalmikroskopie keine Unterscheidung von Subpopulationen möglich war, wurde für die Berechnung stets der WBC einbezogen. Auch Scherkräfte beeinflussen die Leukozytenrekrutierung [95, 96a, 97b], sodass auch die an der Gefäßwand wirkenden Scherraten berechnet wurden.

Parameter	Definition	Einheit
Anteil rollender Leukozyten im Blutstrom	Rollende Leukozyten im Blutstrom geteilt durch die absolute Leukozytenzahl (WBC)	%
Rollgeschwindigkeit	Rollgeschwindigkeit der Leukozyten mit intermittierendem/kontinuierlichem Kontakt mit dem Endothel	$\mu\text{m/s}$
Adhärente Zellen/mm²	Anzahl der adhärennten Zellen pro Gefäßoberfläche (luminal)	Zellen/mm ²
Adhäsionseffizienz	Anzahl adhärennter Zellen pro mm ² geteilt durch die absolute Leukozytenzahl (WBC)	
Wandscherrate	$\gamma_w = 4.9 (8v_{bl}/d_{Gefäß})$ [98, 99]	s^{-1}

Tabelle 4: Wichtige Parameter für die Bewertung von Leukozyten Rollen durch Intravitalmikroskopie, nach Sperandio et al. (2006)

2.5.2 Extravasation von Leukozyten

Die mikroskopische Analyse der Giemsa-gefärbten und auf Objektträgern fixierten M. Cremaster wurde mir einem Zeiss Axioskop 40 microscope durchgeführt (ausgestattet mit zwei Zeiss Objektiven; 40x EC-Plan-Neofluar, Öl, NA: 1.3; sowie 100x A-Plan, Öl, NA: 1.25). Dieses war überdies mit einer CCD Kamera versehen (SPOT Insight color). Als Software diente SPOT Basic (SPOT Imaging, a division of Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, USA), zur Fotodokumentation der Gefäße und Ausmessung dieser. Unter tausendfacher Vergrößerung (100x Objektiv) wurden je 10 Gefäße pro Cremaster analysiert. Der Gefäßdurchmesser des entsprechenden Gefäßes wurde an drei Stellen gemessen und hieraus ein Mittelwert gebildet. Da das Sichtfeld des Mikroskops größer als das der Kamera war, wurde das mikroskopische Sichtfeld vorab mittels eines Objektmikrometers vermessen und die Gefäße entsprechend des Sichtfeldes ausgewählt (230 μm). Darüber hinaus wurde versucht, dass sich möglichst kein weiteres Gefäß innerhalb des Sichtfeldes sowie in der näheren Umgebung befand. So sollte eine unklare Zuordnung von ausgewanderten Leukozyten zu einem entsprechenden Gefäß

vermieden werden (**siehe Abb.9**). Alle perivaskulären Leukozyten innerhalb des Sichtfeldes wurden notiert. Eine weitere Subtypisierung wurde anhand des Hämatologischen Bildbandes von McGarry [100] vorgenommen.

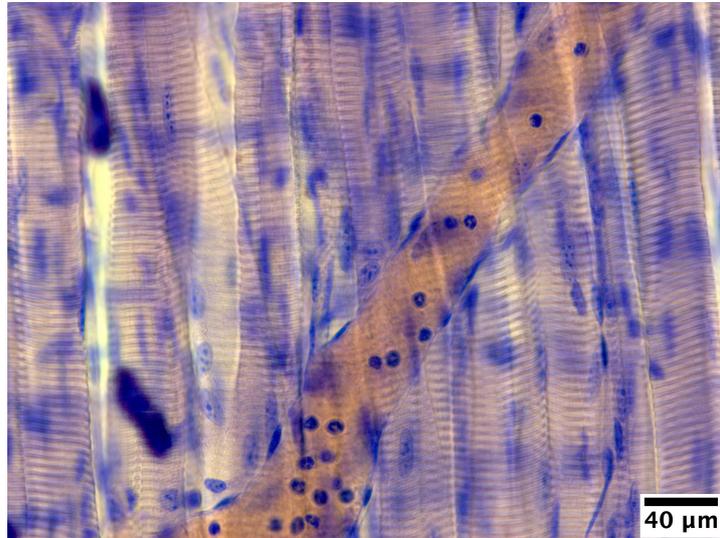


Abbildung 9: Giemsa gefärbter Cremaster Muskel (40x Vergrößerung). Sichtbar ist eine Venole mit umgebender Muskulatur und Bindegewebe.

3. Ergebnisse

Sowohl der Einfluss einer TLR2 Aktivierung wie auch der Einfluss von DHEA auf die Leukozytenadhäsion wurden im M. Cremaster – Modell der Maus untersucht. Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Experimente zu gewährleisten, wurde auf vergleichbare hämodynamische und mikrovaskuläre Parameter geachtet.

3.1 TLR2 induzierte Leukozytenadhäsion in Cremastermuskel - Venolen *in vivo*

Die Auswirkungen einer TLR2 Aktivierung *in vivo* untersuchten wir mittels des M. Cremaster – Modells.

3.1.1 Adhäsionseffizienz

Hier zeigte sich eine Minute nach Injektion des TLR2 Liganden eine signifikant erhöhte Leukozytenadhäsionseffizienz (Anzahl der adhärenen Leukozyten/systemische Leukozytenanzahl), im Vergleich zur Leukozytenadhäsionseffizienz vor der Injektion (**Abb. 10 A**). Ebenso fand sich die absolute Anzahl der adhärenen Leukozyten in der Minute 1-2 nach Injektion des TLR2 Liganden signifikant erhöht (**Abb. 10 B**). Dies legt nahe, dass das Signaling via TLR2 zu einem schnellen Leukozyten-Arrest *in vivo* führt.

3.1.2 Leukozytenrollen

Überdies konnte eine signifikant reduzierte Leukozyten-Rollgeschwindigkeit nach Stimulation mit dem TLR2 Agonist beobachtet werden (**Abb. 10 D**). Dies impliziert einen Übergang vom rollenden Zustand in den einer festen Adhäsion. Dem Gegenüber kam es zu keiner signifikanten Änderung des Anteils rollender Leukozyten vor und nach Injektion des TLR2 Liganden (**Abb. 10 C**). Neben der bekannten β_2 -Integrin abhängigen festen Leukozytenadhäsion [101] zeigte sich auch in vorangegangenen Arbeiten, dass der Übergang vom Rollen zur festen Leukozytenadhäsion von einer intermediären Aktivierung des β_2 -Integrins LFA-1 begleitet ist, welche eine Reduktion der Leukozytenrollgeschwindigkeit *in vivo* zur Folge hat [45].

Somit beschreiben unsere *in vivo* Daten unterstützt von *in vitro* Daten [102] eine neue schnelle Aktivierung einer β_2 -Integrin abhängigen Leukozytenadhäsion nach TLR2 Ligation.

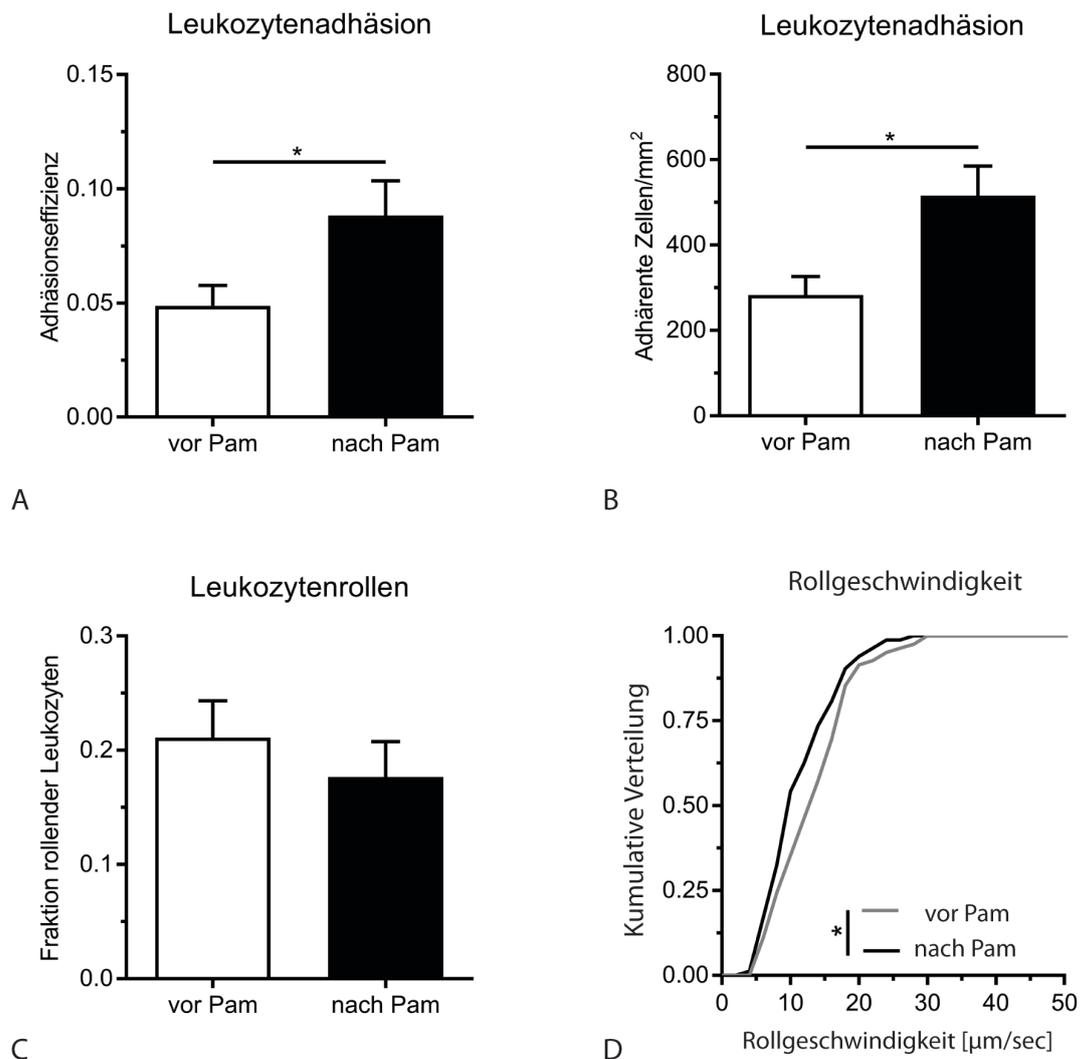


Abbildung 10: Die Adhäsion von Leukozyten *in vivo* im M. Cremaster – Modell wird durch Applikation des TLR2 Agonisten Pam3CSK4 verstärkt. **(A)** Leukozytenadhäsionseffizienz (Anzahl adhärenter Zellen pro mm² geteilt durch die absolute Leukozytenzahl (WBC)), **(B)** Anzahl der adhärenen Zellen pro Gefäßoberfläche in mm² (luminal), **(C)** Fraktion der rollenden Leukozyten im Blutstrom (rollende Leukozyten im Blutstrom geteilt durch die absolute Leukozytenzahl (WBC)) und **(D)** Leukozytenrollgeschwindigkeit in Venolen des ausgelagerten M. cremaster vor und nach (min 1-2) Injektion des TLR2 Agonisten Pam3CSK4. Die Ergebnisse werden gezeigt als mean \pm SEM in A-C (* $p < 0.05$, n = 9 Mäuse pro Gruppe). Die Rollgeschwindigkeiten in D zeigen ein kumulatives Histogramm 82 analysierter Leukozytenrollgeschwindigkeiten vor und 83 Leukozytenrollgeschwindigkeiten Minute 1-2 nach Injektion von Pam3CSK4. Als statistischer Test wurde der unpaired t-Test verwendet.

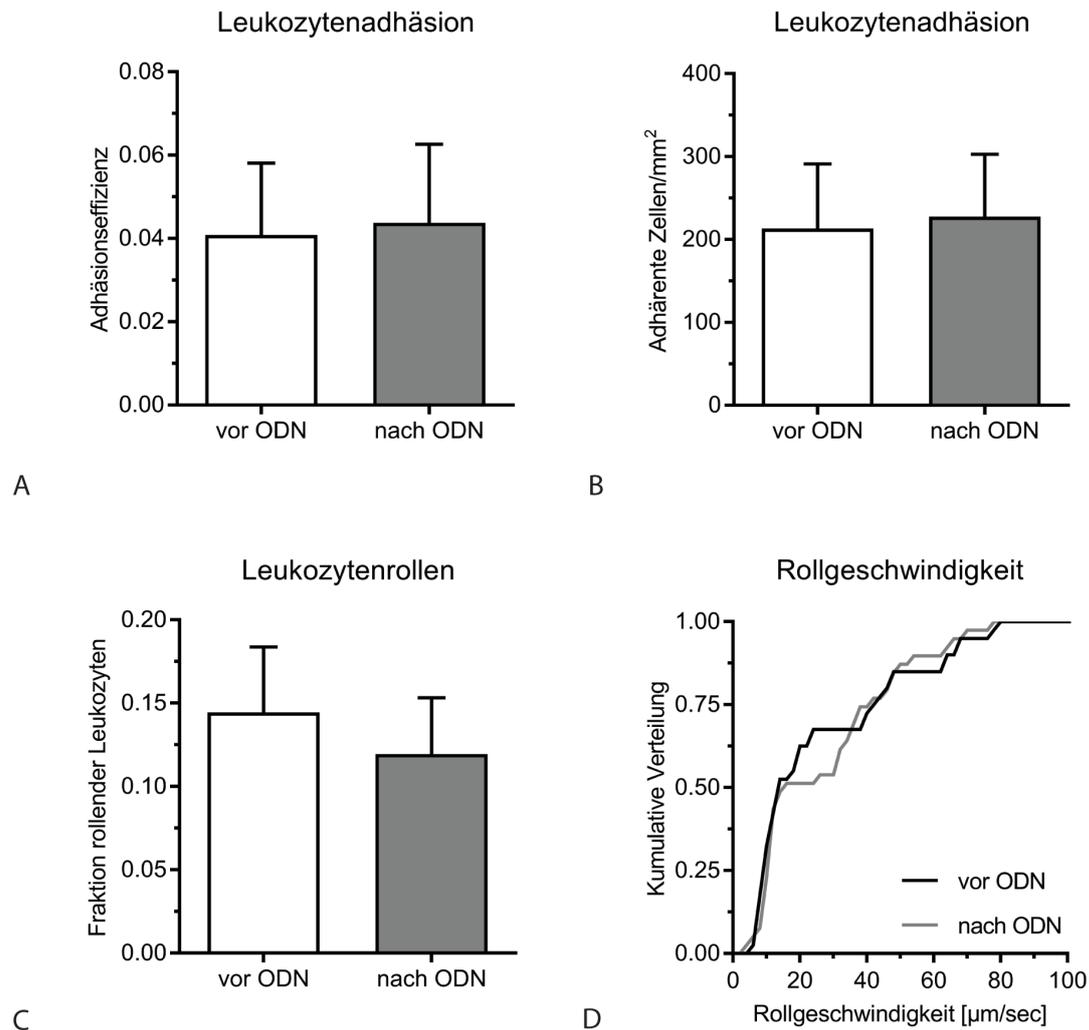


Abbildung 11: Die Adhäsion von Leukozyten in vivo im M. Cremaster – Modell wird durch Applikation des TLR9 Agonisten ODN1668 nicht verändert. **(A)** Leukozytenadhäsionseffizienz (Anzahl adhärenter Zellen pro mm² geteilt durch die absolute Leukozytenzahl (WBC)), **(B)** Anzahl der adhärenter Zellen pro Gefäßoberfläche in mm² (luminal), **(C)** Fraktion der rollenden Leukozyten im Blutstrom (rollende Leukozyten im Blutstrom geteilt durch die absolute Leukozytenzahl (WBC)) und **(D)** Leukozytenrollgeschwindigkeit in Venolen des ausgelagerten M. cremaster vor und nach (min 1-2) Injektion des TLR9 Agonisten ODN1668. Die Ergebnisse werden gezeigt als mean ± SEM in A-C (* p< 0.05, n = 4 Mäuse pro Gruppe). Die Rollgeschwindigkeiten in D zeigen ein kumulatives Histogramm 40 analysierter Leukozytenrollgeschwindigkeiten vor und 39 analysierter Leukozytenrollgeschwindigkeiten Minute 1-2 nach Injektion von ODN1668. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Als statistischer Test wurde der unpaired t-Test verwendet.

	Blutflussgeschwindigkeit (µm/s)	Scherrate (s ⁻¹)	WBC (Zellen/µl)
Vor Pam	1367 ± 113	1012 ± 80.45	6586 ± 665.8
Nach Pam	1222 ± 105.1	901 ± 69.45	6492 ± 985.3

Tabelle 5: Hämodynamische Parameter vor und nach Injektion von Pam. Die Ergebnisse werden gezeigt als mean \pm SEM. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Parameter zwischen den Gruppen (unpaired t-Test).

	Blutflussgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	Scherrate (s^{-1})	WBC (Zellen/ μl)
Vor ODN	1650 \pm 322.7	1302 \pm 268.3	6266 \pm 564.4
Nach ODN	1933 \pm 319.8	1413 \pm 258.1	6266 \pm 564.4*

Tabelle 6: Hämodynamische Parameter vor und nach Injektion von ODN. * Der WBC wurde nur vor Injektion erfasst. Die Ergebnisse werden gezeigt als mean \pm SEM. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Parameter zwischen den Gruppen (unpaired t-Test).

3.2 Einfluss von DHEA auf die Leukozytenadhäsion *in vivo*

Um den Einfluss von DHEA auf die Leukozytenadhäsionen *in vivo* zu untersuchen, wurde DHEA intraperitoneal injiziert. Nach 30 Minuten erfolgte als inflammatorischer Stimulus eine Injektion von LPS intraskrotal.

3.2.1 Adhäsionseffizienz und adhärenente Zellen

In der Gruppe der Mäuse, welche mit DHEA i.p. vorbehandelt wurden, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Adhäsionseffizienz im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne vorherige Applikation von DHEA (**Abb.12A**), die adhärenente Zellen/ mm^2 zeigten sich ebenso verringert, jedoch nicht signifikant (**Abb.12B**).

3.2.2 Fraktion der rollenden Leukozyten im Blutstrom

Auch die Fraktion der rollenden Leukozyten im Blutstrom war konsistent mit der die Adhäsion vermindernenden Eigenschaft in der DHEA Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (**Abb.12C**).

3.2.3 Rollgeschwindigkeit

Konkludent hierzu fand sich die Rollgeschwindigkeit in der mit DHEA vorbehandelten Gruppe signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (**Abb.12D+E**).

Der WBC und auch die hämodynamischen Parameter wie Scherrate Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Vergleichsgruppen (**Tabelle 5**).

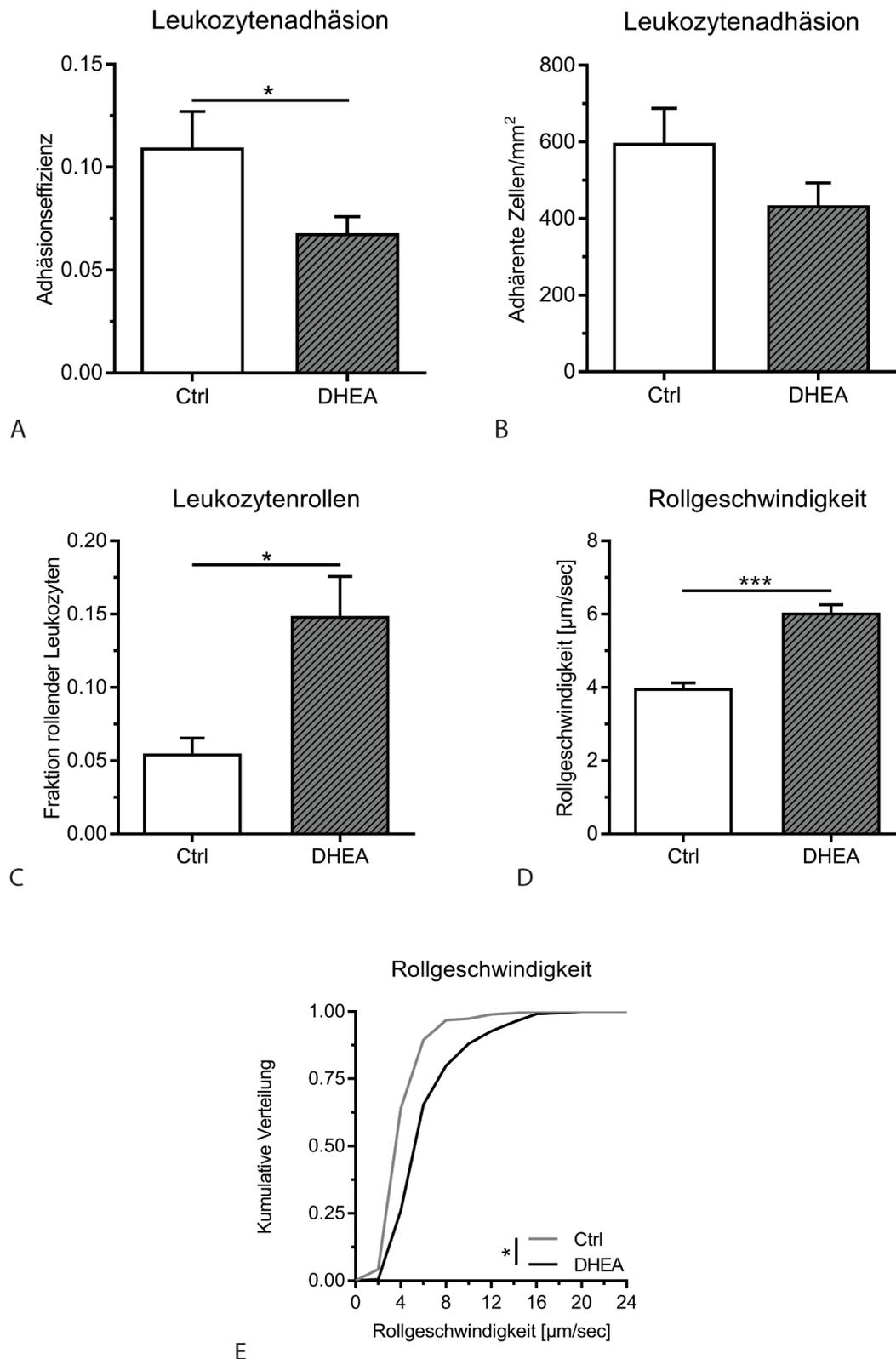


Abbildung 12: Die Adhäsion von Leukozyten in vivo im M. Cremaster – Modell wird durch Applikation von DHEA vermindert. **(A)** Leukozytenadhäsionseffizienz (Anzahl adhärenter Zellen pro mm² geteilt durch die absolute Leukozytenzahl (WBC)), **(B)** Anzahl der adhärenter Zellen pro Gefäßoberfläche in mm² (luminal). **(C)** Fraktion der rollenden Leukozyten im Blutstrom (rollende Leukozyten im Blutstrom geteilt durch die absolute Leukozytenzahl (WBC)) und **(D)** Leukozytenrollgeschwindigkeit in Venolen des ausgelagerten M. cremaster ohne und mit Injektion

von DHEA. Die Ergebnisse werden gezeigt als mean \pm SEM in A-D (***) $<$ 0,0001, * $p <$ 0.05, $n = 6$ Mäuse pro Gruppe). Die Rollgeschwindigkeiten in E zeigen ein kumulatives Histogramm 189 (LPS) sowie 234 (LPS + DHEA) analysierter Leukozytenrollgeschwindigkeiten. Als statistischer Test wurde der unpaired t-Test verwendet.

	Gefäßdurchmesser (μm)	Blutfluss- geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	Scherrate (s^{-1})	WBC (Zellen/ μl)
Kontrolle	33.6 \pm 1.1	2019.0 \pm 132.8	1506.3 \pm 115.6	5423.3 \pm 464.1
DHEA	32.4 \pm 0.8	1747.8 \pm 104.6	1325.1 \pm 74.7	6233.3 \pm 569.1

Tabelle 7: Hämodynamische Parameter im M. cremaster der Maus nach Injektion von DHEA i.p. sowie LPS i.s.. Die Ergebnisse werden gezeigt als mean \pm SEM. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Parameter zwischen den Gruppen (unpaired t-Test).

3.2.4 Extravasation

Um potenzielle Unterschiede in der Extravasation von Leukozyten zu erfassen, wurden die in der Giemsa-Färbung sichtbaren, ausgewanderten Leukozyten ausgezählt. Die mikroskopische Auswertung der whole mounts zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Extravasation von Leukozyten, auch die weitere Spezifizierung in Leukozytensubpopulationen erbrachte diesbezüglich keine signifikanten Differenzen. Die Gefäßdurchmesser der analysierten Gefäße zeigten keine Unterschiede (DHEA= 41 Gefäße: 32,6 mm \pm 1 mm SEM; Kontrolle= 42 Gefäße: 33.9 mm \pm 0,7 mm SEM).

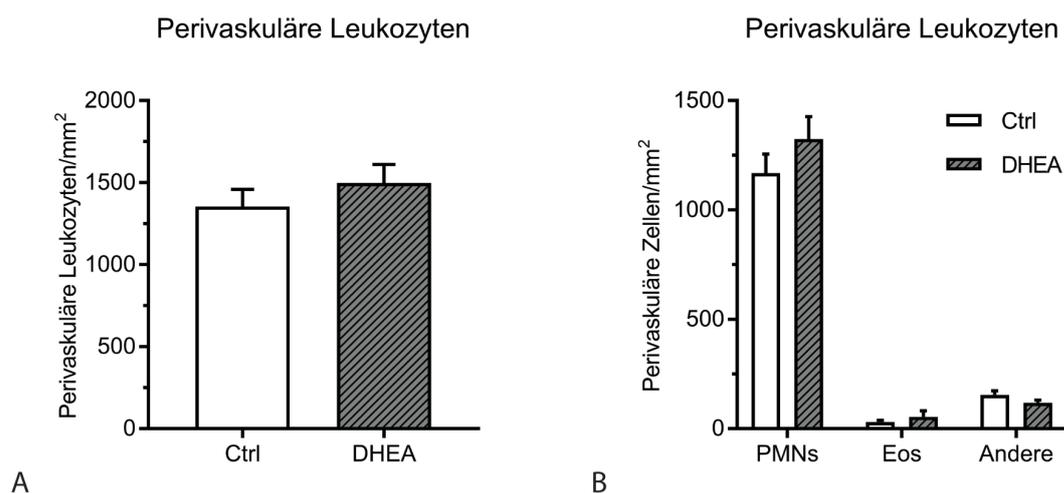


Abbildung 13: Perivaskulären Zellen nach DHEA + LPS Applikation vs. Kontrollen (Ctrl)[Zellen/mm²]; die Ergebnisse werden gezeigt als mean \pm SEM (n=6 Mäuse pro Gruppe). **A:** Perivaskuläre Leukozyten; **B:** Leukozytendifferenzierung, **Eos:** Eosinophile, **Andere:** Monozyten, Lymphozyten, Basophile. Als statistischer Test wurde ein unpaired t-Test (**A**) sowie two-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test (**B**) verwendet.

4. Diskussion

In den intravitalmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich nach Applikation des TLR2 Agonisten eine erhöhte Leukozytenadhäsionseffizienz wie auch eine erhöhte absolute Anzahl adhärenter Leukozyten. Die Leukozytenrollgeschwindigkeit fand sich hingegen vermindert. Die mit DHEA vorbehandelte Gruppe zeigte eine Reduktion der Adhäsionseffizienz im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hierzu konsistent fand sich die Fraktion der rollenden Leukozyten im Blutstrom wie auch die Leukozytenrollgeschwindigkeit in der mit DHEA vorbehandelten Gruppe erhöht.

4.1 Limitationen der Videobildanalyse

Die Quantifizierung der Leukozytenadhäsion sowie der Rollgeschwindigkeiten erfolgte durch eine Analyse der Videoaufzeichnungen der *in vivo* Versuche. Bei dieser manuellen Auswertungsmethode besteht eine Anfälligkeit für untersucherabhängige systematische Fehler. Da insbesondere in der Analyse der DHEA-Versuchsreihe die Ermittlung absoluter Werte nicht im Vordergrund stand, sondern verschiedene Gruppen verglichen wurden, sind mögliche systematische Fehler der auswertenden Person weniger relevant. Alle Auswertungen wurden zudem von derselben Person durchgeführt, sodass eine Interrater Variabilität ausgeschlossen werden kann. Die Auswertungsmethode ist in unserer Arbeitsgruppe fest etabliert und wurde auch in aktuellen Studien angewendet [39, 103].

4.2 Limitationen der *in vivo* Versuche

Eine mögliche Limitation der vorliegenden *in vivo* Versuche ist, dass eine Aktivierung des Endothels und dadurch erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen durch TLR Stimulation nicht ausgeschlossen werden kann. Dies könnte ebenso zu einer erhöhten Leukozytenadhäsion führen, bzw. ist als additiver Effekt nicht auszuschließen. Der jedoch sehr schnell einsetzende Effekt (nach einer Minute), macht eine endotheliale Ursache für die erhöhte Adhäsion allerdings unwahrscheinlich, da die Aktivierung des Endothels mit konsekutiv vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen eine längere Stimulation voraussetzt [104-106]. Eine

signifikante Hochregulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selectin konnte beispielsweise von Wilhelmsen et al. nach Stimulation von Endothelzellen mit Pam3CSK4 erst nach vier Stunden beobachtet werden [106]. Auch zeigen andere Arbeiten, dass eine vermehrte TLR2 Expression auf Endothelzellen nach Stimulation insbesondere von turbulenter Strömung abhängig ist und auch hier ein relevanter Effekt erst nach vielen Stunden eintritt [107]. Die Stimulation von TLR9 auf Endothelzellen führt zur vermehrten Hochregulation endothelialer Adäsionsproteine, auch hier konnte jedoch erst nach Stunden eine vermehrte Expression von Adhäsionsproteinen gezeigt werden [108]. Die genannten endothelialen Effekte sind somit transkriptioneller Art wie beispielsweise die Hochregulation durch *de novo* Synthese von E-Selectin [15]. Im Gegenzug ist die schnelle Mobilisation aus intrazellulären Speichern von P-Selectin kein transkriptioneller Effekt. Um den potentiellen Einsatz von DHEA bei inflammatorischen Erkrankungen besser evaluieren zu können, wäre die Messung der DHEA-Spiegel im Blut der Maus nach intraperitonealer DHEA Injektion von Interesse. So können dosisabhängige Effekte besser eingeschätzt sowie eine wirksame therapeutische Dosis besser beurteilt werden.

4.2.1 Limitationen der histologischen Versuche zur Extravasation

Die Auswertungen der angefertigten whole mounts der M. Cremaster zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Extravasation nach Applikation von DHEA und LPS-Stimulation. Dies ist am ehesten als methodenbedingt einzuordnen. Nach Stimulation mit LPS zeigte sich eine deutlich vermehrte Extravasation in beiden untersuchten Gruppen. Die Einbettung des gesamten M. Cremasters erschwert die Erfassung aller ausgewanderter Leukozyten, da stets nur ein Ausschnitt des M. Cremasters untersucht werden kann. Auch die Einstellung der richtigen Fokusebene im Mikroskop kann mitunter erschwert sein. Ein geeigneteres Modell-System zur Extravasation ist beispielsweise ein Lungeninflammations-Modell. Nach intratrachealer Applikation z. B. von LPS wird das mittels bronchoalveolärer Lavage gewonnene Material mittels Durchflusszytometrie analysiert. So können ausgewanderte Entzündungszellen differenziert werden [109].

4.3 Einfluss von DHEA auf die Leukozytenrekrutierung

Endotheliales DEL-1 reguliert durch Beeinflussung der Leukozytenadhäsion an das Endothel die Leukozytenrekrutierung und hierdurch inflammatorische Prozesse

[51, 110]. Eine verminderte DEL-1 Expression kann in verschiedenen inflammatorischen Prozessen beobachtet werden; beispielsweise in humaner und muriner Peridontitis, Multipler Sklerose sowie Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), in inflammations-assoziiertes adrener Dysfunktion und in humanen und murinen entzündlichen pulmonalen Erkrankungen [111-117]. Eine in akuten Infektionen reduzierte DEL-1 Expression führt zu vermehrter Rekrutierung von Entzündungszellen und vermag hier vorteilhaft sein. Dem gegenüber ist eine reduzierte DEL-1 Expression in chronischen inflammatorischen Zuständen selbige unterhaltend, wie bei muriner Peridontitis beobachtet [110]. Die Identifizierung von die DEL-1 Expression wiederherstellenden Faktoren ist somit für potentielle therapeutische Ansätze von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Steroidhormon DHEA in einem murinen *in vivo* Modell zu einer Verminderung der Leukozytenadhäsionseffizienz führt, welche einen Anstieg des Anteils der rollenden Leukozyten im Blutstrom sowie der Rollgeschwindigkeit zur Folge hat. Eine kooperierende Arbeitsgruppe demonstrierte, dass die hierfür ursächlichen Effekte von DHEA auf eine Hochregulation der Expression des β_2 -Integrin Antagonisten DEL-1 zurückzuführen sind und nicht etwa auf direkte Wechselwirkung mit Adhäsionsmolekülen. In einem Modell LPS-induzierter Lungeninflammation konnte hier gezeigt werden, dass DHEA die Rekrutierung von Neutrophilen in DEL-1 exprimierenden Mäusen inhibierte, nicht aber in DEL-1 defizienten Mäusen [118]. Während akuter Inflammation ist die endotheliale DEL-1 Expression reduziert [51, 52, 110], hierbei spielt TNF als Endothelaktivator eine entscheidende Rolle [119]. Ziogas et al. zeigten auch, dass die durch TNF induzierte Herabregulation der endothelialen DEL-1 Expression [51, 114] durch Verhindern der Bindung des Transkriptionsfaktors C/EBP β an den *DEL-1* Promoter geschieht [118], d.h. auf transkriptioneller Ebene. DHEA kann diese inhibitorische Wirkung von TNF auf die endotheliale DEL-1 Expression wieder rückgängig machen. Dies geschieht über Signalwege, welche den TRKA Rezeptor und downstream den PI3K/AKT Signalweg beinhalten, sodass eine Bindung von C/EBP β an den *DEL-1* Promoter wieder ermöglicht wird. Hierzu konsistent zeigt NGF als Prototyp Ligand des TRKA Rezeptors einen ebensolchen regulierenden Effekt auf die DEL-1 Expression [118]. Obwohl die Synthese von Steroidhormonen deutlich von inflammatorischen Prozessen beeinträchtigt ist und somit eine enge

Verbindung beider naheliegend ist [120-122], haben sie sehr wahrscheinlich regulierende Funktion. Beispielsweise sind DHEA-Sulfat Spiegel in Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, des Systemischen Lupus erythematoses und des Sjögren Syndroms reduziert [123-126]. Überdies sind die Spiegel von DHEA im Zentralen Nervensystem (ZNS) von Patienten mit Multipler Sklerose reduziert, wohingegen die Applikation von DHEA in Nagetieren mit LPS induzierter cerebraler Entzündung oder EAE zu einer Verminderung der Inflammation führt [71, 77, 127, 128]. Gleichmaßen sind im ZNS von an Multipler Sklerose Erkrankter wie auch bei EAE reduzierte DEL-1 Spiegel messbar [116]. In immunprivilegierten Organen wie dem Gehirn ist interessanterweise eine hohe Expression von DEL-1 messbar, ebenso hohe Konzentrationen von NGF und DHEA [51, 116, 129-132]. Das Altern ist im Menschen mit steigenden TNF Spiegeln und abnehmenden DHEA Spiegeln assoziiert, obschon eine altersassoziierte Abnahme der DEL-1 Expression in Maus und Mensch gezeigt werden konnte [110, 117, 133, 134]. Inflammatorische Zytokine wie TNF und antiinflammatorische Faktoren wie DHEA und DEL-1 zeigen inverse Assoziation im Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen und dem Prozess des Alterns, sodass eine regulatorische Verbindung zumindest naheliegend scheint. Auch scheint es denkbar, dass die altersbedingte Abnahme der DEL-1 Expression sekundär aufgrund der reduzierten DHEA Spiegel bedingt ist [118]. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, bedingt auch die räumliche zelluläre Verteilung von DEL-1 Funktionen des selbigen. Von Makrophagen stammendes DEL-1 ist insbesondere an der Auflösung inflammatorischer Vorgänge beteiligt, indem die Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen durch Makrophagen gefördert wird. Aus dem Endothel stammendes DEL-1 reguliert die Leukozytenrekrutierung [135]. Zusammenfassend erscheint der Zusammenhang von DHEA und DEL-1- als eine neue, interessante immuno-endokrine Achse mit zukünftig therapeutischem Potential bei Erkrankungen mit reduzierter DEL-1 Expression oder vermehrter Leukozytenrektrutierung.

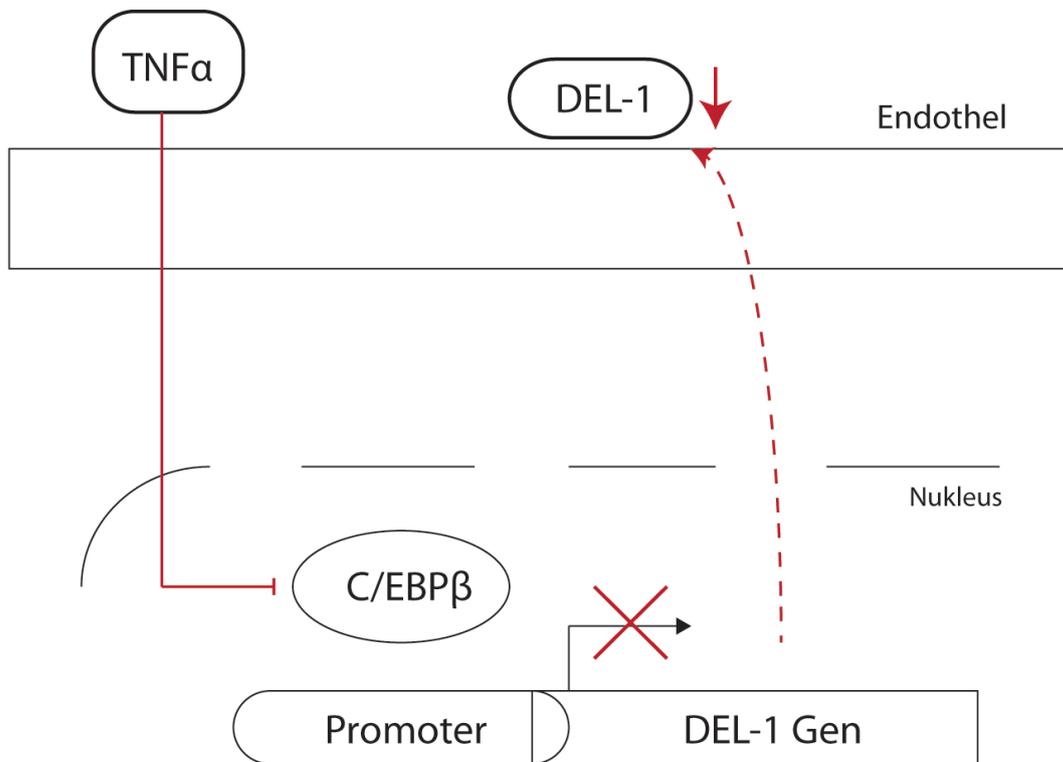


Abbildung 14: TNF verhindert die Bindung des Transkriptionsfaktors C/EBP β an den *DEL-1* Promoter.

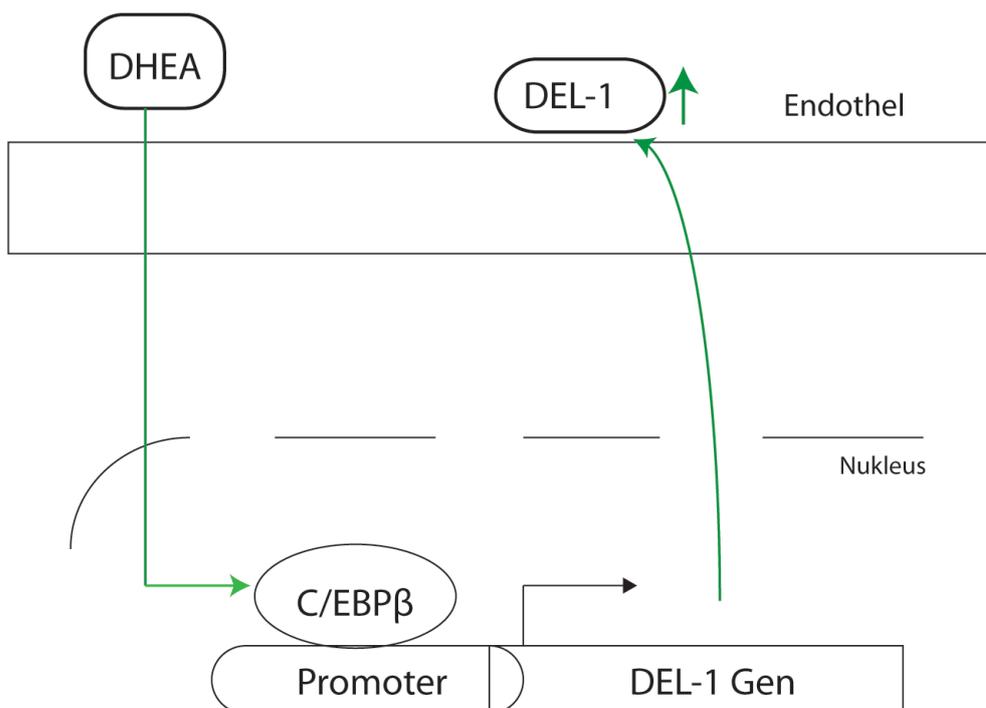


Abbildung 15: DHEA ermöglicht die Bindung von C/EBP β an den *DEL-1* Promoter, *DEL-1* wird wieder exprimiert.

4.4 Der Einfluss von TLR2 auf die Leukozytenaktivierung

Die schnelle Integrinaktivierung ist ein entscheidender Vorgang bei der Leukozytenrekrutierung im Falle von Infektionen oder Gewebetraumata. Für den Übergang vom Rollen bis hin zur festen Adhäsion, induziert durch schnelle Integrinaktivierung, sind hierbei Chemokine und Selektinliganden verantwortlich [5, 44, 45]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Applikation eines TLR2 Agonisten eine schnelle Leukozytenadhäsion *in vivo* nachweisbar ist.

Dies wird durch die Ergebnisse der *in vitro* Arbeiten durch die kooperierende Arbeitsgruppe weiter unterstützt. Hier konnte gezeigt werden, dass eine TLR2 und TLR5 Bindung eine schnelle Integrinaktivierung und Leukozytenadhäsion zur Folge hat. Verschiedene Effektormoleküle downstream von TLR2 und TLR5 konnten hier identifiziert werden. Eine über Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) aktivierte NADPH oxidase 2 (Nox2) und einhergehender reactive oxygen species (ROS) Produktion führt letztlich zur Aktivierung der Ras-related protein 1 (Rap1) GTPase, welche eine Konformationsänderung von β_2 -Integrinen bewirkt und schließlich zur Leukozytenadhäsion führt [136]. Eine wichtige Rolle in der TLR-abhängigen Immunreaktion von Zellen spielt Rac1 [137] als ein Regulator des Zytoskeletts bei der Phagozytose nach extrazellulären Stimuli [138]. Die Abtötung mikrobieller Organismen, Zytokinproduktion und Regulation von Zelltodsignalwegen in Leukozyten [139, 140] involviert die TLR-abhängige Nox2-abhängige ROS Produktion [141]. Bereits bekannt bei der LPS-induzierten Monozytenadhäsion ist die Rolle von Cytohesin-1 und Phosphoinositid-3-Kinasen [142], ebenso die durch TLR2 induzierte Integrin abhängige Zelladhäsion durch Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis* fimbriae [143-145]. Die TLR/Rac1/Nox2 Achse, welche durch Rap1 Aktivierung eine rasche β_2 -Integrin abhängige Zelladhäsion bewirkt, ist somit ein weiterer neuer Aspekt bei schnellen TLR2 vermittelten Effektorfunktionen [136]. Neben den beschriebenen Verbindungen von TLRs und β_2 -Integrinen gibt es auch Hinweise, dass β_2 -Integrine ebenso regulierende Funktion im signaling von TLRs haben. Fibrinogen kann über β_2 -Integrinaktivierung eine Hemmung von TLR-Signalwegen induzieren. Dieser Prozess ist abhängig von Interleukin-10, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), A20-binding inhibitor of NF- κ B activation 3 (ABIN-3), hairy and enhancer of split-1 (Hes1) und A20 [146]. Des Weiteren konnte bei CD11b Defizienz von Makrophagen eine

verstärkte TLR- vermittelte Inflammation bei muriner Endotoxinämie gezeigt werden [147], welche eine erhöhte Sterblichkeit zur Folge hatte. Als erklärend wird hier angeführt, dass eine TLR4 Ligation eine CD11b Aktivierung zur Folge hat, welche im Gegenzug durch Abbau von MyD88 und TRIF TLRs inhibiert, im Sinne einer negativen Rückkopplung [147]. Die Bindung von Mac-1 in humanen Monozyten und Makrophagen führte überdies zu einer Herabregulation der TLR7/TLR8-abhängigen Immunantwort [148]. Eine in Dendritischen Zellen durch TLR9 ausgelöste Immunantwort zeigte ähnlich eine verminderte Inflamationsreaktion [149]. Ergänzend scheint Mac-1 die Rekrutierung von TIRAP an die Zellmembran zu unterstützen, welches als Adapterprotein eine wichtige Funktion in der Initiierung des TIRAP-abhängigen TLR4 signaling inne hat [150]. In Dendritischen Zellen der Maus kann durch TLR signaling auch die Expression und der Transport der β_2 -Integrin-Untereinheit CD11c reguliert werden [151]. Zusammenfassend können unsere Erkenntnisse, das Wissen einer bidirektionalen Regulation zwischen Leukozyten-Integrinen und TLRs weiter vertiefen.

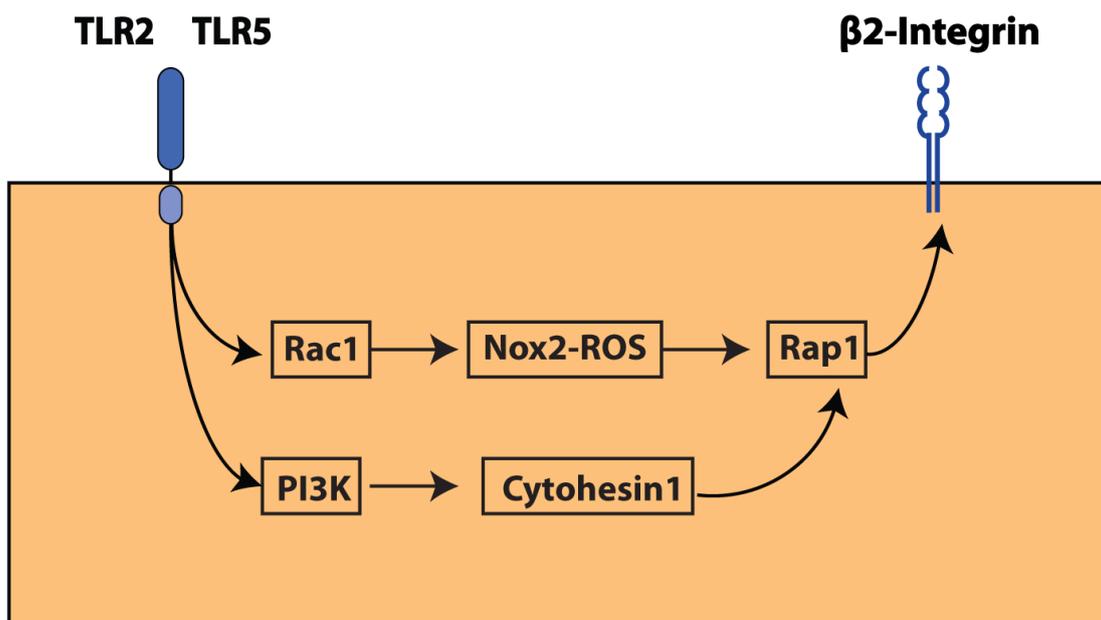


Abbildung 16: β_2 -Integrinaktivierung von Leukozyten vermittelt durch TLR2/TLR5.

5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss von TLR2 und DHEA auf die Leukozytenadhäsion *in vivo* gezeigt werden. Sowohl TLRs und deren Signalwege wie auch Leukozyten sind entscheidend an inflammatorischen Vorgängen beteiligt und daher von großer Bedeutung für potentielle therapeutische Interventionen.

Beispielsweise liegt in der Erkennung von DAMPs und PAMPs durch TLRs auch ein Nachteil, da nach bereits erfolgreicher Elimination des Pathogens inflammatorische Signalwege aufrechterhalten werden und so sekundäre Organschäden resultieren können, wie dies bei septischen Krankheitsbildern der Fall ist [152]. Eine TLR- und auch Organ-spezifische Blockade könnte diese sekundären Schäden möglicherweise vermindern. Auch im Bereich der Onkologie macht man sich die Modulation des Tumor-Mikroenvironments durch TLR-Agonisten zu Nutze [153]. Die Blockierung von peritonealem TLR2 durch einen löslichen TLR2-Decoy-Rezeptor resultierte in einer verminderten Peritonealdialyse assoziierten Peritonealfibrose [154]. Eine genaue Kenntnis der TLR-Aktivatoren, Signalwege sowie deren Effektorzellen sind somit von größter Relevanz für therapeutische Anwendungen.

Das endogene Steroidhormon DHEA bietet als antiinflammatorischer Effektor durch Wiederherstellung der DEL-1 Expression vielseitige Einsatzmöglichkeiten bei Erkrankungen, welche eine vermehrte Leukozyteninfiltration von Geweben als Grundlage haben. Hier können in zukünftigen Versuchen lokale wie auch systemische Applikationen von DHEA evaluiert werden.

6. Abkürzungen

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
C	Celsius
CCD	charge-coupled device
Ctrl	Kontrolle
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
et al.	et alii
g	Gramm
h	hour/hours
ID	inner diameter
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	outer diameter
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
s	second/seconds
SEM	standard error of the mean
TLR	Toll-like Rezeptor
U	unit/units
u.a.	unter anderem
WBC	whole blood cell count, systemische Leukozytenzahl

WT	wild type
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar

7. Literaturverzeichnis

1. Petri, B., M. Phillipson, and P. Kubes, *The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6439-46.
2. Schmidt, S., M. Moser, and M. Sperandio, *The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies*. Mol Immunol, 2013. **55**(1): p. 49-58.
3. Németh, T., M. Sperandio, and A. Mócsai, *Neutrophils as emerging therapeutic targets*. Nat Rev Drug Discov, 2020. **19**(4): p. 253-275.
4. Mocsai, A., *Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond*. J Exp Med, 2013. **210**(7): p. 1283-99.
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. Kolaczkowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
7. Kunkel, E.J., J.L. Dunne, and K. Ley, *Leukocyte arrest during cytokine-dependent inflammation in vivo*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3301-8.
8. Kubes, P., *The complexities of leukocyte recruitment*. Semin Immunol, 2002. **14**(2): p. 65-72.
9. Munn, L.L., R.J. Melder, and R.K. Jain, *Role of erythrocytes in leukocyte-endothelial interactions: mathematical model and experimental validation*. Biophys J, 1996. **71**(1): p. 466-78.
10. Eriksson, E.E., et al., *Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo*. J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 205-18.
11. Sperandio, M., C.A. Gleissner, and K. Ley, *Glycosylation in immune cell trafficking*. Immunol Rev, 2009. **230**(1): p. 97-113.
12. Vestweber, D. and J.E. Blanks, *Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 181-213.
13. Pavalko, F.M., et al., *The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alpha-actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actinin*. J Cell Biol, 1995. **129**(4): p. 1155-64.
14. Ivetic, A., H.L. Hoskins Green, and S.J. Hart, *L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1068.

15. Jung, U. and K. Ley, *Regulation of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule 1 expression in mouse cremaster muscle vasculature*. *Microcirculation*, 1997. **4**(2): p. 311-9.
16. Subramaniam, M., J.A. Koedam, and D.D. Wagner, *Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane*. *Mol Biol Cell*, 1993. **4**(8): p. 791-801.
17. Bonfanti, R., et al., *PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells*. *Blood*, 1989. **73**(5): p. 1109-12.
18. McEver, R.P., et al., *GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies*. *J Clin Invest*, 1989. **84**(1): p. 92-9.
19. Sperandio, M. and K. Ley, *The physiology and pathophysiology of P-selectin*. *Modern Aspects of Immunobiology*, 2005. **15**: p. 24 - 26.
20. Gotsch, U., et al., *Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo*. *Cell Adhes Commun*, 1994. **2**(1): p. 7-14.
21. Liu, Z., et al., *Differential regulation of human and murine P-selectin expression and function in vivo*. *J Exp Med*, 2010. **207**(13): p. 2975-87.
22. von Andrian, U.H., et al., *A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow*. *Cell*, 1995. **82**(6): p. 989-99.
23. Bargatze, R.F., et al., *Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells*. *J Exp Med*, 1994. **180**(5): p. 1785-92.
24. Arbones, M.L., et al., *Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice*. *Immunity*, 1994. **1**(4): p. 247-60.
25. McEver, R.P. and R.D. Cummings, *Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(3): p. 485-91.
26. Zarbock, A., et al., *Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow*. *Blood*, 2011. **118**(26): p. 6743-51.
27. Hocde, S.A., O. Hyrien, and R.E. Waugh, *Cell adhesion molecule distribution relative to neutrophil surface topography assessed by TIRFM*. *Biophys J*, 2009. **97**(1): p. 379-87.
28. Ley, K., *The role of selectins in inflammation and disease*. *Trends Mol Med*, 2003. **9**(6): p. 263-8.
29. Hidalgo, A., et al., *Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44*. *Immunity*, 2007. **26**(4): p. 477-489.

30. Kunkel, E.J. and K. Ley, *Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo*. *Circ Res*, 1996. **79**(6): p. 1196-204.
31. Sperandio, M., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules*. *J Exp Med*, 2003. **197**(10): p. 1355-63.
32. Alon, R., D.A. Hammer, and T.A. Springer, *Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow*. *Nature*, 1995. **374**(6522): p. 539-42.
33. Thomas, W., *Catch bonds in adhesion*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2008. **10**: p. 39-57.
34. Lawrence, M.B., et al., *Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E)*. *J Cell Biol*, 1997. **136**(3): p. 717-27.
35. Sundd, P., et al., *'Slings' enable neutrophil rolling at high shear*. *Nature*, 2012. **488**(7411): p. 399-403.
36. 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.
37. Marki, A., et al., *Rolling neutrophils form tethers and slings under physiologic conditions in vivo*. *J Leukoc Biol*, 2018. **103**(1): p. 67-70.
38. Sperandio, M., et al., *Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro*. *Methods Enzymol*, 2006. **416**: p. 346-71.
39. Pruenster, M., et al., *Extracellular MRP8/14 is a regulator of beta2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6915.
40. Katagiri, K., et al., *RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(8): p. 741-8.
41. Shimonaka, M., et al., *Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow*. *J Cell Biol*, 2003. **161**(2): p. 417-27.
42. Moser, M., et al., *The tail of integrins, talin, and kindlins*. *Science*, 2009. **324**(5929): p. 895-9.
43. Lefort, C.T. and K. Ley, *Neutrophil arrest by LFA-1 activation*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 157.
44. Mueller, H., et al., *Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC) gamma2 and PI3Kgamma pathways*. *Blood*, 2010. **115**(15): p. 3118-27.

45. Zarbock, A., et al., *PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling.* J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2339-47.
46. Luo, B.H., C.V. Carman, and T.A. Springer, *Structural basis of integrin regulation and signaling.* Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 619-47.
47. Harris, E.S., et al., *The leukocyte integrins.* J Biol Chem, 2000. **275**(31): p. 23409-12.
48. Abram, C.L. and C.A. Lowell, *The ins and outs of leukocyte integrin signaling.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 339-62.
49. Frommhold, D., et al., *RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo.* Blood, 2010. **116**(5): p. 841-9.
50. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade.* J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2569-75.
51. Choi, E.Y., et al., *Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment.* Science, 2008. **322**(5904): p. 1101-4.
52. Maekawa, T., et al., *Antagonistic effects of IL-17 and D-resolvins on endothelial Del-1 expression through a GSK-3beta-C/EBPbeta pathway.* Nat Commun, 2015. **6**: p. 8272.
53. Hanna, S. and A. Etzioni, *Leukocyte adhesion deficiencies.* Ann N Y Acad Sci, 2012. **1250**: p. 50-5.
54. Crowley, C.A., et al., *An inherited abnormality of neutrophil adhesion. Its genetic transmission and its association with a missing protein.* N Engl J Med, 1980. **302**(21): p. 1163-8.
55. Etzioni, A., et al., *Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency.* N Engl J Med, 1992. **327**(25): p. 1789-92.
56. Yakubenia, S., et al., *Leukocyte trafficking in a mouse model for leukocyte adhesion deficiency II/congenital disorder of glycosylation IIc.* Blood, 2008. **112**(4): p. 1472-81.
57. Svensson, L., et al., *Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation.* Nat Med, 2009. **15**(3): p. 306-12.
58. Kuijpers, T.W., et al., *LAD-1/variant syndrome is caused by mutations in FERMT3.* Blood, 2009. **113**(19): p. 4740-6.
59. Malinin, N.L., et al., *A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans.* Nat Med, 2009. **15**(3): p. 313-8.

60. 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.
61. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
62. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
63. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors*. Curr Protoc Immunol, 2015. **109**: p. 14.12.1-10.
64. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
65. Satoh, T. and S. Akira, *Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(6).
66. Maninger, N., et al., *Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS)*. Front Neuroendocrinol, 2009. **30**(1): p. 65-91.
67. Derksen, R.H., *Dehydroepiandrosterone (DHEA) and systemic lupus erythematosus*. Semin Arthritis Rheum, 1998. **27**(6): p. 335-47.
68. Vogl, D., et al., *Serum levels of pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: relation to other adrenal hormones*. J Rheumatol, 2003. **30**(2): p. 269-75.
69. Barrou, Z., P. Charru, and C. Lidy, *Dehydroepiandrosterone (DHEA) and aging*. Arch Gerontol Geriatr, 1997. **24**(3): p. 233-41.
70. Al-Banna, N., et al., *Combination of dehydroepiandrosterone and orthovanadate administration reduces intestinal leukocyte recruitment in models of experimental sepsis*. Microvasc Res, 2014. **95**: p. 82-7.
71. Aggelakopoulou, M., et al., *ERbeta-Dependent Direct Suppression of Human and Murine Th17 Cells and Treatment of Established Central Nervous System Autoimmunity by a Neurosteroid*. J Immunol, 2016. **197**(7): p. 2598-609.
72. Prough, R.A., B.J. Clark, and C.M. Klinge, *Novel mechanisms for DHEA action*. J Mol Endocrinol, 2016. **56**(3): p. R139-55.
73. Chen, F., et al., *Direct agonist/antagonist functions of dehydroepiandrosterone*. Endocrinology, 2005. **146**(11): p. 4568-76.
74. Charalampopoulos, I., et al., *G protein-associated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone*. Faseb j, 2006. **20**(3): p. 577-9.

75. Liu, D., et al., *Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a Galphai protein-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression*. *Endocrinology*, 2007. **148**(7): p. 3068-76.
76. Yilmaz, C., et al., *Neurosteroids as regulators of neuroinflammation*. *Front Neuroendocrinol*, 2019. **55**: p. 100788.
77. Alexaki, V.I., et al., *DHEA inhibits acute microglia-mediated inflammation through activation of the TrkA-Akt1/2-CREB-Jmjd3 pathway*. *Mol Psychiatry*, 2018. **23**(6): p. 1410-1420.
78. Lazaridis, I., et al., *Neurosteroid dehydroepiandrosterone interacts with nerve growth factor (NGF) receptors, preventing neuronal apoptosis*. *PLoS Biol*, 2011. **9**(4): p. e1001051.
79. Alexaki, V.I., et al., *DHEA inhibits acute microglia-mediated inflammation through activation of the TrkA-Akt1/2-CREB-Jmjd3 pathway*. *Mol Psychiatry*, 2017.
80. Prall, S.P. and M.P. Muehlenbein, *DHEA Modulates Immune Function: A Review of Evidence*. *Vitam Horm*, 2018. **108**: p. 125-144.
81. Hazeldine, J., W. Arlt, and J.M. Lord, *Dehydroepiandrosterone as a regulator of immune cell function*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010. **120**(2-3): p. 127-36.
82. Scheiermann, C., et al., *Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues*. *Immunity*, 2012. **37**(2): p. 290-301.
83. 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.
84. Gorczynski, R.J., B. Klitzman, and B.R. Duling, *Interrelations between contracting striated muscle and precapillary microvessels*. *Am J Physiol*, 1978. **235**(5): p. H494-504.
85. Ley, K. and P. Gaetgens, *Endothelial, not hemodynamic, differences are responsible for preferential leukocyte rolling in rat mesenteric venules*. *Circ Res*, 1991. **69**(4): p. 1034-41.
86. Finger, E.B., et al., *Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear*. *Nature*, 1996. **379**(6562): p. 266-9.
87. Zhu, C., et al., *Mechanisms for flow-enhanced cell adhesion*. *Ann Biomed Eng*, 2008. **36**(4): p. 604-21.
88. Ley, K., et al., *Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo*. *J Exp Med*, 1995. **181**(2): p. 669-75.
89. Aliprantis, A.O., et al., *Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2*. *Science*, 1999. **285**(5428): p. 736-9.

90. Ozinsky, A., et al., *The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13766-71.
91. Bauer, S., et al., *Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9237-42.
92. Meijering, E., O. Dzyubachyk, and I. Smal, *Methods for cell and particle tracking*. Methods Enzymol, 2012. **504**: p. 183-200.
93. Lipowsky, H.H. and B.W. Zweifach, *Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates*. Microvasc Res, 1978. **15**(1): p. 93-101.
94. Hayashi, F., T.K. Means, and A.D. Luster, *Toll-like receptors stimulate human neutrophil function*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2660-9.
95. Atherton, A. and G.V. Born, *Relationship between the velocity of rolling granulocytes and that of the blood flow in venules*. J Physiol, 1973. **233**(1): p. 157-65.
96. Kim, M.B. and I.H. Sarelius, *Regulation of leukocyte recruitment by local wall shear rate and leukocyte delivery*. Microcirculation, 2004a. **11**(1): p. 55-67.
97. Kim, M.B. and I.H. Sarelius, *Role of shear forces and adhesion molecule distribution on P-selectin-mediated leukocyte rolling in postcapillary venules*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004b. **287**(6): p. H2705-11.
98. Long, D.S., et al., *Microviscometry reveals reduced blood viscosity and altered shear rate and shear stress profiles in microvessels after hemodilution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10060-5.
99. Smith, M.L., et al., *Near-wall micro-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo*. Biophys J, 2003. **85**(1): p. 637-45.
100. McGarry, M.P., Protheroe, C. A. & Lee, J. J. , *Mouse Hematology: a laboratory manual*. 2010: Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. .
101. 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.
102. Chung, K.-J., et al., *A novel pathway of rapid TLR-triggered activation of integrin-dependent leukocyte adhesion that requires Rap1 GTPase*. Molecular Biology of the Cell, 2014. **25**(19): p. 2948-2955.
103. Kurz, A.R., et al., *MST1-dependent vesicle trafficking regulates neutrophil transmigration through the vascular basement membrane*. J Clin Invest, 2016. **126**(11): p. 4125-4139.

104. Zeuke, S., et al., *TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS*. Cardiovasc Res, 2002. **56**(1): p. 126-34.
105. Shin, H.S., et al., *Bacterial lipoprotein TLR2 agonists broadly modulate endothelial function and coagulation pathways in vitro and in vivo*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 1119-30.
106. Wilhelmsen, K., et al., *Activation of endothelial TLR2 by bacterial lipoprotein upregulates proteins specific for the neutrophil response*. Innate Immun, 2012. **18**(4): p. 602-16.
107. Dunzendorfer, S., H.K. Lee, and P.S. Tobias, *Flow-dependent regulation of endothelial Toll-like receptor 2 expression through inhibition of SP1 activity*. Circ Res, 2004. **95**(7): p. 684-91.
108. El Kebir, D., et al., *Bacterial DNA activates endothelial cells and promotes neutrophil adherence through TLR9 signaling*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4386-94.
109. Margraf, A., K. Ley, and A. Zarbock, *Neutrophil Recruitment: From Model Systems to Tissue-Specific Patterns*. Trends Immunol, 2019. **40**(7): p. 613-634.
110. Eskan, M.A., et al., *The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss*. Nat Immunol, 2012. **13**(5): p. 465-73.
111. Hajishengallis, G. and T. Chavakis, *DEL-1-Regulated Immune Plasticity and Inflammatory Disorders*. Trends Mol Med, 2019. **25**(5): p. 444-459.
112. Yan, S., et al., *Developmental endothelial locus-1 (Del-1) antagonizes Interleukin-17-mediated allergic asthma*. Immunol Cell Biol, 2018. **96**(5): p. 526-535.
113. Kang, Y.Y., et al., *Deficiency of developmental endothelial locus-1 (Del-1) aggravates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **445**(2): p. 369-74.
114. Shin, J., et al., *Expression and function of the homeostatic molecule Del-1 in endothelial cells and the periodontal tissue*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 617809.
115. Kanczkowski, W., et al., *Role of the endothelial-derived endogenous anti-inflammatory factor Del-1 in inflammation-mediated adrenal gland dysfunction*. Endocrinology, 2013. **154**(3): p. 1181-9.
116. Choi, E.Y., et al., *Developmental endothelial locus-1 is a homeostatic factor in the central nervous system limiting neuroinflammation and demyelination*. Mol Psychiatry, 2015. **20**(7): p. 880-888.
117. Folwaczny, M., et al., *Clinical association between chronic periodontitis and the leukocyte extravasation inhibitors developmental endothelial locus-1 and pentraxin-3*. Eur J Oral Sci, 2017. **125**(4): p. 258-264.

118. Ziogas, A., et al., *DHEA Inhibits Leukocyte Recruitment through Regulation of the Integrin Antagonist DEL-1*. J Immunol, 2020. **204**(5): p. 1214-1224.
119. Pober, J.S., *Endothelial activation: intracellular signaling pathways*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S109-16.
120. Cain, D.W. and J.A. Cidlowski, *Immune regulation by glucocorticoids*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(4): p. 233-247.
121. Kanczkowski, W., et al., *Characterization of the LPS-induced inflammation of the adrenal gland in mice*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **371**(1-2): p. 228-35.
122. Kanczkowski, W., et al., *Hypothalamo-pituitary and immune-dependent adrenal regulation during systemic inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(36): p. 14801-6.
123. Imrich, R., et al., *Low levels of dehydroepiandrosterone sulphate in plasma, and reduced sympathoadrenal response to hypoglycaemia in premenopausal women with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(2): p. 202-6.
124. Imrich, R., et al., *An endocrinologist's view on relative adrenocortical insufficiency in rheumatoid arthritis*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1193**: p. 134-8.
125. Lahita, R.G., et al., *Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1987. **30**(3): p. 241-8.
126. Forsblad-d'Elia, H., et al., *Low serum levels of sex steroids are associated with disease characteristics in primary Sjogren's syndrome; supplementation with dehydroepiandrosterone restores the concentrations*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(6): p. 2044-51.
127. Noorbakhsh, F., et al., *Impaired neurosteroid synthesis in multiple sclerosis*. Brain, 2011. **134**(Pt 9): p. 2703-21.
128. Du, C., M.W. Khalil, and S. Sriram, *Administration of dehydroepiandrosterone suppresses experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 7094-101.
129. Compagnone, N.A. and S.H. Mellon, *Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators*. Front Neuroendocrinol, 2000. **21**(1): p. 1-56.
130. Katoh-Semba, R., et al., *Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3*. Neurosci Res, 1998. **31**(3): p. 227-34.
131. Corpechot, C., et al., *Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(8): p. 4704-7.

132. Weill-Engerer, S., et al., *Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 5138-43.
133. van den Beld, A.W., et al., *The physiology of endocrine systems with ageing*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2018. **6**(8): p. 647-658.
134. Bruunsgaard, H., M. Pedersen, and B.K. Pedersen, *Aging and proinflammatory cytokines*. Curr Opin Hematol, 2001. **8**(3): p. 131-6.
135. Kourtzelis, I., et al., *DEL-1 promotes macrophage efferocytosis and clearance of inflammation*. Nat Immunol, 2019. **20**(1): p. 40-49.
136. Chung, K.J., et al., *A novel pathway of rapid TLR-triggered activation of integrin-dependent leukocyte adhesion that requires Rap1 GTPase*. Mol Biol Cell, 2014. **25**(19): p. 2948-55.
137. Shen, Y., et al., *Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and Rac1 activation facilitates the phagocytosis of Listeria monocytogenes by murine macrophages*. Infect Immun, 2010. **78**(6): p. 2857-67.
138. Cox, D., et al., *Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes*. J Exp Med, 1997. **186**(9): p. 1487-94.
139. Lam, G.Y., J. Huang, and J.H. Brumell, *The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity*. Semin Immunopathol, 2010. **32**(4): p. 415-30.
140. Lambeth, J.D. and A.S. Neish, *Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 119-45.
141. Martinon, F., et al., *TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 411-8.
142. Hmama, Z., et al., *Monocyte adherence induced by lipopolysaccharide involves CD14, LFA-1, and cytohesin-1. Regulation by Rho and phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 1050-7.
143. Harokopakis, E. and G. Hajishengallis, *Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase*. Eur J Immunol, 2005. **35**(4): p. 1201-10.
144. Harokopakis, E., et al., *TLR2 transmodulates monocyte adhesion and transmigration via Rac1- and PI3K-mediated inside-out signaling in response to Porphyromonas gingivalis fimbriae*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7645-56.
145. Hajishengallis, G., M. Wang, and S. Liang, *Induction of distinct TLR2-mediated proinflammatory and proadhesive signaling pathways in response to Porphyromonas gingivalis fimbriae*. J Immunol, 2009. **182**(11): p. 6690-6.

146. Wang, L., et al., *Indirect inhibition of Toll-like receptor and type I interferon responses by ITAM-coupled receptors and integrins*. *Immunity*, 2010. **32**(4): p. 518-30.
147. Han, C., et al., *Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(8): p. 734-42.
148. Reed, J.H., et al., *Complement receptor 3 influences toll-like receptor 7/8-dependent inflammation: implications for autoimmune diseases characterized by antibody reactivity to ribonucleoproteins*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(13): p. 9077-83.
149. Bai, Y., et al., *Integrin CD11b negatively regulates TLR9-triggered dendritic cell cross-priming by upregulating microRNA-146a*. *J Immunol*, 2012. **188**(11): p. 5293-302.
150. Kagan, J.C. and R. Medzhitov, *Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling*. *Cell*, 2006. **125**(5): p. 943-55.
151. Singh-Jasuja, H., et al., *The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering*. *Immunobiology*, 2013. **218**(1): p. 28-39.
152. Tsujimoto, H., et al., *Role of Toll-like receptors in the development of sepsis*. *Shock*, 2008. **29**(3): p. 315-21.
153. Kapp, K., et al., *Beneficial modulation of the tumor microenvironment and generation of anti-tumor responses by TLR9 agonist lefitolimod alone and in combination with checkpoint inhibitors*. *Oncoimmunology*, 2019. **8**(12): p. e1659096.
154. Raby, A.C., et al., *Toll-Like Receptors 2 and 4 Are Potential Therapeutic Targets in Peritoneal Dialysis-Associated Fibrosis*. *J Am Soc Nephrol*, 2017. **28**(2): p. 461-478.

7. Danksagung

Größter Dank gebührt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Markus Sperandio, für die Möglichkeit, meine Promotion unter seiner Supervision durchführen zu können. Deine Begeisterung und Freude für die Wissenschaft waren sehr prägend und ermutigend, ich habe sehr davon profitieren dürfen. Insbesondere das physiologische, wissenschaftliche Denken und Herangehen an Fragestellungen hat weiterhin große Bedeutung in meiner täglichen Arbeit. Ich werde die Zeit im Labor in bester Erinnerung behalten. Herzlichsten Dank dafür!

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. Monika Prünster, Frau Angela Kurz PhD., Frau Dr. Ina Rohwedder und Dr. Kristina Heinig für den wissenschaftlichen Austausch und die hilfreichen Ratschläge. Frau Nadine Schmidt und Frau Susanne Bierschenk danke ich für die Unterstützung bei technischen Fragen. Frau Tanja Eggersmann und Herrn Dr. med. Andreas Margraf danke ich für die netten Gespräche und Hilfestellungen sowie die gegenseitige Aufmunterung bei Misserfolgen.

Nicht genug danken kann ich Herrn Dr. Roland Immler, für die wunderbare Zeit im Labor, Hilfe bei statistischen Fragestellungen und die enge Freundschaft.

Der Medizinischen Fakultät der LMU München danke ich für die Unterstützung im Rahmen des FöFoLe-Programms.

Überdies möchte ich meinen Kooperationspartnern des Universitätsklinikums Dresden um Herrn Prof. Dr. med. Triantafyllos Chavakis für die vertrauensvolle und fruchtbare Zusammenarbeit danken.

Ebenso großer Dank gebührt meinen Eltern, für die fortwährende Unterstützung und Begleitung meiner Ausbildung.

Frau Dr. med. Stephanie Frenz danke ich für ihre Hilfe, Unterstützung und Geduld sowie die sanfte Mahnung zur Besinnung auf Wesentliches, wenn ich mich zuweilen von der Begeisterung für gewisse immunologische Sachverhalte habe ablenken lassen.