

**Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Leitung: Prof. Dr. Markus Sperandio

***Einfluss der Zellalterung von neutrophilen
Granulozyten auf deren Eigenschaften bei Entzündung***

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

vorgelegt von

Yannick Polasek (geb. Vadlau)

aus

München

Jahr

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Reichel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Matthias Siebeck
Prof. Dr. Jürgen Bernhagen

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Bernd Uhl

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2024

Eidesstattliche Versicherung

Polasek (geb. Vadlau), Yannick

Name, Vorname

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

„Einfluss der Zellalterung von neutrophilen Granulozyten auf deren Eigenschaften bei Entzündung“

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

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

Freiburg im Breisgau, 06.02.2024

Ort, Datum

Yannick Polasek

Unterschrift Doktorand

I	<u>EINLEITUNG</u>	7
1.	SEPSIS	7
1.1	HINTERGRUND UND EPIDEMIOLOGIE	7
1.1.1	Definition	9
1.1.2	Pathophysiologie	11
1.1.3	Aktuelle Therapiestrategien	16
2.	LEUKOZYTEN	20
2.1	EINLEITUNG	20
2.2	BASOPHILE UND EOSINOPHILE GRANULOZYTEN	21
2.3	NEUTROPHILE GRANULOZYTEN	22
2.4	ENTSTEHUNG UND LEBENSZYKLUS VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	24
2.5	REKRUTIERUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN	27
2.6	FUNKTIONEN VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	31
II	<u>ZIELSETZUNG</u>	34
III	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	35
1.	VORBEMERKUNGEN	35
2.	MODELLE	35
2.1	VERSUCHSTIERE	35
2.2	NARKOSE	36
2.3	OPERATIVE TECHNIKEN	36
2.3.1	Präparation der <i>A. femoralis</i> mit Kathetereinlage	36
2.3.2	Präparation des <i>M. cremaster</i>	37
2.4	FLUORESZENZMIKROSKOPIE	38
2.4.1	Isolierung neutrophiler Granulozyten und Rekrutierungsanalyse nach Zelltransfer	42
2.5	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	43
2.5.1	Differenzierung gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten mittels immunzytochemischer Färbungen und Durchflusszytometrie	45
2.5.2	BrdU-Markierung neutrophiler Granulozyten	45
2.5.3	Integrin-Konformationen von gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten	46
2.5.4	Intrazelluläre Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Zytokinen	48
2.5.5	Phagozytosekapazität gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten	49
2.6	VERSUCHSPROTOKOLLE	50

2.6.1	Untersuchung des Migrationsverhaltens gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten.....	50
2.6.2	<i>In-vitro</i> -Stimulation und durchflusszytometrische Analyse gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten.....	52
2.6.3	Intravitalmikroskopische Analyse der Leukozytenrekrutierung und der zugrundeliegenden Strukturen im Maus-Kremaster-Modell	53
2.7	STATISTIK	54
<u>IV ERGEBNISSE.....</u>		55
1.1	MIGRATIONSVERHALTEN GEALTERTER NEUTROPHILER GRANULOZYTEN BEI EXPERIMENTELLER SEPSIS ..	55
1.2	OBERFLÄCHENEXPRESSION VON RELEVANTEN SIGNAL- UND ADHÄSIONSMOLEKÜLEN AUF GEALTERTEN UND NICHT GEALTERTEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	62
1.3	VERÄNDERUNGEN DER AFFINITÄT UND DER KONFORMATION VON RELEVANTEN INTEGRINEN AUF GEALTERTEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	68
1.4	BEDEUTUNG DER MOLEKÜLE MAC-1/CD11B, TLR-4, SDF1- α UND CXCR4 FÜR DIE REKRUTIERUNG VON GEALTERTEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN BEI EXPERIMENTELLER SEPSIS	72
1.5	PRODUKTION VON ROS UND ZYTOKINEN DURCH GEALTERTE NEUTROPHILE GRANULOZYTEN.....	75
1.6	PHAGOZYTÖSEPOTENTIAL GEALTERTER NEUTROPHILER GRANULOZYTEN	76
<u>V DISKUSSION</u>		81
1.	DISKUSSION DER ANGEWANDTEN METHODEN.....	82
1.1	INTRAVITALMIKROSKOPIE DES <i>M. CREMASTERS</i>	84
1.2	PHÄNOTYPISCHE UND FUNKTIONELLE DIFFERENZIERUNG GEALTERTER UND NICHT GEALTERTER NEUTROPHILER GRANULOZYTEN	85
1.3	UNTERSUCHUNG DES MIGRATIONSVERHALTENS NEUTROPHILER GRANULOZYTEN.....	88
1.4	ANALYSE EINZELNER REKRUTIERUNGSSCHRITTE GEALTERTER UND NICHT GEALTERTER NEUTROPHILER GRANULOZYTEN NACH ISOLATION UND ZELLTRANSFER	89
2.	DISKUSSION DER ERHOBENEN DATEN	89
3.	STÄRKEN UND LIMITATIONEN DER STUDIE	98
<u>VI ZUSAMMENFASSUNG.....</u>		101
<u>VII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>		104
<u>VIII LITERATURVERZEICHNIS</u>		107
<u>IX DANKSAGUNG.....</u>		118

X	<u>PUBLIKATIONEN</u>	<u>119</u>
----------	-----------------------------------	-------------------

I Einleitung

1. Sepsis

1.1 Hintergrund und Epidemiologie

Die Sepsis als schweres, potentiell tödliches Krankheitsbild ist bereits seit der Antike bekannt. Der Begriff stammt aus dem Griechischen [σηψις] und bezeichnet in den Werken des griechischen Arztes und Philosophen Hippocrates als *sepidon* [σηπεδών] den Zerfall von Gewebe. [1] Im 19. Jahrhundert begannen Forscher die pathophysiologischen Zusammenhänge der Entstehung und Übertragung von Infektionen und somit auch der Sepsis aufzudecken. Der französische Arzt Casimir Davaine etablierte mit seinen Versuchen zur Übertragung von Blut kranker auf gesunde Tiere den Begriff der „Septikämie“. In der Folge wurde die Sepsis zunehmend als systemische Infektion betrachtet. Neben den Erkenntnissen des Chirurgen Ignaz Philipp Semmelweis über den Einfluss der Händehygiene auf die Übertragung von Infektionskrankheiten waren es vor allem die Wissenschaftler Louis Pasteur und Robert Koch, welche Mikroorganismen als Ursache von Infektionserkrankungen identifizierten. [2] Doch auch nach der Entdeckung der antibiotischen Therapie und der hierdurch ermöglichten Behandlung und Eradikation der krankheitsauslösenden Erreger verstarb weiterhin eine hohe Anzahl an Patienten an einer Sepsis, sodass der Wirtsorganismus selbst als pathophysiologischer Faktor in den Vordergrund rückte. [3-5] Die Sepsis wird mittlerweile als hochkomplexes Krankheitsbild verstanden, bei dem es zu einer Dysregulation der Immunantwort kommt. [6-10] Auch heutzutage stellt die Sepsis in Bezug auf Inzidenz und Mortalität eine weltweit bedeutende Erkrankung dar. Dies zeigt sich anschaulich an einer im Jahr 2017 veröffentlichten Resolution der Weltgesundheitsorganisation (WHO). In dieser wurde die Sepsis als außerordentliche globale Belastung benannt und das Kollektiv der Mitgliedsstaaten der WHO dazu aufgefordert, konkrete Maßnahmen zur besseren Prävention, Diagnostik und Therapie der Sepsis zu implementieren. [11]

In Deutschland erkrankten 2013 knapp 280.000 Menschen an einer Sepsis, was einer Inzidenz von 335 Fällen pro 100.000 Einwohnern entsprach. [12] In den

Einleitung

USA variierten im Zeitraum von 2004-2009 die Inzidenzen zwischen 300 und 1031 Fällen pro 100.000 Einwohnern. [13] Gleichzeitig stellte die Sepsis innerhalb des amerikanischen Gesundheitssystems das mit Abstand kostenintensivste Krankheitsbild dar. [14]

Ein Großteil der Erkenntnisse zur Inzidenz der Sepsis beruht auf Daten aus einkommensstärkeren Ländern mit entsprechend weitreichenderen Ressourcen zur adäquaten medizinischen Versorgung. Global gehen Studien von etwa 31 bis 49 Millionen Sepsiserkrankten und elf Millionen hierdurch verursachten Todesfällen pro Jahr aus, was wiederum fast einem Fünftel aller weltweiten Todesfälle entspricht. Es wird dabei angenommen, dass die Einwohner einkommens- und strukturschwacher Regionen häufiger und schwerer von einer Sepsis betroffen sind. [15, 16]

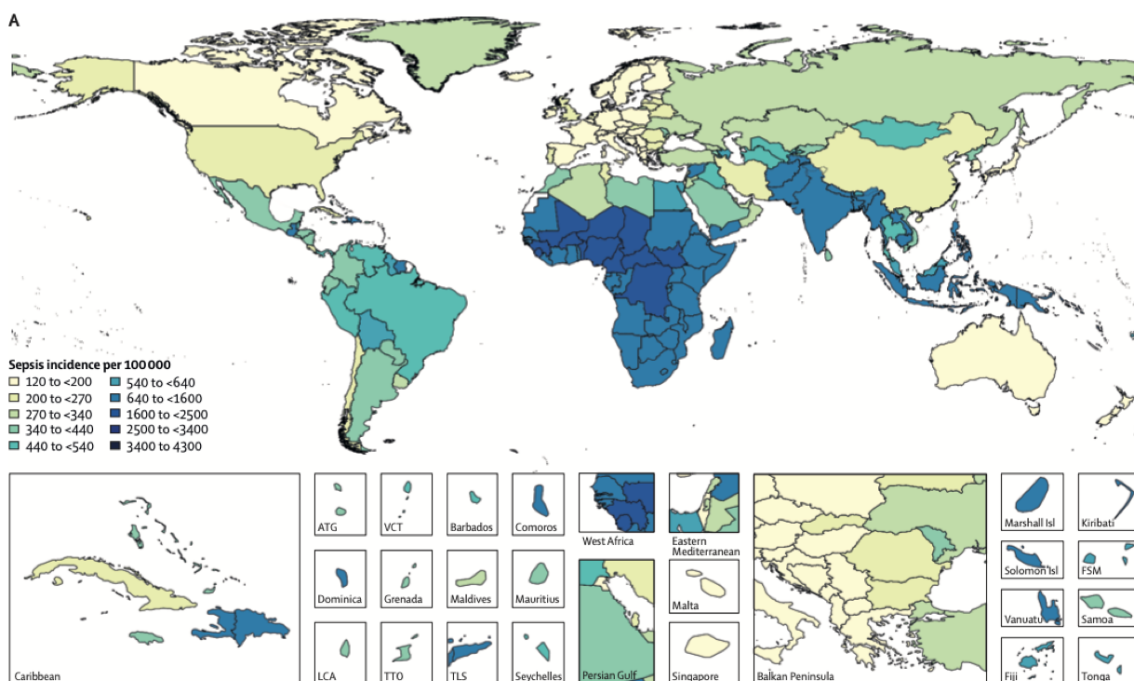


Abbildung 1. Globale Verteilung der Sepsis-Inzidenz pro 100.000 Einwohner ([16]).

Obwohl die Sepsis ein derart häufiges und lebensbedrohliches Krankheitsbild darstellt, besteht in der Gesellschaft lediglich ein vergleichsweise geringes Wissen über die mögliche Prävention und Früherkennung der Symptome. [17] Auf der Basis neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse konnte die Letalität der Sepsis vor allem in den Industrienationen reduziert werden. So trug beispielsweise die Einführung standardisierter, zeitkritischer

Einleitung

Behandlungsprotokolle zur weiteren Optimierung der Sepsistherapie bei. In Deutschland reduzierte sich die Krankenhaussterblichkeit zwischen 2007 und 2013 von 27,0% auf 24,3%. [12] In Australien und Neuseeland betrug die Letalität im Jahre 2000 noch 35% und verringerte sich bis 2012 auf 18,4%. [18]

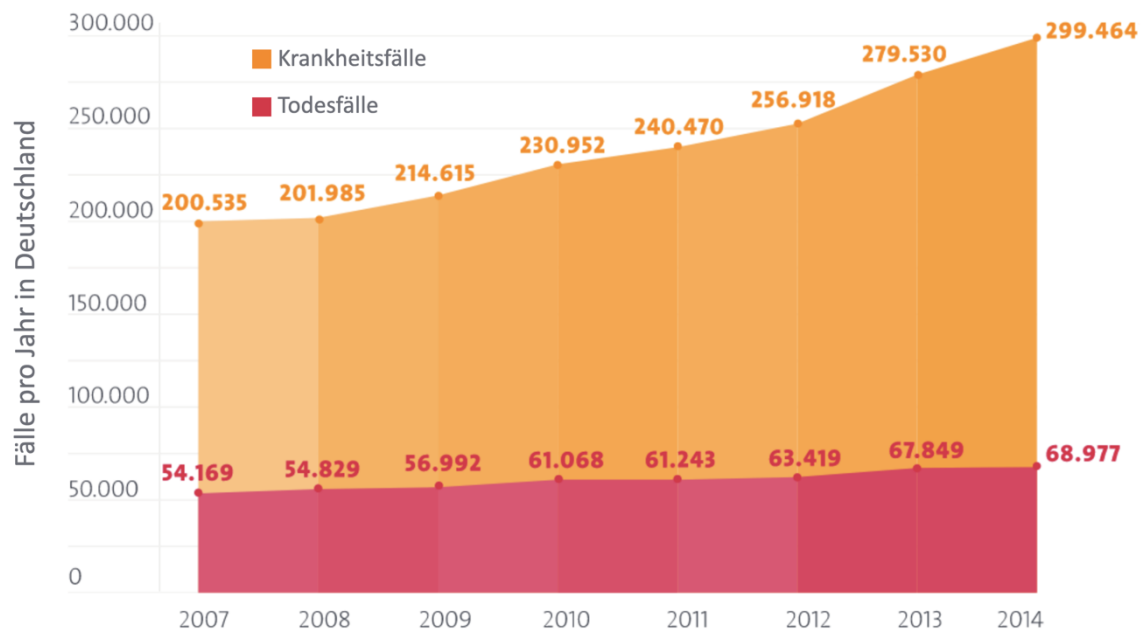


Abbildung 2. Graphische Darstellung der jährlichen Krankheits- und Todesfälle für Deutschland zwischen 2007 und 2014, Orange=Krankheitsfälle pro Jahr, Rot=Todesfälle pro Jahr (modifiziert nach [19], Daten basierend auf [12] sowie der fallzahlbezogenen Krankenhausstatistik 2014 des FDZ der statistischen Ämter des Bundes und der Länder).

1.1.1 Definition

Definiert wird der Begriff Sepsis nach der dritten internationalen Konsensuskonferenz aus dem Jahre 2016 als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion infolge einer fehlregulierten Immunantwort des Körpers auf eine Infektion. [20] Zur Beurteilung über das Vorliegen einer Organdysfunktion wird der 1996 von Vincent et al. erstmals publizierte, sogenannte *Sequential Organ Failure Assessment Score*, kurz SOFA-Score verwendet. Die Sepsis ist durch einen Anstieg des SOFA-Scores um mindestens 2 Punkte gekennzeichnet. Neben der initialen Diagnosestellung kann der SOFA-Score auch als regelmäßiger, prognoseassoziierter Verlaufsparemeter erhoben werden. [21] Eine in früheren Versionen der Sepsis-Definitionen zusätzlich vorgenommene

Einleitung

Klassifizierung in eine schwere Sepsis (Sepsis mit Organdysfunktion) ist mit der aktuellen Konsensusdefinition nicht mehr gebräuchlich. [20, 22]

Als klinischer Test zur Früherkennung potentiell septischer Patienten dient der qSOFA (quick SOFA) Score. Dieser umfasst eine Atemfrequenz $>22/\text{min}$, einen systolischen Blutdruck von $<100\text{mmHg}$ sowie einen veränderten mentalen Status. [20, 22]

Der septische Schock stellt eine Sonderform der Sepsis dar, bei der eine besonders ausgeprägte Beeinträchtigung der Zirkulation, der Zellfunktionen und des Metabolismus zu einer höheren Mortalität im Vergleich zur alleinigen Sepsis führen. Patienten mit septischem Schock erfüllen die o.g. Kriterien der Sepsis, benötigen jedoch zusätzlich trotz adäquater Volumentherapie Katecholamine zur Aufrechterhaltung eines arteriellen Mitteldrucks (mean arterial pressure/MAP) $>65\text{mmHg}$ und/oder weisen ein Serumlaktat von mindestens 2mmol/L ($>18\text{mg/dL}$) auf, jeweils Zeichen einer metabolisch wirksamen Hypoperfusion des Gewebes. [20, 23]

Einleitung

SOFA-Score-Punkte	0	1	2	3	4
Lunge: PaO ₂ /FiO ₂ , mmHg	≥ 400	<400	<300	<200 mit mechanischer Ventilation	<100 mit mechanischer Ventilation
Gerinnung: Thrombozyten × 10/mm ³	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Leber: Bilirubin mg/dl (μmol/l)	< 1,2 (< 20)	1,2–1,9 (20–32)	2,0–5,9 (33–101)	6,0–11,9 (102–204)	> 12,0 (> 204)
Herz/Kreislauf: Hypotension	MAD ≥ 70 mmHg	MAD < 70 mmHg	Dopamin < 5* oder Dobutamin (jede Dosierung)	Dopamin 5,1–15* oder Adrenalin ≤ 0,1* oder Noradrenalin ≤ 0,1*	Dopamin > 15* oder Adrenalin > 0,1* oder Noradrenalin > 0,1*
ZNS: Glasgow Coma Scale	15	13-14	10-12	6-9	<6
Niere: Kreatinin mg/dl (μmol/l) oder Diurese	< 1,2 (< 110)	1,2–1,9 (110–170)	2,0–3,4 (171–299)	3,5–4,9 (300–400) oder < 500 ml/d	> 5,0 (> 440) oder < 200 ml/d

Abbildung 3. Sequential Organ Failure Score (SOFA-Score) zur Beurteilung der Organdysfunktion und Diagnostik der Sepsis (* = Katecholamindosis in μg/kgKG/min für mindestens eine Stunde, modifiziert nach [22]).

1.1.2 Pathophysiologie

Infolge einer Infektion mit pathogenen Erregern kommt es regelhaft zu einer akuten Immunreaktion durch den infizierten Organismus. Diese unmittelbare Immunantwort des Wirtes zielt darauf ab, die ursächlichen Erreger zu lokalisieren, diese mit verschiedensten Abwehrmechanismen zu bekämpfen und Reparaturprozesse des betroffenen Gewebes einzuleiten. [24, 25] Diese Vorgänge beruhen auf der Aktivität gewebständiger phagozytärer Zellen wie z.B. Makrophagen oder dendritischer Zellen, zirkulierender Phagozyten wie vor allem neutrophiler Granulozyten, sowie der Initiierung pro- und antiinflammatorischer Signalkaskaden durch humorale Faktoren. [24-28]

Bei der Sepsis kehrt die durch einen Erreger verursachte Immunantwort des Organismus nicht auf ein homöostatisches Niveau zurück, sondern führt durch eine Dysregulation zu dem im vorherigen Abschnitt definierten klinischen Syndrom. [9, 10] Lange wurde allein eine übermäßige Aktivierung des Entzündungssystems auf das eingedrungene Pathogen für die Entstehung der

Einleitung

Sepsis verantwortlich gemacht. Mittlerweile hat sich jedoch gezeigt, dass die Antwort des Organismus auf eine komplexere und umfassendere Art und Weise beeinträchtigt ist. [3, 8] Hierbei spielen die genannte überschießende Entzündungsreaktion, aber auch eine Immunsuppression und die fehlende Rückkehr der körpereigenen Abwehr in ein Gleichgewicht zwischen entzündungsfördernden und -hemmenden Prozessen eine entscheidende Rolle. [9, 10, 29]

Im Rahmen einer physiologischen akuten Entzündungsreaktion wird ein in den Körper eingedrungenes Pathogen zunächst von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt. [24, 25, 30] Die Identifikation erfolgt anhand von, für diesen Mikroorganismus spezifischen, im Wirt jedoch nicht vorkommenden, Strukturen, den sogenannten *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). PAMPs können beispielsweise Lipopolysaccharide oder Peptidoglykane von Bakterien aber auch virale RNA sein. [24, 25, 30-32]

Die Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. neutrophile Granulozyten, Monozyten oder Makrophagen, exprimieren eine Auswahl an Erkennungsrezeptoren, sogenannte *pattern recognition receptors* (PRRs), mit denen sie die spezifischen PAMPs pathogener Erreger erkennen können. Es existieren verschiedene Formen von PRRs wie beispielsweise Toll-like Rezeptoren (TLRs) oder NOD-like Rezeptoren (NLRs). [31] Toll-like Rezeptoren sind Transmembranproteine, die auf der Zelloberfläche oder in Endosomen der Zelle lokalisiert sein können und der Erkennung extrazellulärer Mikroorganismen dienen. Sie sind durch die extrazelluläre Region von N-terminalen leucinreichen Wiederholungen (*Leucin-rich repeats*) sowie die intrazelluläre TIR (Toll-IL-Rezeptor) Domäne charakterisiert. Die zytoplasmatischen NOD-like Rezeptoren erkennen dagegen pathogene Strukturen, welche sich im Inneren der Immunzelle befinden. NLRs besitzen eine zentrale nucleotidbindende Oligomerisierungsdomäne sowie zusätzliche variable Domänen. [31] Innerhalb der verschiedenen Rezeptorklassen existieren wiederum einzelne Subtypen von Rezeptoren. Zu den wichtigsten PRRs zählen beispielsweise der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4), welcher mit Lipopolysacchariden (LPS) gramnegativer Bakterien interagiert [33, 34] sowie der Toll-like-Rezeptor 2 (TLR-2), der vor allem ein breites Spektrum an Bestandteilen grampositiver Bakterien erkennt, darunter Peptidoglykane oder Lipoteichonsäure (LTA). [35-38]

Einleitung

Neben PAMPs spielen bei der akuten Entzündungsreaktion auch sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) eine Rolle. [24, 25, 30, 31, 39] Dies sind Moleküle, die von im Rahmen der Infektion oder der assoziierten Entzündungsreaktion beschädigten Wirtszellen freigesetzt und ebenfalls von den PRRs der Immunzellen erkannt werden (beispielsweise mitochondriale DNA, *high mobility group box 1* (HMGB-1) [40] oder metabolische Moleküle wie ATP [41]). [24, 25, 30, 31]

Die Aktivierung der PRRs löst eine komplexe zelluläre und nicht-zelluläre Immunantwort aus, die prinzipiell dem Ziel folgt, den Erreger zu eliminieren und nachfolgend die Heilung des Organismus einzuleiten. [24, 25, 30] Hierbei bewirken die Signale der aktivierten Erkennungsrezeptoren wie TLRs oder NLRs unter anderem eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (nuclear factor κ B). [31, 42] Dieser vermittelt in den beteiligten Zellen des angeborenen Immunsystems eine verstärkte Gentranskription proinflammatorischer Typ-I Interferone sowie Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1) oder Interleukin-6 (IL-6). [31, 43]

Durch die Bindung von mikrobiellen Liganden an die jeweiligen PRRs kommt es zudem zu einer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Die hierdurch gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Leukozytenoberfläche ermöglicht zusammen mit der Aktivierung des Endothels eine vermehrte Rekrutierung der Immunzellen aus der Blutzirkulation ins paravaskuläre geschädigte Gewebe (Vgl. Kapitel I 2.5.). Infolge der Freisetzung von Entzündungsmediatoren kommt es zusätzlich zu einer Permeabilitätssteigerung und Vasodilatation im betroffenen Gewebe, was sich klinisch in den Kardinalzeichen einer Entzündung wie Schwellung, Überwärmung und Rötung äußert. [24, 25, 30]

Die kaskadenartigen Abläufe der akuten Entzündungsreaktion stehen unter einer permanenten Regulation. Pro- und antiinflammatorische Mediatoren, welche nach der Infektion mit pathogenen Organismen freigesetzt werden, vermitteln eine Balance der stattfindenden Prozesse von Leukozytenaktivierung und -rekrutierung, Phagozytose und anderen antimikrobiellen Abwehrmechanismen. Sie sorgen damit für ein angemessenes Ausmaß der Entzündungsreaktion sowie eine anschließende Reparatur und Heilung des initial infizierten Gewebes. [24, 25, 30]

Einleitung

Im Falle einer Sepsis läuft die immunologische Reaktion nicht mehr auf dem zuvor charakterisierten, ausgeglichenen Niveau ab und kehrt auch nicht auf dieses zurück. Infolge der sogenannten dysregulierten Immunantwort des Wirtsorganismus entwickeln sich die ablaufenden immunologischen Prozesse zu einem charakteristischen Krankheitsbild mit generalisiertem, übermäßigem Entzündungsgeschehen in Kombination mit einer Suppression des Immunsystems. Die proinflammatorische Komponente mit systemischer Entzündung ist hierbei Ursache für Kollateralschäden der infizierten Strukturen aber auch von Geweben fernab des ursprünglichen Infektfokus. Durch die Immunsuppression kommt es wiederum zu einer erhöhten Anfälligkeit für Sekundärinfektionen. [9, 44]

Die Entwicklung der Sepsis aus der physiologischen Immunantwort ist von multifaktorieller Genese. Allgemein sind erregerabhängige Faktoren wie die Pathogenität eines Mikroorganismus oder seiner Produkte von wirtsabhängigen Faktoren, z.B. genetischer oder medikamentös-induzierter Disposition für septische Krankheitsbilder, zu unterscheiden. [9]

Initial auslösend für die Entstehung einer Sepsis sind Bestandteile der Mikroorganismen (auf Bakterien z.B. LTA, Peptidoglykane, LPS) oder deren toxische Produkte (Exotoxine wie z.B. Pseudomonas Exotoxin A) mit einer durch sie verursachten Aktivierung des angeborenen Immunsystems über PRRs. Wie bei der physiologischen, akuten Immunantwort kommt es zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, z.B. TNF oder IL-1 β . Durch ein Übermaß an diesen entzündungsfördernden Faktoren entsteht allerdings eine überschießende Entzündungsreaktion, die sich nicht mehr auf den Infektfokus beschränkt, sondern auch fokusferne Regionen betrifft. Entscheidende Bestandteile dieser Entwicklung sind die Aktivierung des Komplementsystems, des Gerinnungssystems und des Gefäßendothels im entzündeten Gewebe. [9]

Durch die freigesetzten Zytokine wird die Quantität, Lebensdauer und funktionelle Effektivität der Zellen des angeborenen Immunsystems erhöht. Neutrophile Granulozyten beispielsweise bilden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* (ROS)) und setzen intrazelluläre Strukturen, die sogenannten *neutrophil extracellular traps* (NETs), frei, um Pathogene rasch und wirksam zu bekämpfen. Bei exzessiver Inflammation können diese Abwehrmechanismen jedoch auch erhebliche Kollateralschäden

Einleitung

verursachen. Aus Thrombozyten und Endothelzellen gelangen zudem vermehrt entzündungs-, oxidations-, und koagulationsfördernde Substanzen in das Gefäßsystem, die in erhöhter Konzentration ebenfalls zur Pathogenese der Sepsis beitragen. [9, 44-46]

In der Folge führen diese proinflammatorischen Prozesse zu einer Aktivierung des Gefäßendothels im infizierten Gewebe sowie einer Permeabilitätssteigerung der Gefäßwand, was unter homöostatischen Bedingungen die Grundlage für die Rekrutierung von Leukozyten aus der Blutzirkulation ins paravaskuläre, geschädigte Gewebe darstellt (Vgl. Kapitel I 2.5.). Bei systemischem Entzündungsgeschehen bilden sich durch das sog. Kapillarleck in Kombination mit einer Vasodilatation jedoch hypotone Kreislaufverhältnisse und generalisierte Ödeme des Interstitiums, welche zu einer Minderversorgung mit Sauerstoff führen können. [9, 47]

Als humorale Komponente des angeborenen Immunsystems wird auch das Komplementsystem bei der Sepsis vermehrt aktiviert. Dieses kaskadenartige, streng regulierte System von löslichen Proteinen dient der Markierung, Bindung und Elimination pathogener Erreger und wirkt selbst proinflammatorisch. Im septischen, dysregulierten Organismus kommt es unter anderem zu einer vermehrten Bildung des Anaphylatoxins C5a. Dieses kann bei zu hoher Konzentration über die negative Beeinträchtigung intrazellulärer Signalkaskaden zu einer funktionellen Einschränkung der Chemotaxis und der Phagozytose neutrophiler Granulozyten führen. [9, 48]

Ein weiterer Pathomechanismus in der Entstehung der Sepsis ist die Hyperkoagulabilität. Durch die vermehrte Expression von *tissue factor* auf Endothelzellen und Leukozyten wird entsprechend der Gerinnungskaskade vermehrt Prothrombin in Thrombin umgewandelt, welches wiederum Fibrinogen-Hexamere zu Fibrin spaltet. Durch die ebenfalls erhöhte Konzentration von *plasminogen-activator inhibitor type-1* (PAI-1) und die damit verminderte fibrinolytische Aktivität von Plasmin entsteht im Rahmen der Sepsis insgesamt eine die Blutgerinnung begünstigende Konstellation. Dies kann in Form der disseminierten intravasalen Koagulation zu Thrombosen im Mikrogefäßsystem oder aufgrund des Verbrauchs von Gerinnungsfaktoren zu Blutungskomplikationen mit sekundär verstärkter Gewebeschädigung führen. [8, 49, 50]

Einleitung

Die drei Grundprinzipien der Sepsistherapie umfassen generell eine Kontrolle der Infektion, die hämodynamische Stabilisierung der Patienten und eine Modulation der Immunantwort. [59]

1-Hour Bundle nach SSC 2018
- Messung der Laktatkonzentration
- Gewinnung von Blutkulturen vor Gabe von antibiotischer Therapie
- Beginn einer kalkulierten Antibiotikatherapie mit Breitspektrum-Antibiotika
- Rasche Volumensubstitution (30 ml/kg KG kristalloide Lösung) bei Hypotension oder einer Laktatkonzentration > 4mmol/l
- Therapie mit Vasopressoren bei fortbestehender Hypotension (MAP<65 mmHg) trotz Flüssigkeitssubstitution

Abbildung 5. Darstellung des 1-Hour Sepsis Bundle, eines zuletzt 2018 von der Surviving Sepsis Campaign veröffentlichten Therapiekonzeptes zur Sepsis (modifiziert nach [58]).

Der erste therapeutische Aspekt beinhaltet die frühzeitige Erkennung und Behandlung einer Sepsis-induzierten Minderperfusion des Gewebes. Als etablierter Marker zur Quantifizierung einer Gewebshypoperfusion dient die Laktatkonzentration im Serum. Während die rasche Initiierung einer Flüssigkeitstherapie einen positiven prognostischen Effekt hat, kommt es durch die schematische Verabreichung von festgelegten Flüssigkeitsmengen entgegen der o.g. SSC-Empfehlung zu keinem besseren Outcome. Vielmehr sollte mit Hilfe eines erweiterten hämodynamischen Monitorings eine bedarfsgerechte Flüssigkeitssubstitution erfolgen. Zudem bestehen Hinweise, dass durch eine frühzeitige Katecholamintherapie neben der Volumenbelastung auch das Sterberisiko der Patienten gesenkt werden kann. [60-63]

Zur weiteren Stabilisierung der Hämodynamik bei fortbestehender Hypotension kommen vasopressive Medikamente zum Einsatz. Mittel der Wahl ist hierbei das

Einleitung

Katecholamin Noradrenalin, welches sich aufgrund von nachweislich positiven Effekten in der Therapie der Sepsis und des septischen Schocks etabliert hat. [6, 58, 64-66]

Für die Diagnosestellung der Sepsis ist kein Nachweis eines potentiell auslösenden Erregers erforderlich. Dennoch sollte vor dem Beginn einer antibiotischen Therapie die mikrobiologische Diagnostik mit Abnahme von mindestens zwei Blutkulturen und weiterem, dem Erregernachweis dienlichen Untersuchungsmaterial (Trachealsekret, Urin, Gelenkpunktat, etc.) erfolgen. Der frühzeitige Beginn einer kalkulierten, intravenösen Antibiotikatherapie stellt den zweiten Kernaspekt der Sepsistherapie dar. Auch hier ist der Zeitpunkt der Erstgabe von signifikanter prognostischer Relevanz bezüglich der Sepsis-Mortalität. [52-55]

Die Grundsätze einer adäquaten initialen Therapie mit Antiinfektiva folgen dabei den Prinzipien der „Tarragona-Strategie“, welche ursprünglich für die Behandlung von Beatmungs-assoziierten Pneumonien formuliert wurden. Neben der frühzeitigen Applikation einer kalkulierten Antibiotikatherapie mit ausreichendem Wirkspektrum für die zu erwartenden Erreger und ausreichend hohem Wirkspiegel am Ort der vermuteten Infektion ist hierbei stets eine situative Berücksichtigung der lokalen Resistenzlage, der individuellen Patientenfaktoren sowie die regelmäßige Re-Evaluation bezüglich einer Eskalation oder Deeskalation der antimikrobiellen Therapie von fundamentaler Bedeutung. [67]

Obwohl die Prognose der Sepsis mithilfe moderner intensivmedizinischer Behandlungsregimes bereits verbessert werden konnte, handelt es sich weiter um ein häufiges Krankheitsbild von erheblicher Mortalität und Letalität. Daher ist die Identifikation neuer wirksamer Ansätze zur Modifikation der dysregulierten Immunantwort und Optimierung der Sepsistherapie weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Bisher konnten für die zahlreichen immunmodulierenden Konzepte keine klinischen Ergebnisse nachgewiesen werden, um diese Verfahren für die Behandlung von Sepsispatienten zu empfehlen. [3, 9, 59, 68]

Als zusätzliche Therapiemöglichkeit wurden Systeme entwickelt, die beispielsweise mit Hilfe von Opsonin-beschichteten Nanopartikeln bakterielle Pathogene und deren Toxine aus dem Blut entfernen sollen. [69]

Für präzisere Therapieansätze wird zunehmend versucht, der immunologischen Heterogenität der Patienten Rechnung zu tragen. Basierend auf *Bed-Side Tests*

Einleitung

und biochemischen sowie immunologischen Charakteristika kann in Zukunft versucht werden, Subgruppen von Patienten zu identifizieren, die von der gezielten Modulation spezifischer Teile und Phasen der Immunreaktion vermehrt profitieren. [9, 70, 71]

2. Leukozyten

2.1 Einleitung

Das Immunsystem umfasst alle Komponenten eines biologischen Organismus, mit welchen sich dieser gegen verschiedenste fremde Pathogene und Substanzen (z.B. Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) sowie deren Toxine schützen kann. Außerdem spielt das Immunsystem auch eine essentielle Rolle bei verschiedenen körpereigenen Prozessen, beispielsweise der Auflösung von sterilen Gewebeschädigungen (z.B. Ischämie-Reperfusionsschaden) oder der Erkennung und Vernichtung von maligne entarteten Zellen.

Die zelluläre Kernkomponente dieses Abwehrsystems sind Leukozyten. Sie werden aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet und entsprechend ihrer weiteren Differenzierung in Zellen der myeloischen oder der lymphatischen Zelllinie unterschieden. Zu den Immunzellen myeloischen Ursprungs zählen dendritische Zellen, Makrophagen, Monozyten sowie Granulozyten. Aus der lymphoiden Vorläuferzellen können T-Lymphozyten, B-Lymphozyten sowie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) entstehen. Leukozyten besitzen die Fähigkeit miteinander zu interagieren und übernehmen multiple Aufgaben in der Erkennung und Abwehr von Krankheitserregern, der Entstehung und Regulation von Entzündungsreaktionen sowie darüber hinaus in der Detektion und Auslöschung von maligne entarteten körpereigenen Zellen. [25, 72-76]

1908 erhielten Elie Metchnikoff und Paul Ehrlich den Nobelpreis der Medizin für die von ihnen geschaffenen Grundlagen zu den beiden immunologischen Grundsystemen: der angeborenen und der erworbenen Immunität. Wenngleich mittlerweile bekannt ist, dass beide Systeme interagieren und Leukozyten auch Funktionen beider Systeme wahrnehmen können, hat diese Einteilung bis heute Bestand. [75-77]

Die angeborene oder unspezifische Immunität beinhaltet sofort wirksame Abwehrmechanismen zur unmittelbaren Verteidigung gegen fremde Mikroorganismen. Diese Mechanismen müssen nicht erst im Kontakt zur Umwelt ausgebildet werden, sondern bieten einen sofortigen, wenn auch unspezifischen Schutz. Zu seinen Bestandteilen gehören physikalische Komponenten (*Tight-junctions* der Haut, Schleimhäute, Endothelzellen der Gefäße), nicht-zelluläre

Einleitung

Abwehrfaktoren wie Lysozym oder Defensine sowie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen. [25, 72, 75, 76]

Das erworbene oder spezifische Immunsystem reagiert erst verzögert auf ein eingedrungenes Pathogen. Die immunologische Antwort erfolgt jedoch deutlich spezifischer. Zelluläre Hauptbestandteile des spezifischen Immunsystems sind B- und T-Lymphozyten. Plasmazellen produzieren als Effektorformen von B-Lymphozyten spezifische Antikörper oder Immunglobuline gegen charakteristische molekulare Merkmale (Antigene) eines bestimmten Pathogens. Das spezifische Immunsystem kann zudem ein immunologisches Gedächtnis bilden und so bei wiederholten Infektionen deutlich rascher und stärker reagieren. [25, 75, 76]

In der akuten Entzündungsreaktion auf eine Infektion, aber auch bei der Ausbildung des septischen Krankheitsbildes spielen eine Untergruppe der myeloiden Zellen des angeborenen Immunsystem, die Granulozyten, eine große Rolle. Als „Granulozyten“ oder auch „polymorphkernige Leukozyten“ werden Immunzellen bezeichnet, die sich durch einen unregelmäßig geformten Zellkern und histochemisch anfärbbare zytoplasmatische Granula kennzeichnen. Anhand des charakteristischen Färbeverhaltens lassen sich eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten unterscheiden. Alle Granulozyten werden dem angeborenen Immunsystem zugeschrieben und erfüllen vor allem Aufgaben in der akuten Immunabwehr eingedrungener Krankheitserreger. [25]

2.2 Basophile und eosinophile Granulozyten

Basophile Granulozyten sind durch dunkelblau-violett anfärbbare Granula charakterisiert, welche unter anderem Heparin und Histamin beinhalten.

Im Gegensatz zu den funktionell verwandten Mastzellen sind basophile Granulozyten vor allem im zirkulierenden Blut zu finden. Bei beiden Zelltypen kommt es im Rahmen einer Antigen-vermittelten Quervernetzung von IgE Antikörpern zu einer anschließenden Degranulation mit Freisetzung der genannten Inhaltsstoffe. Diese sind wiederum an der Entstehung oder Aufrechterhaltung allergischer Reaktionen beteiligt. [25, 78]

Einleitung

Eosinophile Granulozyten spielen vor allem bei parasitären Infektionen von Würmern oder deren Larven (z.B. Echinokokkose, Schistosomiasis oder Hakenwurm-Infektion) eine zentrale Rolle. Ihre mit Eosin rot anfärbbaren Granula enthalten zyto- und gewebstoxische Substanzen in Form von kationischen Proteinen (z.B. *Major Basic Protein* (MBP) oder eosinophile Peroxidase) sowie pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine (z.B. Eotaxin-1, TNF oder IL-6). Obwohl sie wie neutrophile Granulozyten die Fähigkeit zur Phagozytose besitzen, beruht ihr Abwehrverhalten gegenüber Parasiten vor allem auf der Degranulation mit Freisetzung des zytotoxischen Inhalts. Neben der Infektionsabwehr sind eosinophile Granulozyten an der Pathogenese allergischer Erkrankungen wie beispielsweise dem Asthma bronchiale sowie an verschiedenen Autoimmunerkrankungen (z.B. eosinophile Ösophagitis oder Churg-Strauss-Syndrom) beteiligt. [25, 78-82]

Sowohl im menschlichen als auch im murinen Blut sind basophile und eosinophile Granulozyten in deutlich geringerer Anzahl vorhanden als neutrophile Granulozyten. [83, 84] Für die Pathogenese der Sepsis spielen basophile und eosinophile Granulozyten zum heutigen Stand der Wissenschaft lediglich eine untergeordnete Rolle. [9]

2.3 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind elementarer Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Als erster zu einem Pathogen rekrutierter Immunzelltyp spielen diese hochreaktiven Immunzellen bei der raschen Bekämpfung bakterieller Infektionen eine entscheidende Rolle. [26, 27, 85] Im menschlichen Blut stellen sie zudem die mit Abstand am häufigsten vorkommende Leukozytensubpopulation dar. [86, 87]

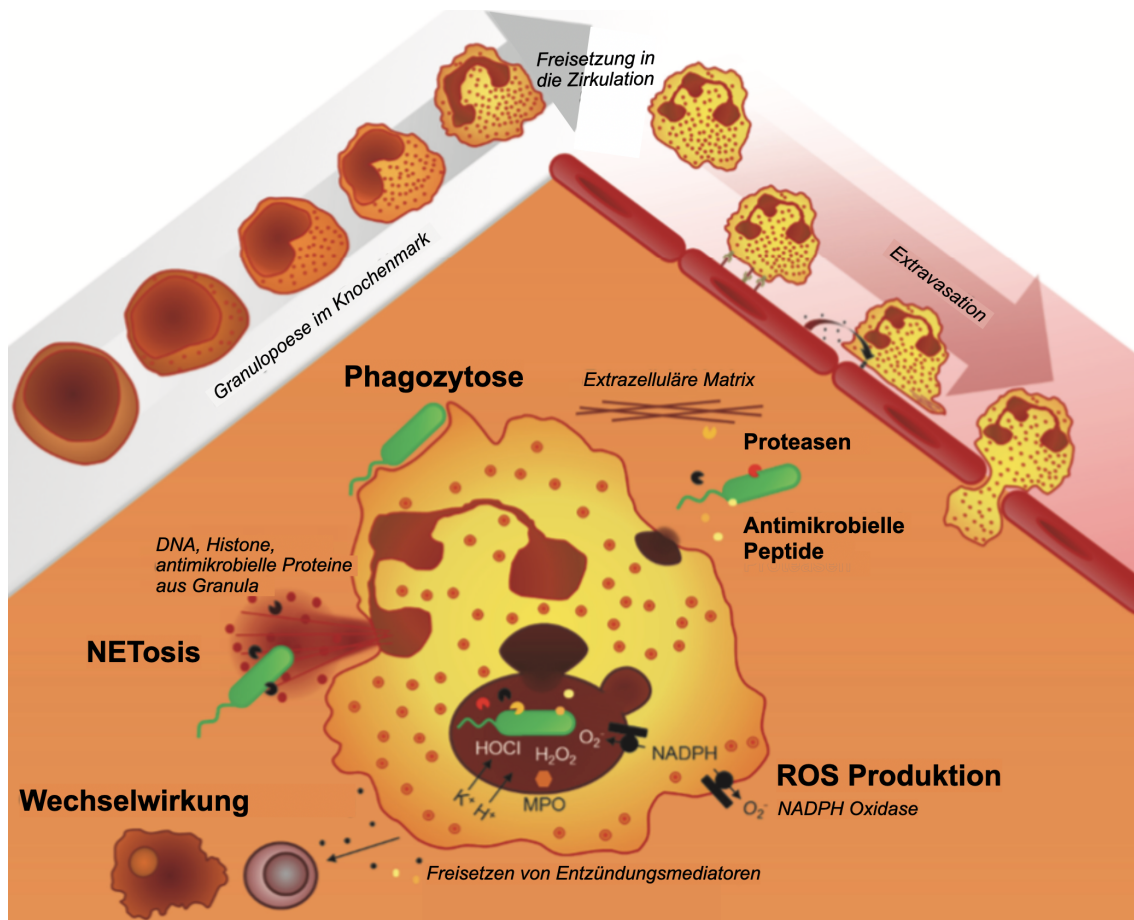


Abbildung 6. Darstellung der Reifung und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten sowie deren verschiedener Effektormechanismen (modifiziert nach [88]).

2.4 Entstehung und Lebenszyklus von neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten werden im Knochenmark unter Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren, z.B. des *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) oder des *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) aus pluripotenten Stammzellen gebildet und durchlaufen in der Folge einen Transkriptionsfaktor-abhängigen Reifungsprozess mit mehreren Stadien vom Myeloblasten bis zum reifen, segmentkernigen neutrophilen Granulozyten. Bildung und Reifung von Granulozyten wird auch als Granulopoese bezeichnet. Weitere hieran beteiligte Faktoren sind beispielsweise IL-3 und IL-6 sowie der Transkriptionsfaktor C/EBP α . Myeloide Vorläuferzellen (*common myeloid progenitors* oder CMPs) können sich zunächst noch in Monozyten oder Makrophagen sowie in neutrophile, basophile oder eosinophile Granulozyten differenzieren. Die erste neutrophil-spezifische Vorläuferzelle ist der sogenannte neutrophile Promyelozyt, der wie der neutrophile Myelozyt noch die Fähigkeit zur Mitose besitzt. Darauf folgende Entwicklungsstadien neutrophiler Granulozyten befinden sich im postmitotischen Stadium, der terminalen Differenzierung. Aktuell wird angenommen, dass sich ein Teil der neutrophilen Vorläuferzellen unter homöostatischen Bedingungen nur wenig vermehrt, um die Produktion neutrophiler Granulozyten im Rahmen einer schweren Infektion bedarfsgerecht rasch erhöhen zu können. Das Knochenmark des menschlichen Organismus beinhaltet sechs bis acht Mal mehr neutrophile Granulozyten als die Blutzirkulation. Während akuter infektiöser oder inflammatorischer Prozesse finden sich vermehrt unreife, stabkernige neutrophile Granulozyten oder deren Vorstufen im menschlichen Blut. Diese sogenannte Linksverschiebung wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts erstmals beobachtet. Die Bildung und Verteilung von neutrophilen Granulozyten im Organismus werden unter anderem von dendritischen Zellen reguliert. Ein anderer Regulator der Granulopoese sind Gewebsmakrophagen, welche infolge des Abbaus apoptotischer neutrophiler Granulozyten über Interleukin-23 (IL-23) und das von T-Zellen gebildete Interleukin-17 (IL-17) Einfluss auf die G-CSF Produktion nehmen. [27, 89-93]

Einleitung

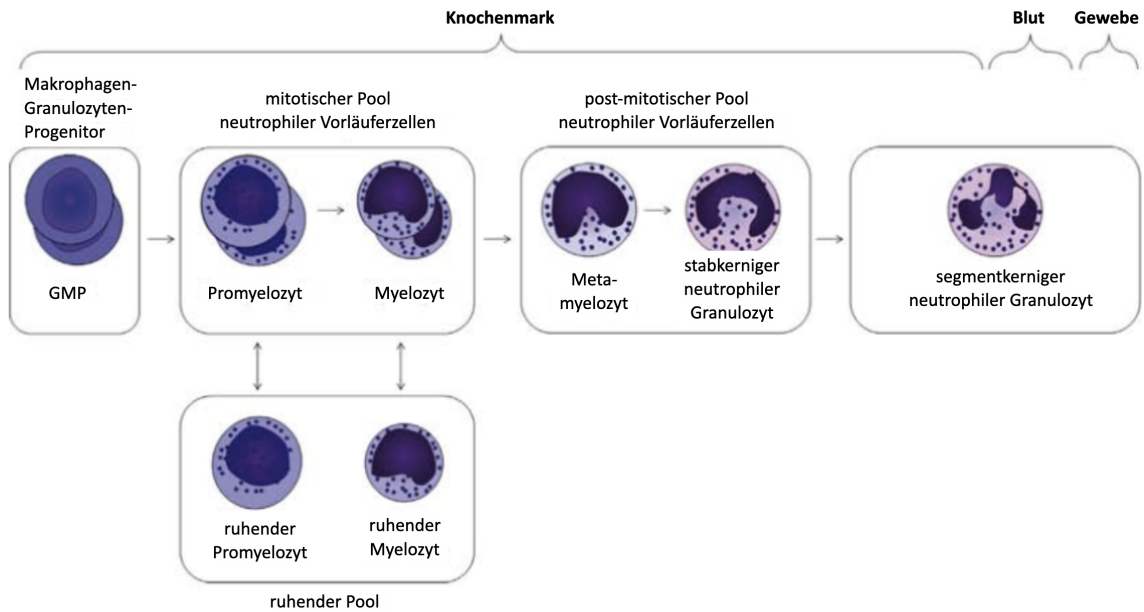


Abbildung 7. Verschiedene Stadien der Granulopoese nach [91].

Lange wurde für neutrophile Granulozyten nur eine vergleichsweise kurze Lebensdauer von wenigen Stunden im peripheren Blut angenommen. [94] Aktuellere Studien gehen von einer Zeit von etwa 12 Stunden aus, die ein neutrophiler Granulozyt im Blutkreislauf einer Maus zirkuliert. Nach Extravasation aus dem Blutkreislauf in das paravaskuläre Gewebe kann sich diese Lebensdauer, besonders unter inflammatorischen Bedingungen und einer damit verbundenen Hemmung der Apoptose, sogar um ein Vielfaches verlängern. [87, 89, 95-98]

Im Laufe ihrer Zirkulation im peripheren Blut „altern“ neutrophile Granulozyten unter anderem durch die Interaktion mit dem Mikrobiom oder dessen Sekretionsprodukten. Die mikrobiotisch induzierten Signale werden dabei von PRRs der neutrophilen Granulozyten, insbesondere TLR2 und TLR4, erkannt und führen über einen durch das Molekül MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) vermittelten Prozess zu einer schrittweisen Veränderung der Signalmuster innerhalb der Immunzelle. [99]

In der Folge verändert sich das Expressionsprofil für verschiedene Signal- und Adhäsionsmoleküle auf neutrophilen Granulozyten. So findet sich beispielsweise eine verminderte Expression von L-Selektin und eine vermehrte Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 auf der Oberfläche gealterter neutrophiler Granulozyten. Diese molekularen Veränderungen erlauben schließlich über die Interaktion von CXCR4 mit dem Liganden CXCL12 die Rekrutierung und den

Einleitung

Abbau dieser Immunzellen in Knochenmark, Leber und Milz. [100, 101] Unter homöostatischen Bedingungen ist der Abbau der gealterten neutrophilen Granulozyten im Sinne einer Feedbackschleife entscheidend an der Mobilisierung von neu gebildeten neutrophilen Granulozyten und hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark beteiligt. [93, 102] Hierbei werden apoptotische neutrophile Granulozyten von Makrophagen internalisiert. Makrophagen besitzen sogenannte Liver-X-Rezeptoren (LXR), nukleäre Rezeptoren, die durch oxidierte Produkte des Cholesterolfstoffwechsels aktiviert werden und als Transkriptionsfaktoren für multiple regulatorische Funktionen zuständig sind. Abhängig von LXR verringern Makrophagen das Expressionsniveau von CXCL12, was wiederum die genannte Freisetzung von neu gebildeten neutrophilen Granulozyten und Stammzellen aus dem Knochenmark bewirkt. [99, 100, 102]

Neben der Mobilisation neu gebildeter Zellen kann die phänotypische Veränderung neutrophiler Granulozyten im Rahmen ihrer mikrobiotisch vermittelten Alterungsprozesse auch von funktioneller Bedeutung für die Zellen selbst sein. So zeigte sich beispielsweise auf neutrophilen Granulozyten des gealterten Subtyps eine vermehrte Aktivierung des Signal- und Adhäsionsmoleküls CD11b/Mac-1 im Vergleich zu nicht gealterten neutrophilen Granulozyten. [99]

Kommt es im Organismus zu einer stärkeren Entzündungsreaktion, beispielsweise im Rahmen einer Infektion, können im Knochenmark vorrätige neutrophile Granulozyten, vermittelt durch Chemokine, zusätzlich rasch in die Zirkulation mobilisiert werden. Auslösend für die Mobilisierung sind zum Beispiel das koordinierte Zusammenspiel der CXC-Chemokine CXCL1 und CXCL2 mit dem Wachstumsfaktor G-CSF. [103]

Wie eingangs erwähnt, gehören neutrophile Granulozyten zu den ersten Zellen, die zu Beginn einer Entzündung rekrutiert werden. Grundlage für ihren schnellen Einsatz am Ort der Schädigung ist dabei die zielgerichtete Extravasation in entzündetes Gewebe. [26]

2.5 Rekrutierung neutrophiler Granulozyten

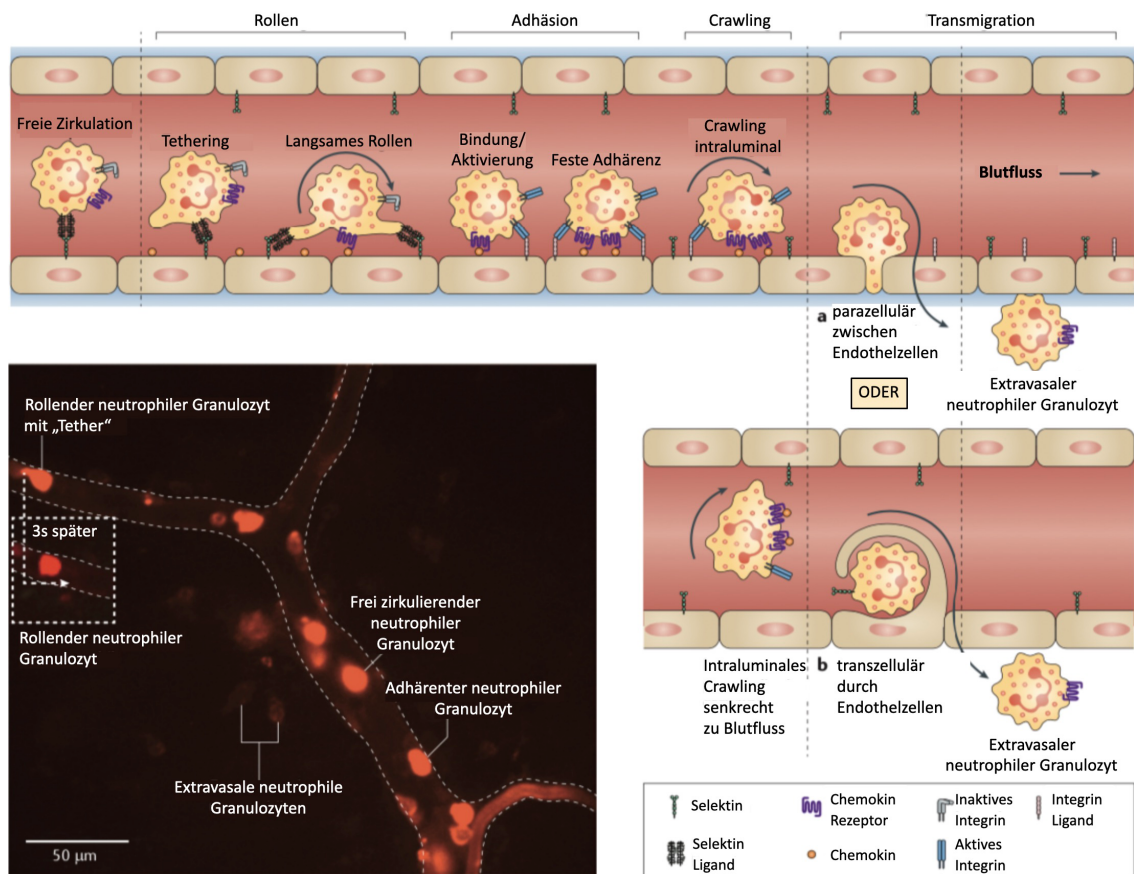


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Rekrutierungskaskade neutrophiler Granulozyten sowie intravitalmikroskopische Aufnahme einer entzündeten postkapillären Venole mit fluoreszenzmarkierten neutrophilen Granulozyten (Ly6G⁺ Phycoerythrin-markiert) in unterschiedlichen Stadien der Rekrutierung in (modifiziert nach [89]).

Leukozyten stellen einen essentiellen Bestandteil der initialen Immunantwort im Rahmen einer Entzündungsreaktion dar. Um effektiv an den Ort der Inflammation zu gelangen, müssen Leukozyten aus der Zirkulation dorthin rekrutiert werden. Grundlage hierfür ist die Adhärenz an und Transmigration durch die Gefäßwand. Der erste Schritt der Rekrutierungskaskade ist hierbei Aktivierung von Endothelzellen in postkapillären Venolen. Infolge einer Infektion im Gewebe werden gewebsständige Zellen (z.B. Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen) aktiviert, welche wiederum vermehrt pro-inflammatorische Botenstoffe ausschütten und eine Aktivierung der Endothelzelle vermitteln. Diese Aktivierung kann zum einen schnell, nämlich durch die Expression bereits in der Zelle vorrätiger Adhäsionsmoleküle, an der Zelloberfläche stattfinden. So

Einleitung

sind in den sogenannten Weibel-Palade Körperchen der Endothelzellen P-Selektine gespeichert, welche innerhalb weniger Sekunden und Minuten an die Oberfläche mobilisiert werden können. Dies ist beispielsweise bei der Stimulation durch Histamin, Tumornekrosefaktor (TNF) oder Plättchenaktivierender Faktor (PAF) der Fall. Die, im Vergleich hierzu langsamere, andere Aktivierungsmöglichkeit des Endothels beruht auf der vermehrten Transkription und *De-novo*-Synthese von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin und wird z.B. durch Zytokine wie Interleukin 1-beta (IL-1 β) oder ebenfalls durch TNF initiiert. [89, 104, 105]

Ist die Gefäßwand aktiviert, so können Leukozyten an den vermehrt exprimierten, in das Gefäßlumen reichenden Selektinen Kontakt finden (*capturing* oder *tethering*) und beginnen entlang des Endothels zu rollen. Auch das Rollen wird hauptsächlich durch die Interaktion verschiedener Selektine mit deren Liganden vermittelt. E- und P-Selektin finden sich dabei auf der Oberfläche der aktivierten Endothelzellen. L-Selektin ist dagegen vor allem auf Leukozyten zu finden. Die Selektine binden an glykosylierte Liganden wie PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*), ESL-1 (*E-Selectin Ligand 1*) oder CD44. Diese Bindungen müssen schnell getrennt und neu formiert werden können, um auch bei hohen Scherkräften ein effektives Rollen zu ermöglichen. An dem der Rollbewegung entgegengesetzten Teil der Zelle bilden Leukozyten lange, mit Adhäsionsmolekülen wie PSGL-1 oder dem Integrin LFA-1 besetzte Membranausziehungen (*tethers*), die in der Folge peitschenartig nach vorne schlagen (*slings*) und dort einen erneuten Kontakt am Endothel vermitteln können. Die Form dieser Zellausläufer ermöglicht einen langstreckigen Leukozyten-Endothelzell-Kontakt, dessen Bindungen sich bei jeder Umdrehung schrittweise ablösen. Im weiteren Verlauf können Leukozyten auch mit anderen Leukozyten interagieren und diese ebenfalls an der Gefäßwand einfangen (*secondary tethering*). Während die Immunzellen an der Gefäßwand entlangrollen, werden auch sie durch chemotaktische Moleküle, welche auf der luminalen Seite der Endothelzellen präsentiert werden (beispielsweise TNF, PAF oder verschiedene Chemokine) aktiviert, was wiederum die Grundlage für weitere Schritte der Rekrutierung ist. Chemokine können anhand der Konfiguration ihrer Cysteinreste am Aminoterminus kategorisiert werden. Sogenannte CXC-Chemokine (wie CXCL1 oder CXCL2) aber auch CC-

Einleitung

Chemokine (wie CCL3) sind beispielsweise in die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten involviert. [106-109] Das räumliche und zeitliche Muster der Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren ermöglicht hierbei die zielgerichtete Migration der jeweiligen Leukozytenart zum Entzündungsgeschehen. Infolge der chemotaktischen Aktivierung verändert sich in einer G-Protein-vermittelten Reaktion die Konformation bestimmter Oberflächenproteine, der β 1- oder β 2-Integrine (beispielsweise CD11a/LFA-1 oder CD11b/Mac-1) auf den Leukozyten (sog. *Inside-out signaling*). Dies erhöht die Affinität der Integrine für ihre Liganden wie ICAM-1 und VCAM-1 am Gefäßendothel. Das Rollen der Immunzellen verlangsamt sich (*slow rolling*) durch die Interaktion der genannten Integrine mit deren endothelialen Liganden sowie durch E-Selektin-PSGL1 Bindungen an den Zellausläufern (*tethers/slings*). [105, 110]

In weiteren Verlauf gehen die Leukozyten eine feste Bindung mit dem Gefäßendothel ein. Entscheidend hierfür sind in hochaffiner Konformation vorliegende β 2-Integrine wie LFA-1 oder Mac-1, das β 1-Integrin VLA-4 sowie deren Liganden ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1. [105]

Um einen geeigneten Ort zum Verlassen der Blutzirkulation zu finden, verändern die Immunzellen ihre Form und bewegen sich langsam entlang des Gefäßlumens. Dieses sogenannte „*Crawling*“ wird vor allem durch CD11b/Mac-1 und ICAM-1 vermittelt. [111]

Im Rahmen der anschließenden Transmigration aus dem Gefäßsystem müssen die Leukozyten das Endothel, dessen Basallamina sowie eine Schicht aus Perizyten passieren. Prinzipiell bestehen für Leukozyten zwei Wege das Gefäßsystem zu verlassen: die transzelluläre sowie die parazelluläre Transmigration. Auf welche der beiden Arten die Leukozyten vornehmlich transmigrieren ist wiederum stark gewebespezifisch. [112]

Es existieren spezielle Regionen entlang der Basallamina, an denen die Expression von Strukturproteinen relativ erniedrigt ist. Diese sogenannten *low-expression-regions* decken sich wiederum mit räumlichen Lücken zwischen den einzelnen Perizyten. Das Gefäßsystem besitzt also spezielle Bereiche, an denen die Leukozyten bevorzugt transmigrieren können. Die Transmigration wird jedoch andererseits auch durch chemotaktische Gradienten und signalinduzierte morphologische Veränderungen von Immunzellen sowie zellulären und

Einleitung

extrazellulären Bestandteilen der Gefäßwand moduliert. Für den parazellulären Weg werden ursprünglich zwischen den einzelnen Endothelzellen befindliche, z.B. durch VE-Cadherin gebildete, Verbindungen gelockert. Allerdings spielt auch die Interaktion endothelialer Moleküle wie PECAM-1 oder JAM-A mit den auf der Leukozytenoberfläche lokalisierten Molekülen eine essentielle Rolle. [104, 110] Auch Perizyten exprimieren entsprechende Signal- und Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1, Chemokine sowie Membranrezeptoren. Damit stellen Perizyten wichtige Regulatoren für die Extravasation leukozytärer Zellen und deren Funktion im Interstitium dar. [113, 114]

Haben die Immunzellen das Gefäßsystem verlassen, bewegen sie sich entlang von Chemokin-Gradienten zum Ort des Entzündungsgeschehens. Innerhalb des interstitiellen Gewebes bewegen sich Leukozyten auf eine Art fort, die dem Bewegungsmuster von Amöben ähnelt. Hierbei verändern sie mit Hilfe des Zytoskeletts ihre Zellform, um entlang der chemotaktischen Gradienten zu wandern und zum Ort der Entzündung zu gelangen, wo sie ihre funktionellen Eigenschaften wahrnehmen können. [89, 115]

2.6 Funktionen von neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten zeichnen sich durch ein vielfältiges Arsenal an Mechanismen zur akuten Infektionsabwehr aus. Eine entscheidende Eigenschaft neutrophiler Granulozyten ist ihre Fähigkeit zur Phagozytose. Sie besitzen im Falle einer Infektion die Möglichkeit, vorhandene Pathogene über sogenannte Phagosomen in ihr Zellinneres einzuschließen, wo diese anschließend mittels reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species/ROS*) oder antibakteriellen Proteinen wie Cathepsinen, Defensinen oder Lysozymen bekämpft werden können. Der durch Nicotinamidadenindinucleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) vermittelten Bildung von ROS kommt dabei eine entscheidende Rolle zu. [27, 89, 90, 116, 117]

Neben der intrazellulären Funktion in Phagosomen können diese antimikrobiellen Substanzen von neutrophilen Granulozyten auch in den extrazellulären Raum freigesetzt werden und so auf außerhalb der Immunzelle befindliche Pathogene wirken. [89, 90]

Als weiteren Abwehrmechanismus besitzen neutrophile Granulozyten die Fähigkeit sogenannte NETs auszubilden, welche aus DNA-Strukturen bestehen, an die Proteine, Histone oder Enzyme gebunden sind. NETs können sich an Pathogene anheften, diese immobilisieren und zu deren Elimination, z.B. durch Phagozytose beitragen. Andererseits tragen NETs auch zu Gewebeschäden des Wirtsorganismus bei und können Thrombosen fördern. Die Abwehr mit NETs erfolgt erst ab einer vergleichsweise hohen Konzentration von proinflammatorischen Faktoren, alternativ können neutrophile Granulozyten die Größe der eingedrungenen Pathogene erkennen und setzen bei entsprechend großen Erregern ebenfalls NETs frei. [89, 118, 119]

Unter anderem aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer, der geringen Transkriptionsaktivität und einer dadurch zunächst als eindimensional angenommenen Funktion wurden neutrophile Granulozyten lange als homogene Leukozytenpopulation betrachtet. In verschiedensten wissenschaftlichen Arbeiten der letzten Jahre haben sich jedoch zunehmend Hinweise für eine Plastizität der Transkription und ein damit verbundenes Vorliegen unterschiedlicher Subtypen oder zumindest unterschiedlicher Phänotypen neutrophiler Granulozyten gezeigt. [120-125]

Einleitung

Wie bereits erwähnt, verändern neutrophile Granulozyten das Expressionsprofil ihrer Oberfläche im Sinne eines Alterungsprozesses während des Kontaktes zum Mikrobiom und durch die hiermit erhaltenen Signale. Die phänotypischen Veränderungen manifestieren sich auch in einzelnen, funktionellen Unterschieden, beispielsweise bezüglich der Ausbildung von NETs oder der Aktivierung des Signal- und Adhäsionsmoleküls CD11b/Mac-1. [99]

Im Rahmen der Entzündung ablaufende zelluläre Prozesse gehen durch die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten ebenfalls mit phänotypischen Veränderungen einher. So können in Vesikeln gespeicherte, bereits synthetisierte Oberflächenproteine bei Bedarf rasch an die Zelloberfläche mobilisiert werden. Infolge der Stimulation durch das Endothel kommt es so beispielsweise zu einer vermehrten Expression verschiedener Moleküle wie CD11b/Mac-1 und CD18 sowie zu einer Konformationsänderung der membranständigen β 1- und β 2-Integrine. [121]

Im Kontext der Sepsis besitzen neutrophile Granulozyten eine ambivalente Bedeutung. Als fundamentaler Teil der akuten Immunreaktion kommt ihnen eine essentielle Rolle in der Bekämpfung bakterieller Infektionen, wie auch in der Sepsis, zu. So manifestieren sich funktionelle Defizite von neutrophilen Granulozyten (z.B. bei genetischen Erkrankungen wie der chronischen Granulomatose) aber auch neutropene Zustände (z.B. bei Leukämie oder nach Chemotherapie) in einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionserkrankungen und Sepsis. [126-131] Die potenten akuten Abwehrmechanismen neutrophiler Granulozyten können jedoch auch mit Kollateralschäden des Gewebes verbunden sein. Zudem ist in den späteren, antiinflammatorischen Phasen der Sepsis zu beobachten, dass trotz weiterhin erhöhter Anzahl an neutrophilen Granulozyten eine relevante Immunsuppression mit entsprechend erhöhter Infektionsgefahr besteht. [132-135]

Trotz der wissenschaftlichen und klinischen Fortschritte sind viele pathophysiologische Aspekte der Sepsis weiterhin unzureichend verstanden. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Zelltyp der neutrophilen Granulozyten im Kontext akuter Entzündungsreaktionen näher zu charakterisieren und zu untersuchen, inwiefern sich Verhalten und Funktionalität dieser Zellen durch den

Einleitung

Alterungs- oder Reifungsprozess in der Blutzirkulation unter inflammatorischen Bedingungen verändern.

Zielsetzung

II Zielsetzung

Als Ziel für diese Studie wurde definiert:

die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften gealterter neutrophiler Granulozyten unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen zu charakterisieren.

III Material und Methoden

1. Vorbemerkungen

Die nachfolgend aufgeführten Versuche fanden in der Zeit von April 2015 bis Juli 2017 im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Genehmigung der Regierung von Oberbayern (AZ 55.2-1-54-2531.84/09 und 55.2-1-54- 2532-115-12) statt.

Ergebnisse und Teile der Methoden der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Uhl, B., et al., *Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response*. Blood, 2016. **128**(19): p. 2327-2337.

2. Modelle

2.1 Versuchstiere

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden als Versuchstiere Mäuse verschiedener Zuchtlinien verwendet.

Für die tierexperimentellen Versuche wurden männliche Wildtyp (WT) C57BL/6 N Mäuse (Charles River, Sulzfeld), männliche Tlr2-Knockout-Mäuse (B6.129-Tlr2tm1Kir/J, JAX stock #004650, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) [136], männliche Tlr4-defiziente Mäuse (B6.B10ScN-Tlr4lps-del/JthJ, JAX stock #007227, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) [137, 138] und männliche P-Selektin/CD62P-defiziente Mäuse (B6.129s7-Selp/J, JAX stock #002289, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) [139] eingesetzt.

Zum Zeitpunkt der Versuche waren die jeweiligen Mäuse zwischen 10 und 15 Wochen alt, bei der Durchführung ausgewählter Experimente 6 Wochen alt. Alle Tiere wurden in der Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin in Makrolon-Käfigen zu Gruppen von je 2 bis 4 Mäusen gehalten, wobei besonderen Wert auf die kontinuierliche Einhaltung des natürlichen Tag-Nacht-

Rhythmus, den freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter sowie die Vermeidung unnötiger Stressfaktoren gelegt wurde.

2.2 Narkose

Die Tiere wurden über eine intraperitoneale Injektion einer 1:5 Mischung aus Ketamin (Ketaset, 100mg/kgKG) und Xylazin (Rompun, 2%, 10 mg/kgKG) anästhesiert und narkotisiert. Vor und während des Versuchsverlaufes wurde die ausreichende Narkosetiefe anhand regelmäßiger Untersuchungen (in Abständen von etwa 10 Minuten) durch Prüfung des Flexorreflexes und der Atmung kontrolliert. Bei Bedarf wurde die Narkose mittels erneuter Injektion von Ketamin (100mg/kgKG) aufrechterhalten.

Um eine konstante Körpertemperatur der Tiere zu gewährleisten, fanden alle chirurgischen Eingriffe auf einer Heizplatte statt. Die Temperatur wurde kontinuierlich über eine Analsonde gemessen. Während intravitalmikroskopischer Aufnahmen verhinderte eine regulierbare Wärmelampe ein Auskühlen der Tiere.

2.3 Operative Techniken

Alle folgend erläuterten Eingriffe wurden ausnahmslos in tiefer Vollnarkose durchgeführt. Regelmäßiges Testen auf ein Ausbleiben des Flexorreflexes (Test des Zwischenzehenreflexes durch Pinzette) und Beobachtung der Atmung diente der Beurteilung der ausreichenden Narkosetiefe. Die mikrochirurgischen Operationen fanden unter Verwendung eines Leica M651 Operationsmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland, 5-42-fache Vergrößerung) statt.

2.3.1 Präparation der *A. femoralis* mit Kathetereinlage

Die Kanülierung der *Arteria femoralis* stellt eine schnelle und zuverlässige Möglichkeit dar, einen Zugang zum Gefäßsystem des Versuchstieres zu erlangen, um verschiedene Substanzen zu verabreichen. Die Maus befindet sich

während des Eingriffs in Rückenlage. Zunächst werden die Unterschenkel des Tiers mit Klebestreifen auf der Unterlage fixiert. Nach Desinfektion des zu operierenden Gebietes erfolgt mit einer mikrochirurgischen Schere eine circa fünf Millimeter lange Inzision an der medialen Seite des außenrotierten Hinterbeins. Bei korrekter Schnittpositionierung stellt sich nun die Gefäß-Nerven-Scheide des Oberschenkels mit *V. femoralis*, *A. femoralis* und *N. femoralis* - von medial nach lateral - dar. Nach Entfernung des umliegenden Fett- und Bindegewebes wird die Gefäß-Nerven-Scheide über die Länge des Operationsgebiets eröffnet und der lateral liegende *N. femoralis* wird atraumatisch von der Arterie gelöst. Anschließend kann diese Arterie auf gleiche Weise von der benachbarten *V. femoralis* getrennt werden. Sobald die Arterie frei liegt, wird distal eine Ligatur platziert, zusätzlich vorübergehend noch eine mikrochirurgische Klemme am proximalen Abschnitt der freiliegenden Arterie, um den Blutaustritt während der Kanülierung des Gefäßes zu reduzieren.

Nach Einstich der Gefäßwand mit einer 30G Kanüle wird ein zuvor mit physiologischer Kochsalzlösung luftleer gespülter Polypropylen-Katheter in der Arterie platziert und mit einer zweiten Ligatur fixiert. Anschließend wird die Haut fortlaufend vernäht.

2.3.2 Präparation des *M. cremaster*

Der *Musculus cremaster* liegt zwischen *Fascia spermatica interna* und *Fascia spermatica externa* als eine der den Hoden umhüllenden Schichten. Die Fasern des *M. cremaster* spalten sich vom unteren Rand des *M. obliquus internus abdominis* ab und ziehen durch den Leistenkanal ins Scrotum. Durch seinen äußerst dünnen Aufbau ermöglicht die Freilegung des *M. cremaster* eine hochqualitative Visualisierung der Mikrozirkulation des lebenden Tieres. In Kombination mit Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie können beispielsweise verschiedenste Prozesse der Leukozytenrekrutierung von unterschiedlichen Subpopulationen in Echtzeit dargestellt werden.

Die chirurgische Vorgehensweise entsprach mit kleinen Modifikationen der Erstbeschreibung von Baez. [140] Die Mäuse wurden für diesen Eingriff in Rückenlage auf einer Wärmeplatte platziert. Nach ventraler Inzision der

Skrotalhaut und Entfernung des umliegenden Bindegewebes wurde der *M. cremaster* in einem möglichst gefäßarmen Areal längs elektrokoaguliert, chirurgisch eröffnet und daraufhin über einem eigens konstruierten Podest mit fünf 30G-Kanülen aufgespannt. Anschließend wurden Hoden und Nebenhoden vom Muskelgewebe getrennt und in die Bauchhöhle reponiert.

Während der gesamten Operation wurde das Gewebe mit einer warmen, gepufferten Salzlösung superfundiert.

2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Unter Fluoreszenzmikroskopie versteht man prinzipiell Verfahren der Mikroskopie, die sich den physikalischen Effekt der Fluoreszenz zu Nutze machen. Der Begriff Fluoreszenz bezeichnet die Emission von Licht einer bestimmten Emission-Wellenlänge, welches ein Fluorophor nach Absorption von Licht einer typischerweise kürzeren Exzitations-Wellenlänge emittiert. Die Wellenlängendifferenz zwischen Anregungs- und Emissionslicht, der sogenannte Stokes-Shift, ermöglicht das gezielte Herausfiltern des Exzitationslichtes, wodurch sich das letztendlich vom Mikroskop detektierte Signal auf die Fluoreszenz des zu untersuchenden Objektes beschränken lässt. Fluoreszierende Moleküle werden in ihren spezifischen Eigenschaften über die Elektronenkonfiguration auf ihrem äußersten Orbital bestimmt. Bei Absorption von Lichtenergie in Form eines Photons kann ein Elektron vorübergehend in einen höheren Energiezustand übergehen und auf ein weiter vom Kern entferntes Orbital bewegt werden. Kehrt das Elektron daraufhin wieder in seinen ursprünglichen Energiezustand zurück, so wird die überschüssige Energie unter anderem in Form von Fluoreszenzlicht abgegeben. [141] Die Veränderung des energetischen Niveaus der Elektronen kann durch ein sogenanntes Jablonski-Diagramm dargestellt werden (Vgl. Abbildung 10).

Es existieren verschiedene Arten der Fluoreszenzmikroskopie, von denen die 1-Photon-Fluoreszenzmikroskopie im Rahmen der in dieser Arbeit vorgestellten Versuche zum Einsatz kam.

Nach systemischer Fluoreszenzmarkierung können mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie ausgewählte Leukozytensubpopulationen in einem

Material und Methoden

dynamischen Kontext selektiv dargestellt werden. Dies ermöglicht es, Subtyp-spezifische Beobachtungen zu einzelnen Schritten der Leukozytenrekrutierung in einem dynamischen Kontext vorzunehmen. Eine Limitation der klassischen Intravitalmikroskopie besteht in der Visualisierung interstitieller Leukozyten, beziehungsweise generell in der differenzierten Darstellung interstitiellen Gewebes (z.B. Bindegewebe, Muskulatur, Gefäße) aufgrund einer diesbezüglich unzureichenden Bildkontrastierung. Hierfür wurde von *Mempel et al.* ein spezielles Mikroskopieverfahren, die sogenannte near-infrared reflected light oblique transillumination- (RLOT) Intravitalmikroskopie entwickelt. [142] Bei der RLOT-Intravitalmikroskopie befindet sich unter dem zu untersuchenden Objekt ein geneigt angebrachter Spiegel. Dadurch werden Teile des auf dem Gewebe auftreffenden nah-infraroten Lichtes direkt vom untersuchten Objekt reflektiert wohingegen ein weiterer Anteil das Gewebe durchdringt, auf den Spiegel trifft und von diesem schräg wieder durch das untersuchte Objekt zurück reflektiert wird. Die daraus resultierende Brechung des Lichts in verschiedene Phasengradienten ermöglicht es, mithilfe dieser Methode eine deutlich verbesserte Kontrastierung der interstitiellen Strukturen zu erreichen.

Zentrales Element der *In-vivo*-Versuche mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie war ein Axio Scope.A1 Mikroskop mit einer Colibri 2 LED-Lichtquelle (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland).

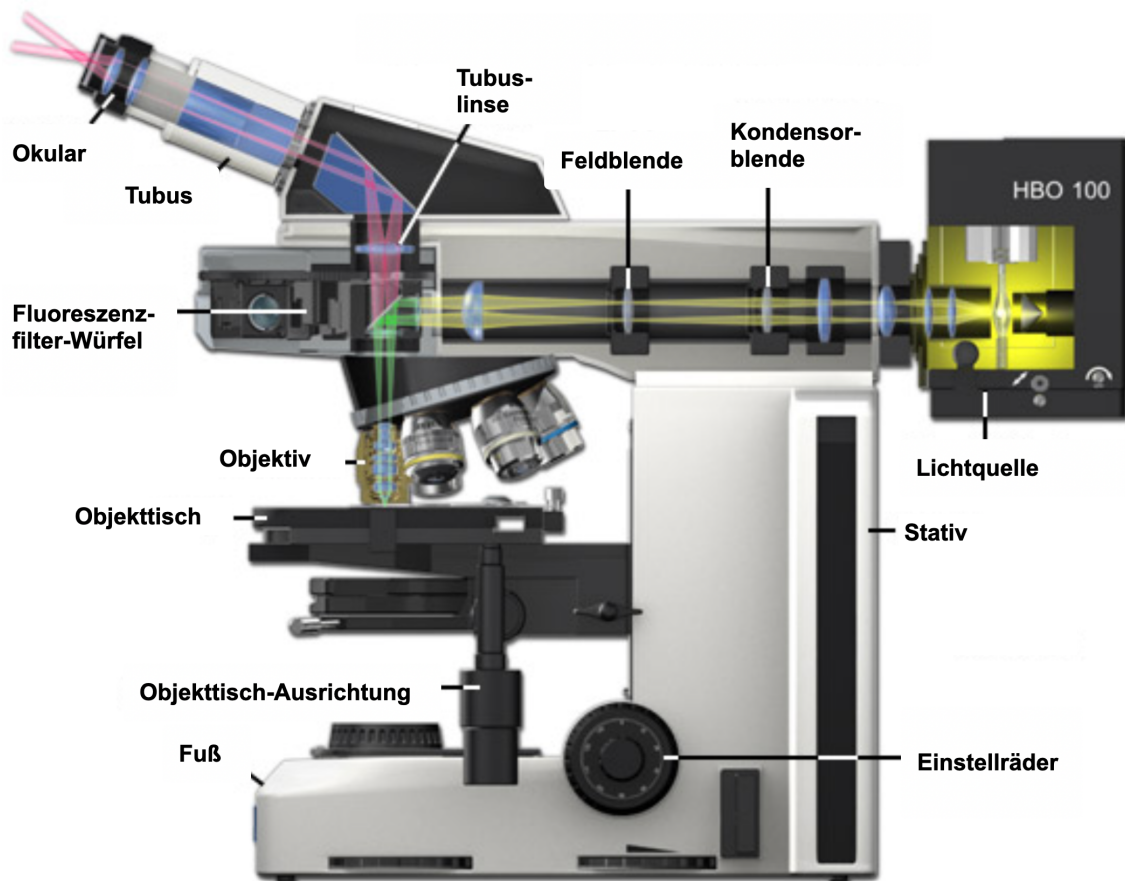


Abbildung 9. Schematischer Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops (modifiziert nach [143]).

Im Rahmen der Versuche zu gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten wurden die entsprechenden Zellen mit CellTracker™ Green CMFDA oder CellTracker™ Red CMTPX gefärbt, um sie dann mit Licht verschiedener Wellenlängen in Kombination mit einem QUAD Filtersatz (QUAD DAPI/FITC/Cy3/Cy5 sbx HC Filterset; AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland) voneinander differenzieren zu können. [144]

Ein weiterer Kanal mit rotem Licht der Wellenlänge von 670nm und größer ermöglichte eine durchlichtmikroskopische Darstellung der Strukturen im Kremastermuskel (z.B. Gefäße, Bindegewebe, Muskel) mithilfe der RLOT-Mikroskopie. [144]

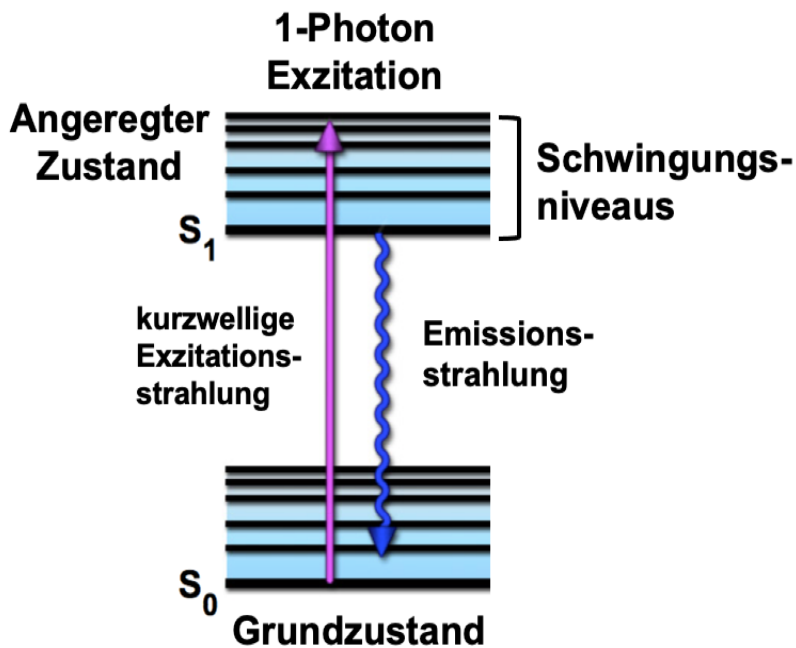


Abbildung 10. Jablonski-Diagramm für Ein-Photonenanregung fluoreszierender Moleküle (modifiziert nach [145]).

Um die Produktion und Freisetzung von ROS sowie die Phagozytose in neutrophilen Granulozyten zu visualisieren, kamen ergänzend konfokalmikroskopische Aufnahmetechniken zum Einsatz. Zunächst wurde Vollblut aus der *V. cava* von männlichen Mäusen entnommen, heparinisiert und mit PBS oder LPS versetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Blutproben mit CellROX® Farbstoffen (Vgl. Kapitel III 2.5.4) für 30 Minuten bei 37°C, um mitochondriale/nukleäre oder zytoplasmatische reaktive Sauerstoffspezies darzustellen oder die ebenfalls 30-minütige Inkubation mit *E.coli* Biopartikeln (Vgl. Kapitel III 2.5.5) zur Untersuchung der Phagozytose (ebenfalls bei 37°C). In der Folge wurde eine weitere Inkubation mit einem Alexa Fluor-594 markierten, monoklonalen, anti-Ly-6G-Antikörper (rat anti-mouse Ly-6G mAb; 1A8; BioLegend, San Diego, USA) für 30 Minuten auf Eis vorgenommen. Mithilfe einer Lysing Solution (1:10; BD FACS Lysing Solution; BD Biosciences, San Jose, California, USA) erfolgte daraufhin die Lyse der Erythrozyten, wonach die verbliebenen Zellen auf Fibronectin-beschichtete Deckgläser (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) verteilt wurden. Abschließend erfolgte das Anfärben des Zellkerns mit einem hoechst Nukleinsäure-Farbstoff für 15 Minuten. Mithilfe eines Leica SP8 Konfokalmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und einem Öl-Immersionsobjektiv (Leica; 100x; NA 1.40) wurden typischerweise

ca. 30 μm dicke, konfokale Fluoreszenzbilder erstellt. Die Schichtdicke pro Aufnahme betrug dabei 1,0 μm . [144]

2.4.1 Isolierung neutrophiler Granulozyten und Rekrutierungsanalyse nach Zelltransfer

Im Rahmen ihrer Rekrutierung in entzündetes Gewebe durchlaufen neutrophile Granulozyten definierte Schritte der in der Einleitung beschriebenen Rekrutierungskaskade. Um dynamische Untersuchungen zum Rolling, der Adhärenz und der Transmigration gealterter sowie nicht gealterter neutrophiler Granulozyten vorzunehmen, wurden intravitalmikroskopische Aufnahmen am *M. cremaster* von Wildtyp-Mäusen durchgeführt.

Zuvor wurden neutrophile Granulozyten aus dem Vollblut von Wildtyp-Mäusen sowie von P-Selektin/CD62P-defizienten Mäusen (SELP^{-/-}) isoliert und mit fluoreszierenden Antikörpern markiert.

Für die Isolation der Zellen wurde zunächst Vollblut aus der *Vena cava* der Wildtyp- und SELP^{-/-}-Mäuse entnommen. Daraufhin wurden die Erythrozyten unter Verwendung eines HetaSep™ Kits (4 HetaSep™ (STEMCELL Technologies, Sarl, Deutschland) aggregiert, sedimentiert und aus dem verbleibenden Blut entfernt. Anschließend wurde, entsprechend wissenschaftlicher Vorarbeiten, mithilfe des EasySep™ Mouse Neutrophil Enrichment Kits (STEMCELL Technologies, Sarl, Deutschland) sowie zweier EasySep™ Magneten eine Isolation neutrophiler Granulozyten vorgenommen. [146] Durch die verwendete Methode mit negativer Selektion von Zellen, die keine neutrophilen Granulozyten sind, konnten Zelllösungen hergestellt werden, die zu über 90% neutrophile Granulozyten beinhalten.

In SELP-defizienten Mäusen ist die Rekrutierung gealterter neutrophiler Granulozyten zurück in das Knochenmark gestört. Aus diesem Grund weist im Blut dieser Mäuse ein ausgeprägt hoher Anteil der neutrophilen Granulozyten einen gealterten Phänotyp auf (CXCR4^{high}, BrdU^{neg}). [99] Die aus SELP-defizienten Mäusen isolierten Proben, welche zu über 85 % aus gealterten neutrophilen Granulozyten bestanden, wurden mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff CellTracker™ Red CMTPX (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, USA) markiert. In den aus Wildtyp-Tieren gewonnenen Suspensionen wiesen ca. 20% der neutrophilen Granulozyten einen gealterten Phänotyp auf. Die Markierung der gewonnenen Zellen aus Wildtyp-Tieren erfolgte mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff CellTracker™ Green CMFDA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Die isolierten und fluoreszenzmarkierten Zelllösungen wurden Wildtyp-Mäusen anschließend in Narkose intraarteriell appliziert. Eine Stunde nach Verabreichung der markierten neutrophilen Granulozyten erfolgte die chirurgische Präparation des *M. cremaster* und anschließend der Beginn der intravitalmikroskopischen Aufnahmen. Nach der Bestimmung des Grundniveaus an leukozytärer Rekrutierungsaktivität in sog. Baseline-Aufnahmen wurde der *M. cremaster* mit einer 100 nM LPS-Lösung superfundiert. Die *In-vivo*-Aufnahmen wurden 30, 60, 90, 120, 150, und 180 Minuten nach Induktion der Inflammation wiederholt. [144]

2.5 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer ermöglichen mithilfe optischer Mechanismen eine Differenzierung einzelner Zellen eines zu untersuchenden Gewebes und darüber die Zuordnung der Zellen zu einzelnen Gruppen. Zentrales Element eines Durchflusszytometers sind ein oder mehrere Laser, welche monochromatisches Licht, also Licht einer definierten Wellenlänge, emittieren. Dieses trifft auf Zellen, die einzeln durch eine Messküvette strömen. Je nach Laserkonfiguration des Geräts können verschiedene Signale ausgewertet werden.

Zunächst wird das auf die Zellen treffende Licht je nach Zellart unterschiedlich gestreut. Das Vorwärtsstreulicht, der sogenannte „*Forward-Scatter*“, gibt dabei Aufschluss über die Größe der Zelle, das im 90-Grad Winkel dazu detektierte Seitwärtsstreulicht, der „*Side-Scatter*“, ist ein Maß für die Granularität einer Zelle. Zusätzlich können beispielsweise spezifische Antikörper oder Substanzen, welche direkt oder indirekt mit Fluorochromen markiert wurden, relevante Antigene oder Zielmoleküle auf oder in den Zellen binden beziehungsweise sich in spezifischen Kompartimenten anreichern. Es existieren eine Reihe an Fluorochromen, die jeweils ein bestimmtes Absorptions- und Emissionsspektrum

Material und Methoden

haben. Trifft monochromatisches Licht einer geeigneten Wellenlänge auf die Zelle, so werden die Fluorochrome angeregt und emittieren Licht einer anderen Wellenlänge. Dieses wird durch Filter und Spiegel vom restlichen Licht selektiert und kann daraufhin von einem Detektor gemessen werden. Über die Fluoreszenzintensität kann eine relative Quantifizierung der Menge einer gebundenen oder aufgenommenen Substanz ermittelt werden und darüber eine Klassifizierung der Zellen (beispielsweise Unterteilung von Leukozytensubpopulationen oder Bestimmung des Aktivierungsniveaus eines Leukozyten) durchgeführt werden. [147]

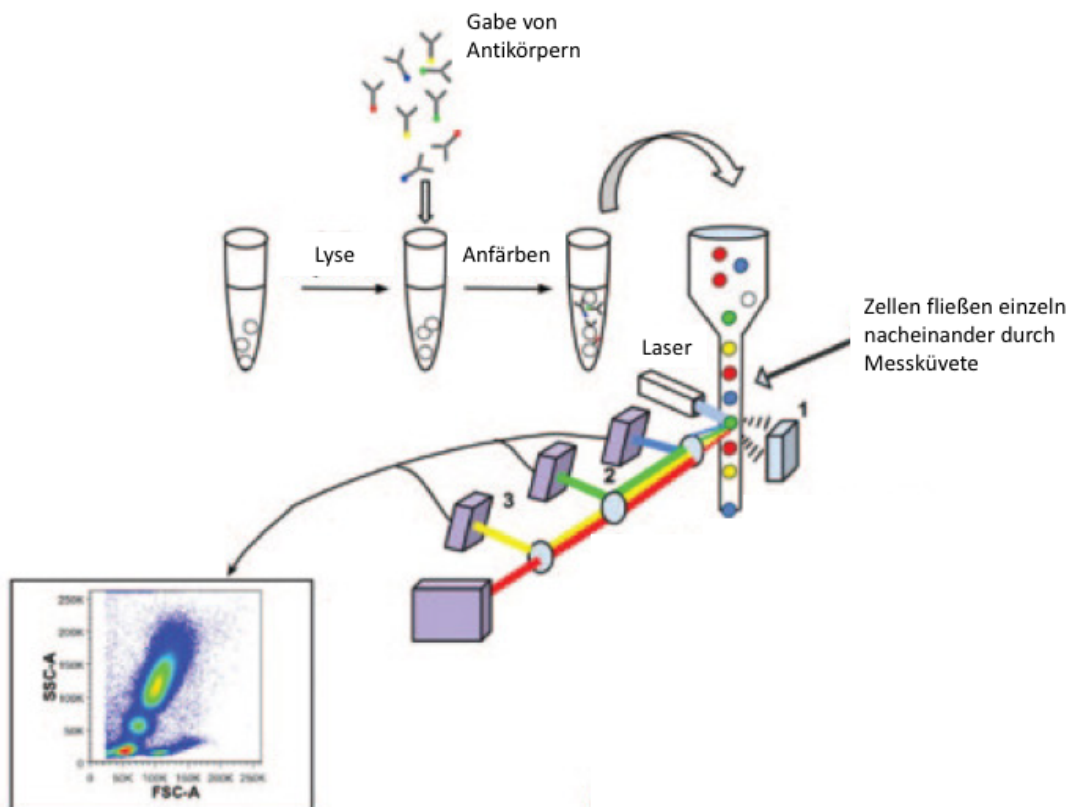


Abbildung 11. Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie (modifiziert nach [148]).

Für alle durchflusszytometrischen Versuche wurde ein GALLIOS Multi-Channel Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Irving, Texas, USA) mit drei Lasern (405nm, 488nm, 638nm) verwendet.

2.5.1 Differenzierung gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten mittels immunzytochemischer Färbungen und Durchflusszytometrie

Die Tyrosinphosphatase CD45 ist als Oberflächenantigen auf allen Leukozyten exprimiert. [149] Das Adhäsionsmolekül CD11b findet sich dagegen vor allem auf Zellen myeloischen Ursprungs und wird als immunzytochemischer Marker für diese Zellen verwendet. [150, 151] Am Durchflusszytometer wurden daher nach immunzytochemischer Fluoreszenzmarkierung von Blut oder Gewebehomogenisaten zunächst alle Leukozyten als CD45-positive Zellen selektiert und über die positive CD11b-Expression von nicht-myeloiden Leukozyten getrennt. [144]

Im Blut von Mäusen befindliche Monozyten exprimieren generell das Oberflächenantigen CD115 (M-CSFR, *macrophage colony-stimulating factor receptor*). [152] Murine neutrophile Granulozyten sind durch eine hohe Expression des Oberflächenmarkers Gr-1 (*granulocyte antigen-1*) charakterisiert. [153] In einem nächsten Schritt dienten deshalb die Marker Gr-1 und CD115 dazu, neutrophile Granulozyten von Monozyten zu differenzieren. Analog zu bereits publizierten Arbeiten wurden hierbei wurden myeloide Leukozyten mit einer hohen Expression von Gr-1 und niedrigen Expression von CD115 (Gr-1^{hi}, CD115^{neg}) als neutrophile Granulozyten definiert. [99, 154] Schließlich konnten mithilfe der im folgenden Abschnitt näher erläuterten BrdU-Markierung gealterte von nicht gealterten neutrophilen Granulozyten unterschieden werden (Vgl. Abbildung 16). [144]

2.5.2 BrdU-Markierung neutrophiler Granulozyten

Wie bereits von Hidalgo et al. beschrieben, ermöglicht die Markierung von neutrophilen Granulozyten mit 5-Bromdesoxyuridin (5-BrdU) eine Unterscheidung dieser Immunzellen hinsichtlich ihres relativen Alters im Blut beziehungsweise den Organen der Maus. [102] 5-BrdU ist ein Thymidin-Analogon, welches in die neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen integriert wird und sich in der Folge durch die Detektion mittels eines

fluoreszenzmarkierten Antikörpers an einem Durchflusszytometer nachweisen lässt. [155]

Die Mäuse erhielten eine einmalige intravenöse Injektion von 5-BrdU (2,5mg; FITC BrdU Flow Kit; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). 48 Stunden später erfolgte die Blutentnahme, um eine geeignete Trennung zwischen gealterten und nicht gealterten Zellen erzielen zu können. Neutrophile Granulozyten, deren Differenzierung vor der Injektion stattgefunden hatte, waren BrdU^{negativ} und wurden als „gealterter“ Subtyp von neutrophilen Granulozyten definiert. [144]

2.5.3 Integrin-Konformationen von gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten

Während ihrer Rekrutierung in entzündetes Gewebe durchlaufen neutrophile Granulozyten Schritte der Aktivierung, bei denen sich ihre membranständigen β 2-Integrine adaptiv verändern. Im Rahmen der Inflammation freigesetzte, endothelial lokalisierte Chemokine lösen dabei intrazelluläre Signalkaskaden der neutrophilen Granulozyten aus. In durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelten Reaktionen interagieren Proteine des Zytoskeletts wie talin-1 und kindlin-3 mit der zytoplasmatischen Basis der Integrine, woraufhin sich die Konformation der β 2-Integrine wie LFA-1 oder Mac-1 auf der Oberfläche dieser Immunzellen verändert. Dadurch steigt deren Affinität für Liganden auf der Endotheloberfläche, z.B. für ICAM-1 oder VCAM-1, was wiederum das Rollen an der Gefäßwand verlangsamt und schließlich die Adhäsion am Endothel unterstützt. [89, 110, 156]

Um die Konformation der Integrine auf gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurde antikoaguliertes Blut von Wildtyp Mäusen mit HBSS (Hank's balanced salt solution, Life Technologies, Carlsbad, USA) versetzt, welches 1 mM CaCl₂ und MgCl₂ enthielt. Anschließend wurde, wie bereits von Hyduk et al. beschrieben, das Bindungsverhalten für ICAM-1/Fc und VCAM-1/Fc über eine immunzytologische Färbung mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. [144, 157]

Material und Methoden

Zur Beurteilung des Konformationsstatus der Integrine auf gealterten neutrophilen Granulozyten in humanem Blut wurde aus dem Vollblut von gesunden Probanden zunächst die Population der neutrophilen Granulozyten anhand der *Side Scatter*-Eigenschaften und der Expression von CD45 und CD66b definiert. Der Alterungsstatus konnte anschließend mittels der in wissenschaftlichen Vorarbeiten beschriebenen Veränderungen der CXCR4 Expression bestimmt werden. [158, 159] Schließlich wurde auf den selektierten Zellen die Affinität der Integrine mit konformationsspezifischen mAb 24-Antikörpern (spezifisch für eine hochaffine Konformation von $\beta 2$ -Integrinen, monoklonaler Maus anti-human Antikörper, abcam, Cambridge, Großbritannien) und KIM127-Antikörpern (spezifisch für die intermediäre und hochaffine Konformation von $\beta 2$ -Integrinen, monoklonaler Maus anti-human Antikörper; freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. M. Sperandio) mittels des Durchflusszytometers untersucht. [144, 160]

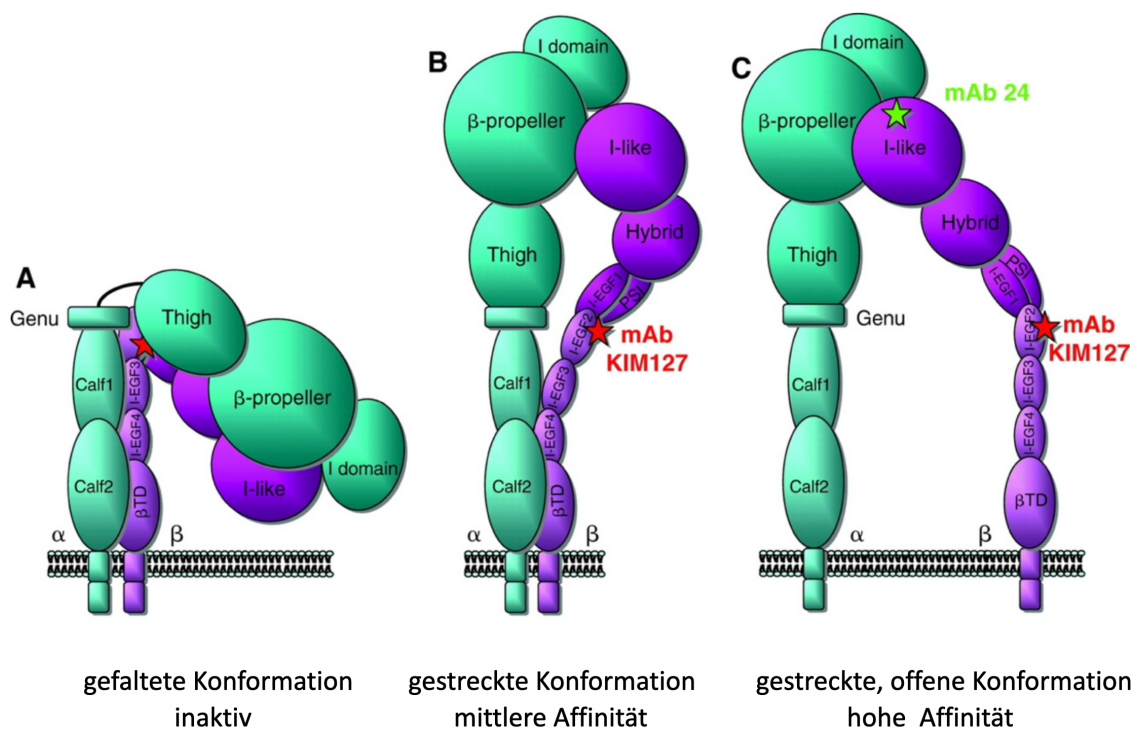


Abbildung 12. Konformationstypen der $\beta 2$ -Integrine und Bindungsstellen ihrer spezifischen Antikörper (modifiziert nach [161]).

2.5.4 Intrazelluläre Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Zytokinen

Neutrophile Granulozyten verfügen über ein vielseitiges Repertoire an Abwehrmechanismen für die Bekämpfung pathogener Erreger. Werden sie im Rahmen einer Inflammation aktiviert, so können neutrophile Granulozyten über die NADPH Oxidase sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden. Aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung tragen ROS maßgeblich zur Beseitigung schädlicher Mikroorganismen durch Phagozyten bei. Zudem sind ROS über den Einfluss auf Signalkaskaden auch an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt. [162]

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur zytoplasmatischen und mitochondrialen/nukleären ROS-Produktion gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten aus dem Blut von Wildtyp Mäusen vorgenommen, nachdem diese mit PBS oder verschiedenen LPS-Dosen (1ng/ml - 1000ng/ml) stimuliert worden waren. Entsprechend wissenschaftlicher Vorarbeiten wurde die zytosolische ROS-Produktion mit CellROX® Deep Red (0,5µl pro 100µl Vollblut, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) visualisiert, für die Darstellung der mitochondrialen/nukleären ROS-Produktion wurden Zellfärbungen mit CellROX® Green (0,5µl pro 100µl Vollblut, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) vorgenommen. [163] Nach immunzytochemischer Fluoreszenzmarkierung erfolgte die Klassifizierung der Zellen per Durchflusszytometrie (anhand des unter Kapitel III 2.5.1 erläuterten Schemas) und die anschließende Quantifizierung der ROS-Produktion. [144]

Zudem erfolgte eine Analyse der intrazellulären Produktion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine durch gealterte sowie nicht gealterte neutrophile Granulozyten. Nach Stimulation mit PBS oder LPS (100ng/ml) wurde das Blut von Wildtyp-Mäusen hierfür mit Brefeldin A 1000X (0.1 µl/100 µl Blut) (eBioscience, San Diego, USA) versetzt, um den Proteintransport zum Golgi-Apparat der Zellen zu blockieren. In der Folge wurden gealterte und nicht gealterte neutrophile Granulozyten nach immunzytochemischer Markierung am Durchflusszytometer bestimmt. Nach Permeabilisierung der Zellen durch Saponin (0.1 % Saponin aus *quillaja bark*; Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

München, Deutschland) und Blockierung der Zellen mit einem BSA-Blockierungspuffer (2% bovines Serum Albumin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) wurden, analog zu bisher publizierten Studien, die Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF, IFN- γ , IL-4, IL-10 und IFN- α mit fluoreszenzmarkierten, monoklonalen Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. [144, 163, 164]

2.5.5 Phagozytosekapazität gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten

Die Phagozytose ist eine entscheidende Fähigkeit neutrophiler Granulozyten in der akuten Immunreaktion, da sie die effektive Eliminierung von Pathogenen während einer Infektion ermöglicht.

Um die Phagozytosekapazität gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten *in vitro* zu untersuchen, wurde das Blut von Wildtyp-Mäusen mit LPS oder LTA stimuliert. Anschließend erfolgte, entsprechend wissenschaftlicher Vorarbeiten, eine Inkubation mit *pHrodo Green E.coli*- oder *pHrodo Green Staphylococcus aureus*-Biopartikeln (jeweils 2 mg/ml; Thermo Fisher Scientific) für 30 min bei 37°C. [165] Daraufhin konnte, nach immunzytochemischer Markierung und Differenzierung der Zellen (Vgl. Kapitel III 2.5.1), die Menge von phagozytierten *pHrodo Green E.coli*- oder *pHrodo Green Staphylococcus aureus*-Biopartikeln am Durchflusszytometer untersucht werden. [144]

Für einen *In-vivo*-Vergleich der Phagozytose von gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten wurden 200ml *pHrodo Green Ecoli-Biopartikel-Konjugat* (2 mg/ml; ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) in die Schwanzvene von Wildtyp-Mäusen injiziert, in denen zuvor eine Endotoxämie induziert worden war. Nach einer Stunde wurde die Aufnahme der Biopartikel in neutrophilen Granulozyten untersucht, indem diese aus Blut, Knochenmark, Leber, Milz und Lunge der Mäuse isoliert und anschließend mittels Durchflusszytometer analysiert wurden. [144]

2.6 Versuchsprotokolle

2.6.1 Untersuchung des Migrationsverhaltens gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten

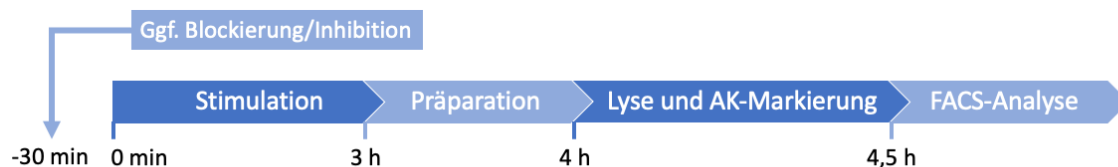


Abbildung 13. Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Versuchsprotokolls zur Untersuchung des Migrationsverhaltens gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten.

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten bei experimenteller Sepsis wurde das oben schematisch dargestellte Versuchsprotokoll erstellt. 48 Stunden vor Beginn der Stimulation erfolgte, wie bereits in Abschnitt 2.5.2 erläutert, eine systemische Injektion von 2,5 µg BrdU über einen Schwanzvenenkatheter. Am Versuchstag wurden den Versuchstieren entweder zur Stimulation 500 µg LPS (aus *Escherichia coli*, 0111:B4; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in 200 µl PBS oder für die Kontrollgruppe das gleiche Volumen an PBS intraperitoneal injiziert. Nach dreistündiger Inkubationszeit wurde das Tier anästhesiert (Vgl. Kapitel III 2.2). Nach Prüfung einer ausreichenden Narkosetiefe wurde zunächst venöses Blut aus der *V cava inferior* entnommen. Daraufhin folgte die Spülung des großen Kreislaufs durch eine Injektion von 20ml PBS über eine 22G Kanüle in den linken Ventrikel. Die *V. cava inferior* wurde zuvor durchtrennt, um einen Abflussweg zu schaffen. Anschließend wurden nacheinander das Knochenmark aus dem rechten Femur, die Milz, der linke Leberlappen, die rechte Lunge und die rechte Niere chirurgisch entnommen. Die soliden Organe wurden in einem nächsten Schritt unter Zugabe von PBS mit einem manuellen Homogenisator aus Glas (schuett-biotec GmbH, Göttingen, Deutschland) und einem 70µm Zellsieb (Falcon® Cell Strainer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zu einer Einzelzellsuspension homogenisiert.

Material und Methoden

Nachfolgend wurden die Zellhomogenisate mittels Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt (Vgl. Kapitel III 2.5.1), die roten Blutkörperchen lysiert und die restlichen Zellen der Proben mittels einer Lysing/Fixation-Solution (1:10; BD FACS Lysing Solution; BD Biosciences, San Jose, California, USA) fixiert. Diese wurden abschließend nach zwei Waschdurchgängen mit 500 µl PBS am Durchflusszytometer analysiert. [144]

Um in weiteren Versuchsgruppen die funktionelle Relevanz verschiedener Oberflächenproteine für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurde der geschilderte Versuchsablauf an dementsprechend genetisch-veränderten Mäusen oder nach initialer Gabe eines blockierenden Antikörpers beziehungsweise eines pharmakologischen Inhibitors durchgeführt. Die jeweiligen Wildtyp-Mäuse erhielten 30 Minuten vor Beginn der Stimulation mit LPS per Injektion in eine Schwanzvene entweder den pharmakologischen CXCR4-Inhibitor AMD3100, einen blockierenden monoklonalen anti-CXCL12 Antikörper oder den pharmakologischen TLR-4 Inhibitor TAK-242. Kontrolltiere erhielten das entsprechende Vehikel beziehungsweise den entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörper. Zudem wurde das Versuchsprotokoll auch an TLR-2- und TLR-4-defizienten Mäusen durchgeführt. [144]

2.6.2 *In-vitro*-Stimulation und durchflusszytometrische Analyse gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten

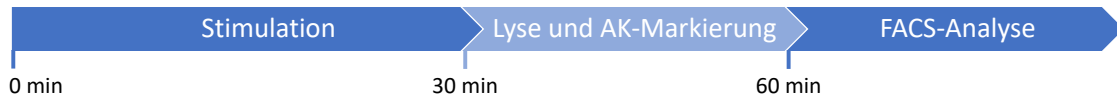


Abbildung 14. Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Versuchsprotokolls zur phänotypischen Charakterisierung gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten mittels Durchflusszytometrie.

Für eine phänotypische Charakterisierung gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten, aber auch zur Untersuchung funktioneller Charakteristika (z.B. Integrin-Affinität, Zytokin- und ROS-Produktion, Phagozytosekapazität) erfolgte zunächst, nach tiergerechter Narkotisierung, eine venöse Blutentnahme aus der *V. cava inferior* des Versuchstieres. Das Blut wurde daraufhin, je nach Versuchsansatz, mit LPS, LTA oder HMGB-1 stimuliert, das Kontrollblut mit dem gleichen Volumen PBS inkubiert.

Nach 30 Minuten erfolgte, analog zu III/2.6.1, die Vorbereitung der Zellen für das Durchflusszytometer unter der Anwendung der jeweils notwendigen Antikörper zur Differenzierung gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten sowie der Expression der zu untersuchenden Zielmoleküle und die abschließende durchflusszytometrische Analyse.

Zur Analyse einzelner Parameter wurden zusätzlich notwendige Maßnahmen zur Präparation der Zellproben vorgenommen. So musste zur Untersuchung der intrazellulären Zytokinproduktion zunächst der intrazelluläre Proteintransport blockiert und die Zellen anschließend permeabilisiert werden.

Die Visualisierung selektierter funktioneller Eigenschaften wie der ROS-Produktion und der Phagozytose erfolgte unter Verwendung spezifischer fluoreszierender Farbstoffe und Biopartikel. [144]

2.6.3 Intravitalmikroskopische Analyse der Leukozytenrekrutierung und der zugrundeliegenden Strukturen im Maus-Kremaster-Modell

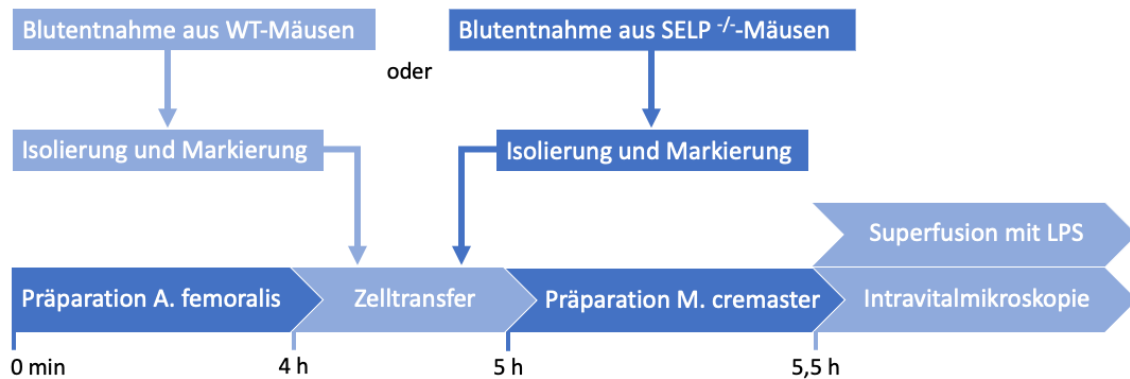


Abbildung 15. Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Versuchsprotokolls zur Analyse der Leukozytenrekrutierung im *M. cremaster* der Maus nach Stimulation mit LPS.

Um die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung (Intravaskuläres Rollen, intravaskuläre feste Adhärenz, Transmigration) von gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten differenziell zu visualisieren und analysieren, erfolgten intravitalmikroskopische Aufnahmen des *M. cremaster* der Maus. Hierfür wurden zunächst neutrophile Granulozyten aus dem Blut von Wildtyp-Mäusen oder P-Selektin/CD62P defizienten Mäusen (SELP^{-/-}) isoliert und mit immunzytochemischen Färbungen markiert. Anschließend erfolgte die operative Anlage eines *A. femoralis* Katheters an Wildtyp-Mäusen (Vgl. Kapitel III 2.3.1), über welchen die angefärbten neutrophilen Granulozyten verabreicht werden konnten. Eine Stunde nach intraarterieller Injektion der markierten neutrophilen Granulozyten wurde der *M. cremaster* der Wildtyp-Maus für die Intravitalmikroskopie präpariert (Vgl. Kapitel III 2.3.2) und anschließend mit der Aufnahme von Live-Videos postkapillärer Venolen im Kremastermuskel an einem Epifluoreszenzmikroskop begonnen. Initial erfolgten Baseline-Aufnahmen ohne Stimulation zur Bestimmung des durch die Präparation verursachten Entzündungsniveaus. In der Folge wurde der *M. cremaster* kontinuierlich mit einer 100 nM LPS-Lösung superfundiert und sequentielle Aufnahmen der

postkapillären Venolen 30, 60, 90, 120, 150, und 180 Minuten nach Beginn der LPS Superfusion angefertigt. [144]

2.7 Statistik

Die Angabe sämtlicher Versuchsergebnisse erfolgte als Mittelwert (MW) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Die Daten wurden unter Zuhilfenahme der Software Sigma Stat (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA) statistisch analysiert. Um die Versuchsergebnisse auf statistisch signifikante Unterschiede zu testen, wurde der Rank-Sum Test oder T-Test (bei zwei Versuchsgruppen) bzw. der ANOVA-on-Ranks Test, gefolgt von dem Student-Newman-Keuls Test (bei Anzahl der Versuchsgruppen beziehungsweise Parameter > 2), durchgeführt. Ergebnisse wurden bei $p < 0,05$ als signifikant angesehen. [144]

IV Ergebnisse

1.1 Migrationsverhalten gealterter neutrophiler Granulozyten bei experimenteller Sepsis

Während der Zirkulationszeit im Blut altern neutrophile Granulozyten unter anderem infolge der Interaktion mit dem Mikrobiom oder dessen Sekretionsprodukten phänotypisch und funktionell. Im Rahmen dieses Prozesses erhöht sich klassischerweise kontinuierlich die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten, während sich die Expression des Adhäsionsmoleküls L-Selektin/CD62L vermindert. Über die Zeit bildet sich abhängig von ihrer Zirkulationsdauer im Blutkreislauf somit ein Gradient von relativ „jungen“ neutrophilen Granulozyten mit niedriger CXCR4-Expression (und hoher L-Selektin-Expression) bis relativ gealterten neutrophilen Granulozyten mit hoher CXCR4-Expression (und niedriger L-Selektin-Expression) auf der Zelloberfläche. Im gesunden Organismus werden entsprechend „gealterte“ neutrophile Granulozyten über die Interaktion von CXCR4 mit dem Liganden CXCL12 aus dem zirkulierenden Blut entfernt und in Knochenmark, Leber und Milz abgebaut. [99, 100]

In einer ersten Versuchsgruppe sollte die Frage beantwortet werden, ob diese Leukozytensubpopulation „gealterter“ neutrophiler Granulozyten unter inflammatorischen Bedingungen eine funktionelle Relevanz besitzen und über das Gefäßsystem zum Ort des Entzündungsgeschehen rekrutiert werden.

Hierfür wurde das Migrationsverhalten gealterter neutrophiler Granulozyten in Tieren bei experimenteller Sepsis mit dem in gesunden, unstimulierten Tieren verglichen. Für beide Versuchsgruppen wurde die Anzahl an Leukozyten im Knochenmark, im Blut und nach Homogenisierung in verschiedenen, relevanten Organen (Leber, Lunge, Milz, Niere) bestimmt (Vgl. Kapitel III 2.6.1). Anschließend erfolgte die Auswertung der Zellen am Durchflusszytometer nach Differenzierung mittels immunzytochemischer Färbung (Vgl. Kapitel III 2.5.1.).

Jene neutrophilen Granulozyten, die sich zum Zeitpunkt der systemischen Applikation von BrdU, also 48 Stunden vor Messung am FACS, bereits im postmitotischen Stadium befanden waren BrdU-negativ und wurden als gealterte neutrophile Granulozyten definiert. Dagegen waren relativ nicht gealterte

Ergebnisse

neutrophile Granulozyten BrdU-positiv, da sie das applizierte Markierungsmolekül während der Mitose in ihre DNA integriert hatten. [144]

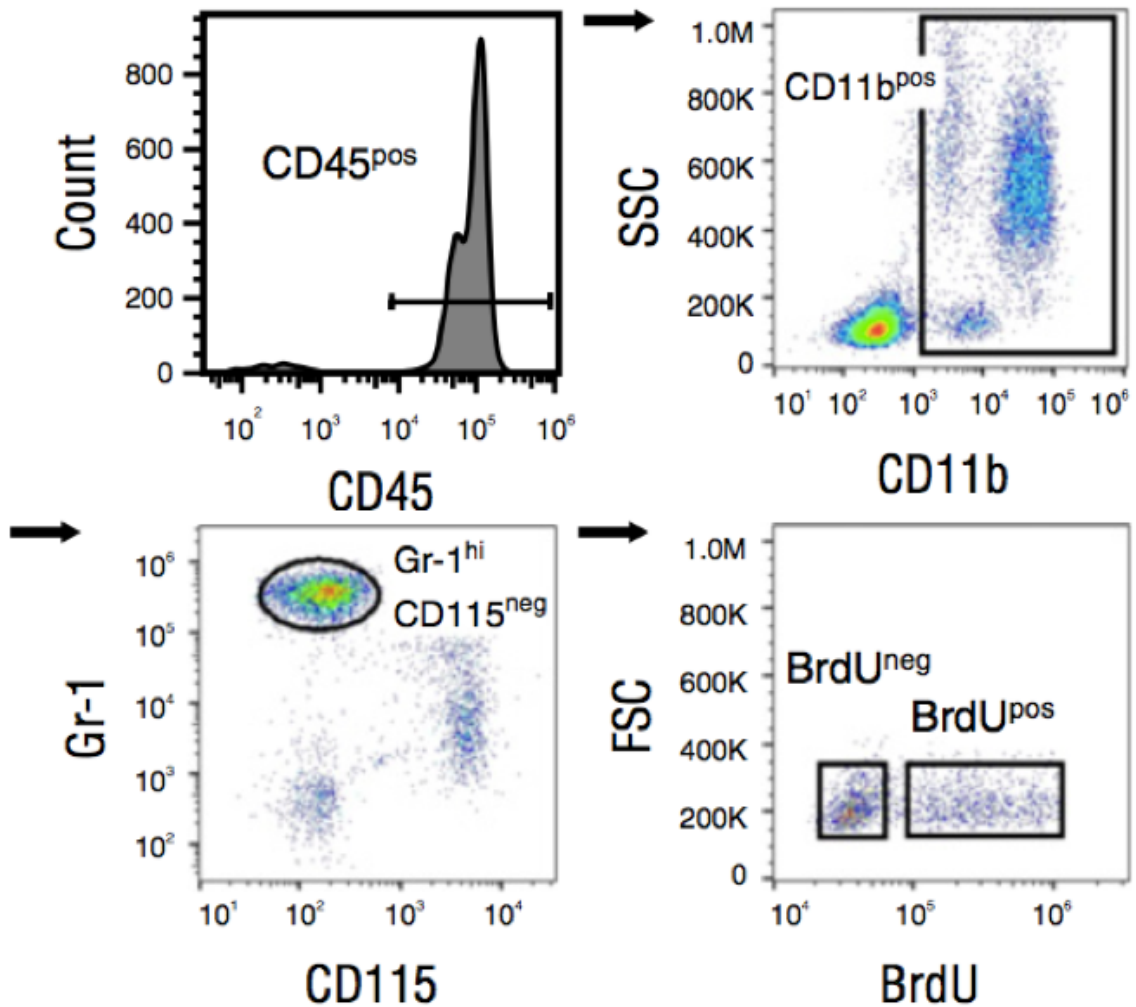


Abbildung 16. Schematische Darstellung der Gating-Strategie für die Differenzierung gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten mittels Durchflusszytometrie nach metabolischer Markierung mit BrdU; (modifiziert nach [144])

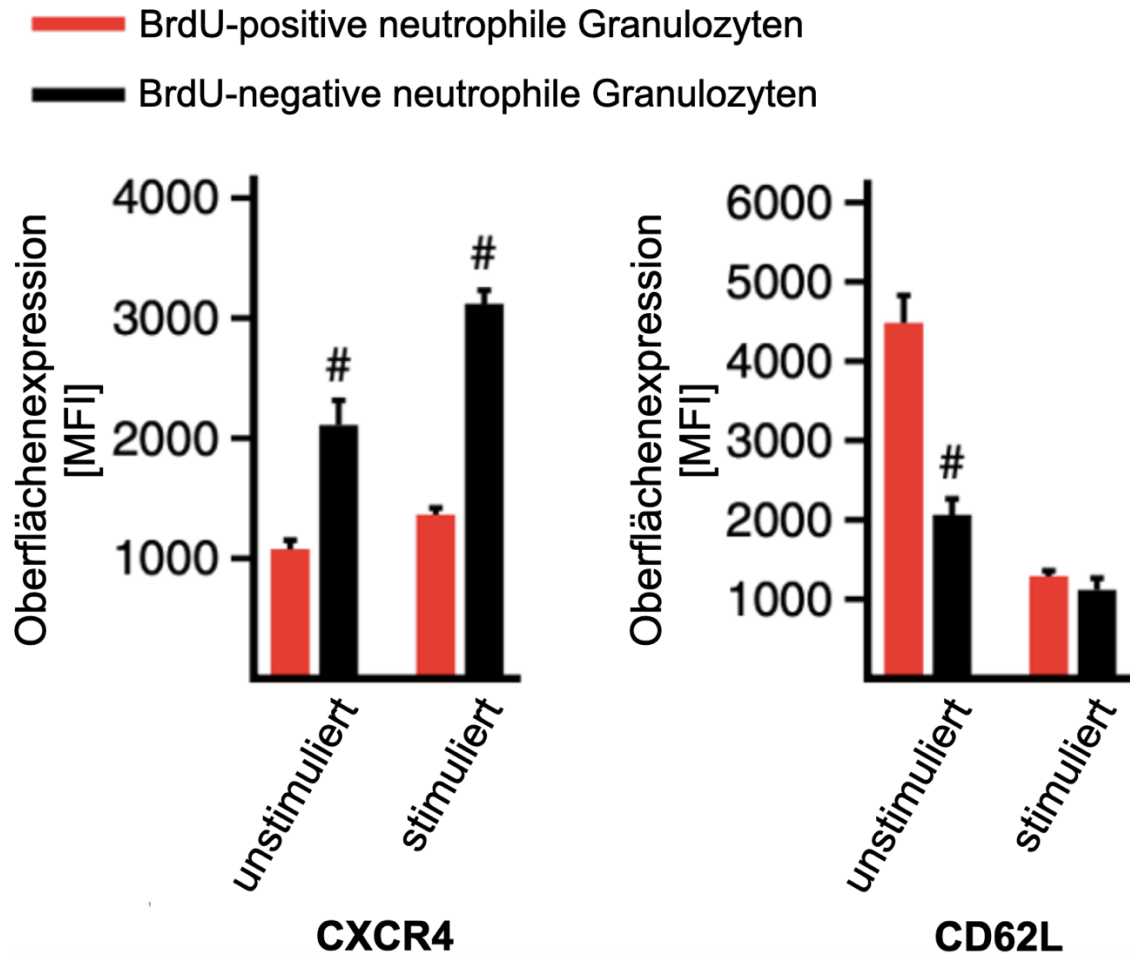


Abbildung 17. Graphische Darstellung der Oberflächenexpression von CXCR4 und CD62L auf gealterten (BrdU negativen) und nicht gealterten (BrdU-positiven) neutrophilen Granulozyten aus dem Blut von Wildtyp-Mäusen nach Exposition mit PBS (unstimulated) oder LPS (stimulated). Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente (n=4; # = p<0.05 vs BrdU positiv); (modifiziert nach [144]).

In Übereinstimmung mit bereits mehrfach publizierten Erkenntnissen wiesen gealterte neutrophile Granulozyten unstimulierter Mäuse eine signifikant erhöhte Oberflächenexpression von CXCR4 und eine signifikant erniedrigte Oberflächenexpression von CD62L auf. [99, 102] Nach Stimulation mit LPS zeigte sich die CXCR4 Expression auf beiden Leukozytensubtypen konstant zu den Versuchen unter Homöostase. Dagegen war auf nicht gealterten neutrophilen Granulozyten deutlich geringere CD62L-Expression messbar, sodass unter diesen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem gealterten und dem nicht gealterten Subtyp bestanden. CD62L eignete sich daher unter entzündlichen Bedingungen nicht als Marker für nicht gealterte neutrophile Granulozyten. [144]

Ergebnisse

Zur Induktion einer experimentellen systemischen Endotoxämie wurde den Mäusen eine hohe Dosis LPS intraperitoneal injiziert, 3 Stunden später fanden die Untersuchungen zum Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten statt. Die Dosierung der LPS-Stimulation entsprach dabei dem Versuchsprotokoll anderer Arbeitsgruppen bei der Untersuchung akuter Entzündungsreaktionen in der Maus. [166, 167] In ergänzenden Untersuchungen dieser Arbeit zeigten sich bei niedrig dosierter LPS Stimulation (25 µg) lediglich mäßige inflammatorische Reaktionen, sodass zur Induktion einer ausgeprägten akuten Entzündungsreaktionen eine hohe LPS Dosis (500 µg) beibehalten wurde (Vgl. Abbildungen 18 und 20). [144]

Bei Mäusen, die eine intraperitoneale Injektion von 500 µg LPS erhalten hatten, fanden sich nach 3 Stunden signifikant weniger gealterte neutrophile Granulozyten in Knochenmark und Blut als in gesunden, unstimulierten Tieren. Im Gegensatz dazu war die Anzahl gealterter neutrophiler Granulozyten in Leber, Niere und Lunge im Vergleich zu unstimulierten Kontroll-Tieren signifikant erhöht (Vgl. Abbildung 18). Bei der Bestimmung der relativen Anzahl gealterter neutrophiler Granulozyten in Lunge, Leber und Niere nach LPS Stimulation machten Zellen vom gealterten Subtyp etwa 50% bis 80% der gesamten Anzahl an in dem jeweiligen Organ gemessenen neutrophilen Granulozyten aus (Vgl. Abbildung 18). [144]

Ergebnisse

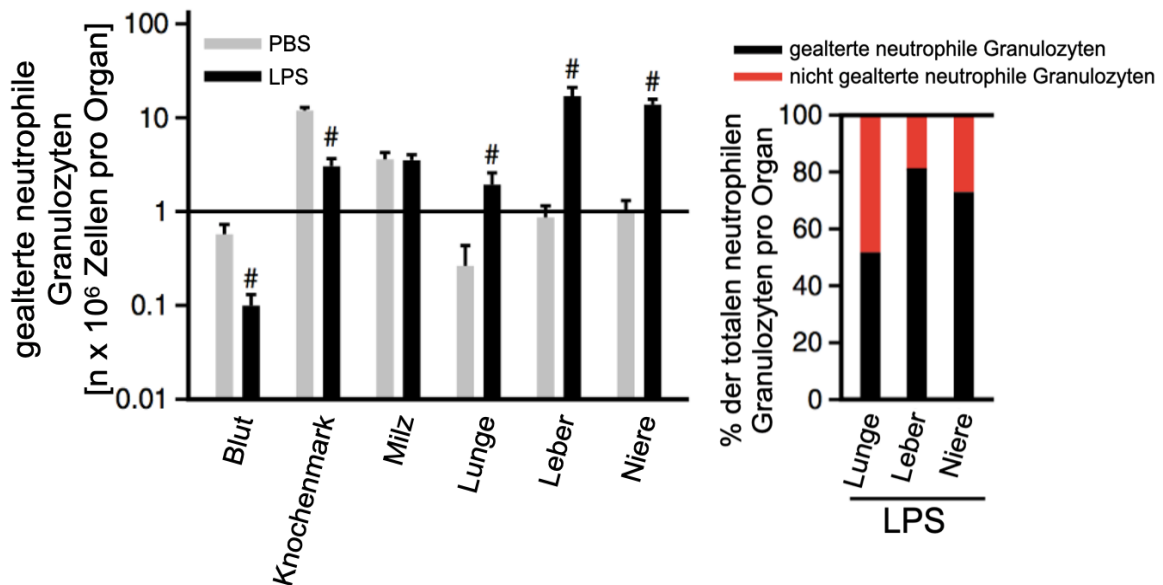


Abbildung 18. Graphische Darstellung der absoluten Anzahl gealterter neutrophiler Granulozyten in Blut, Knochenmark und relevanten homogenisierten Organen (links) sowie der relativen Anzahl gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten in ausgewählten Organen (rechts) von 10-15 Wochen alten WT-Tieren nach intraperitonealer Injektion von PBS oder 500 µg LPS. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente (n=5; # = p<0.05 vs PBS); (modifiziert nach [144])

Die geschilderten Versuche wurden an Mäusen durchgeführt, die 10-15 Wochen alt waren. Als weitere Ergänzung der dargestellten Untersuchungen wurde eine Versuchsreihe mit 6 Wochen alten Mäusen durchgeführt, um festzustellen, ob Unterschiede des Migrationsverhaltens gealterter neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit vom Alter des Organismus bestehen. Auch bei den jüngeren Mäusen zeigte sich unter LPS-Stimulation ein verändertes Migrationsprofil, sowohl hinsichtlich der absoluten Zahlen in den untersuchten Organen, als auch in Bezug auf die relative Verteilung waren die Ergebnisse mit den 10-15 Wochen alten Mäusen vergleichbar (Vgl. Abbildungen 18 und 19). [144]

Ergebnisse

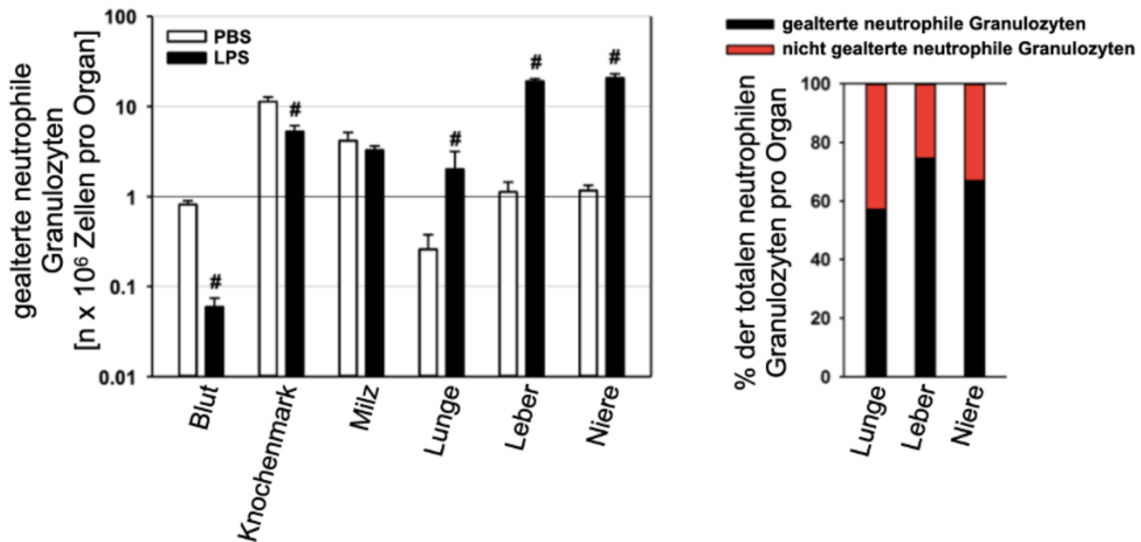


Abbildung 19. Graphische Darstellung der absoluten Anzahl gealterter neutrophiler Granulozyten in Blut, Knochenmark und relevanten homogenisierten Organen (links) sowie der relativen Anzahl gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten in ausgewählten Organen (rechts) von 6 Wochen alten WT-Tieren nach intraperitonealer Injektion von PBS oder LPS. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente ($n=4$; # = $p < 0.05$ vs PBS); (modifiziert nach [144])

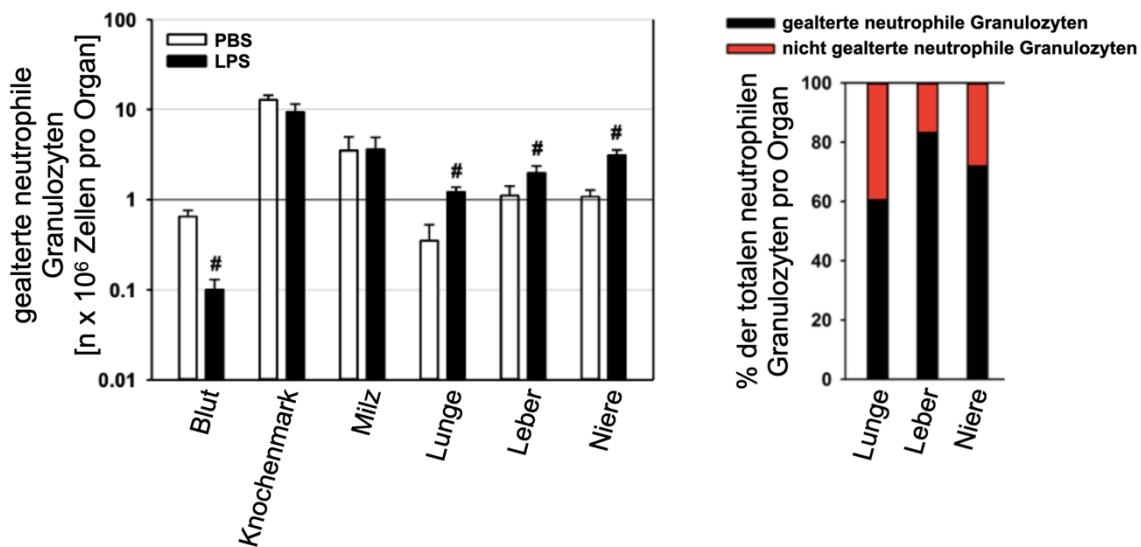


Abbildung 20. Graphische Darstellung der absoluten Anzahl gealterter neutrophiler Granulozyten in Blut, Knochenmark und relevanten homogenisierten Organen (links) sowie der relativen Anzahl gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten in ausgewählten Organen (rechts) von 10-15 Wochen alten WT-Tieren nach intraperitonealer Injektion von PBS oder 25 μ g LPS. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente ($n=3$; # = $p < 0.05$ vs PBS); (modifiziert nach [144])

Um die Rekrutierung gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten dynamisch zu analysieren und die einzelnen Schritte der Rekrutierungskaskade

Ergebnisse

zwischen den Subtypen zu vergleichen, wurden intravitalmikroskopische Aufnahmen angefertigt, nachdem neutrophile Granulozyten aus Wildtyp-Mäusen oder SELP-defizienten Mäusen isoliert und nach Fluoreszenzmarkierung in die Zirkulation der zu untersuchenden Wildtyp-Mäuse appliziert wurden. Unter kontinuierlicher LPS-Superfusion war hierbei zu beobachten, dass sich bei neutrophilen Granulozyten aus SELP-defizienten Mäusen, welche zu über 85% dem gealterten Phänotyp entsprachen, früher und in höherer Anzahl ein Rolling und eine Adhärenz an postkapillären Venolen sowie eine Transmigration durch das Endothel zeigten. Bei neutrophilen Granulozyten aus Wildtyp-Mäusen (mit etwa 20% Anteil vom gealterten Phänotyp) waren die genannten Rekrutierungsschritte im Vergleich dazu erst verzögert festzustellen (Vgl. Abbildungen 21 und 22). [144]

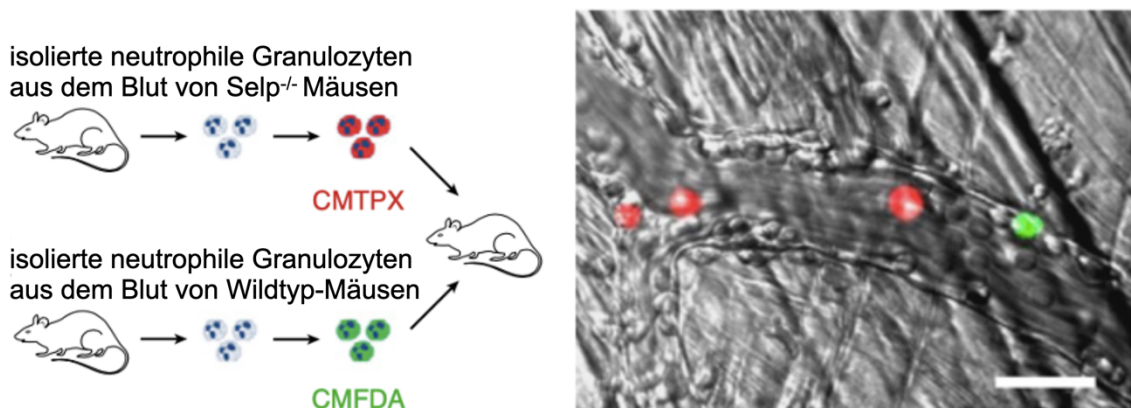


Abbildung 21. Schematische Darstellung der Zelltransfer-Untersuchungen zur intravitalmikroskopischen Analyse der Rekrutierungsschritte gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten aus Wildtyp-Mäusen (grün dargestellt) und P-Selektin/CD62P-defizienten ($SELP^{-/-}$) Mäusen (rot dargestellt). Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahme mit fluoreszenzmarkierten neutrophilen Granulozyten (Maßstabsbalken entspricht $20\mu\text{m}$); (modifiziert nach [144])

Ergebnisse

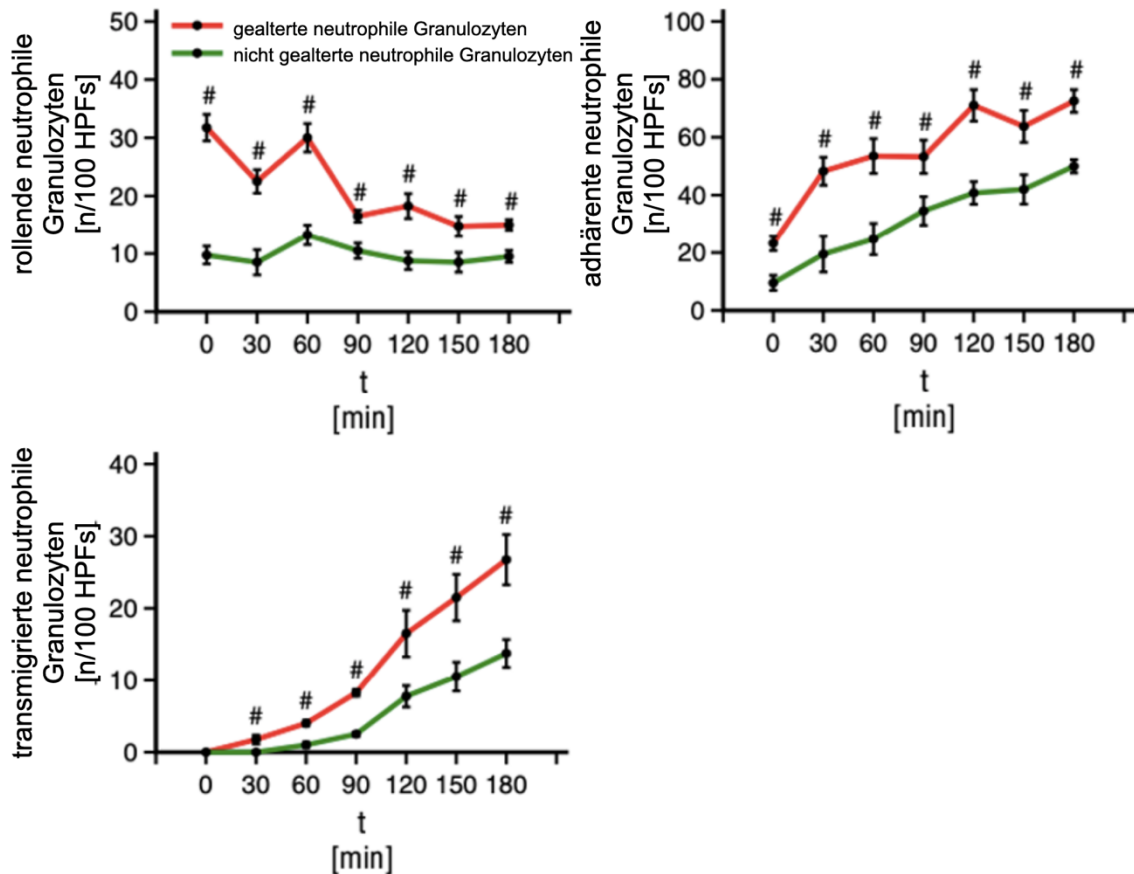


Abbildung 22. Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung der Anzahl von rollenden, adhärenen und transmigrierten gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten nach Zelltransfer und unter Superfusion mit einer 100 nM LPS-Lösung. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente ($n=4$; # = $p < 0.05$ vs nicht gealterte neutrophile Granulozyten; HPFs=high-power fields); (modifiziert nach [144])

1.2 Oberflächenexpression von relevanten Signal- und Adhäsionsmolekülen auf gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten exprimieren spezifische Signal- und Adhäsionsmoleküle auf ihrer Zelloberfläche, über welche sie zum Ort eines Entzündungsgeschehens rekrutiert werden können.

Um die zugrundeliegenden Mechanismen der Rekrutierung von gealterten neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe besser zu verstehen, wurde eine phänotypische Charakterisierung der Oberflächenexpression von relevanten Signal- und Adhäsionsmolekülen dieser Immunzellen vorgenommen (Vgl. Kapitel III 2.6.2).

Ergebnisse

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten auf gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten aus dem Blut unstimulierter Mäuse Gemeinsamkeiten und Unterschiede bezüglich der Expression verschiedener Signal- und Adhäsionsmoleküle nachgewiesen werden. [144]

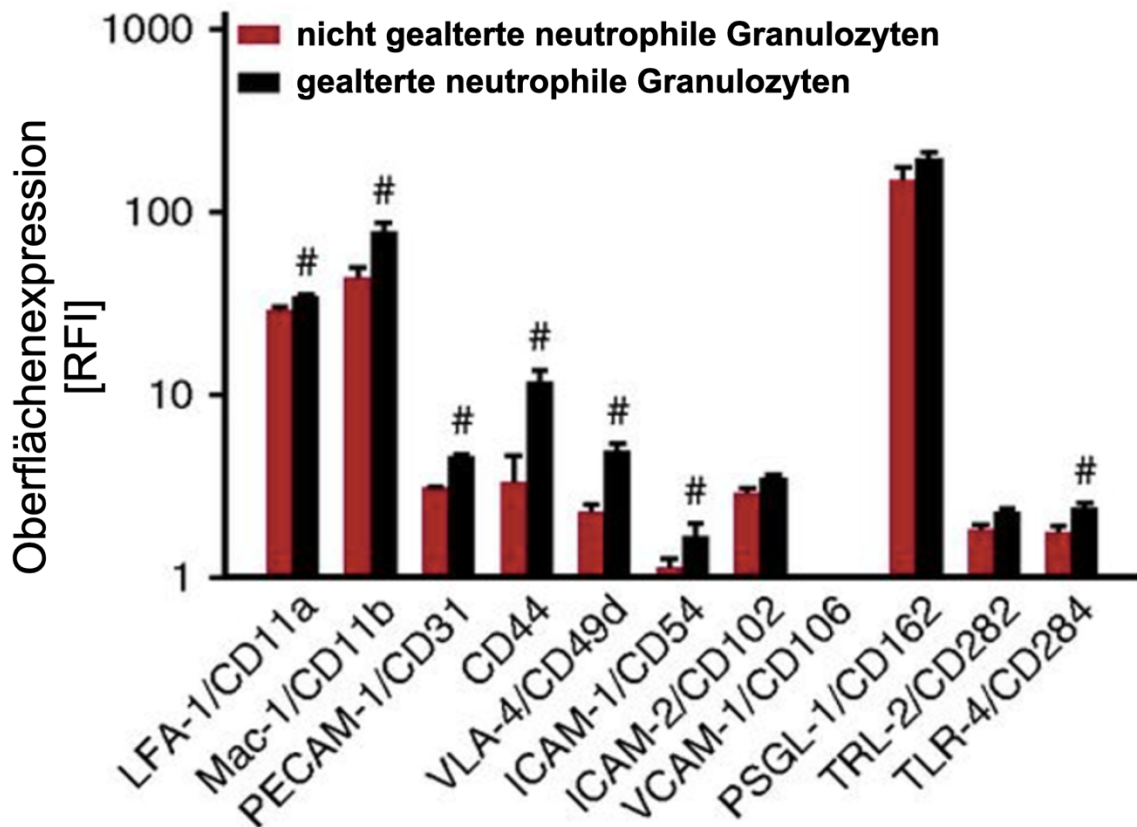


Abbildung 23. Graphische, logarithmische Darstellung der Oberflächenexpression von ausgesuchten Signal- und Adhäsionsmolekülen gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten im unstimulierten Blut von WT-Mäusen. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente ($n=5$; # = $p < 0.05$ vs. nicht gealterte neutrophile Granulozyten); (modifiziert nach [144])

Während sich die Expression von ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106, PSGL-1/CD162 und TLR-2/CD282 zwischen gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten nicht signifikant unterschied, war die Expression der Integrine LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b und VLA-4/CD49d, der Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie PECAM-1/CD31 und ICAM-1/CD54, des Glykoproteins CD44 und des LPS-Rezeptors TLR-4/CD284 auf neutrophilen Granulozyten signifikant höher exprimiert als auf nicht gealterten neutrophilen Granulozyten. [144]

Ergebnisse

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, inwiefern sich diese Expressionsprofile unter inflammatorischen Bedingungen verändern.

Hierbei zeigte sich, dass nach *In-Vitro*-Stimulation mit LPS, LTA oder HMGB1 vorwiegend die Expression des Integrins Mac-1/CD11b und des LPS-Rezeptors TLR-4/CD284 auf gealterten neutrophilen Granulozyten signifikant anstieg, wohingegen diese Effekte auf nicht gealterten neutrophilen Granulozyten vergleichsweise gering ausgeprägt waren (Vgl. Abbildungen 23 bis 28). [144]

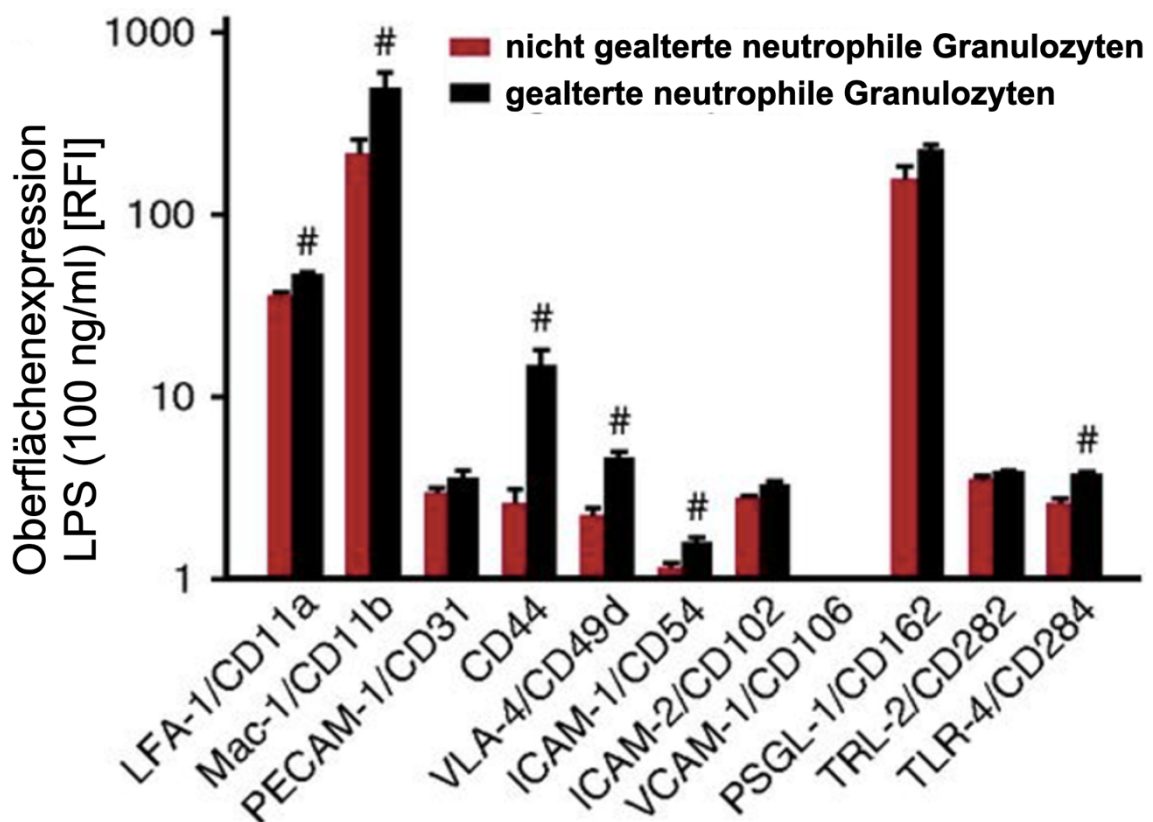


Abbildung 24. Graphische, logarithmische Darstellung der Oberflächenexpression von ausgesuchten Signal- und Adhäsionsmolekülen gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten aus dem Blut von WT-Mäusen nach *In-Vitro*-Stimulation mit LPS. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente ($n=5$; # = $p < 0.05$ vs. nicht gealterte neutrophile Granulozyten); (modifiziert nach [144])

Ergebnisse

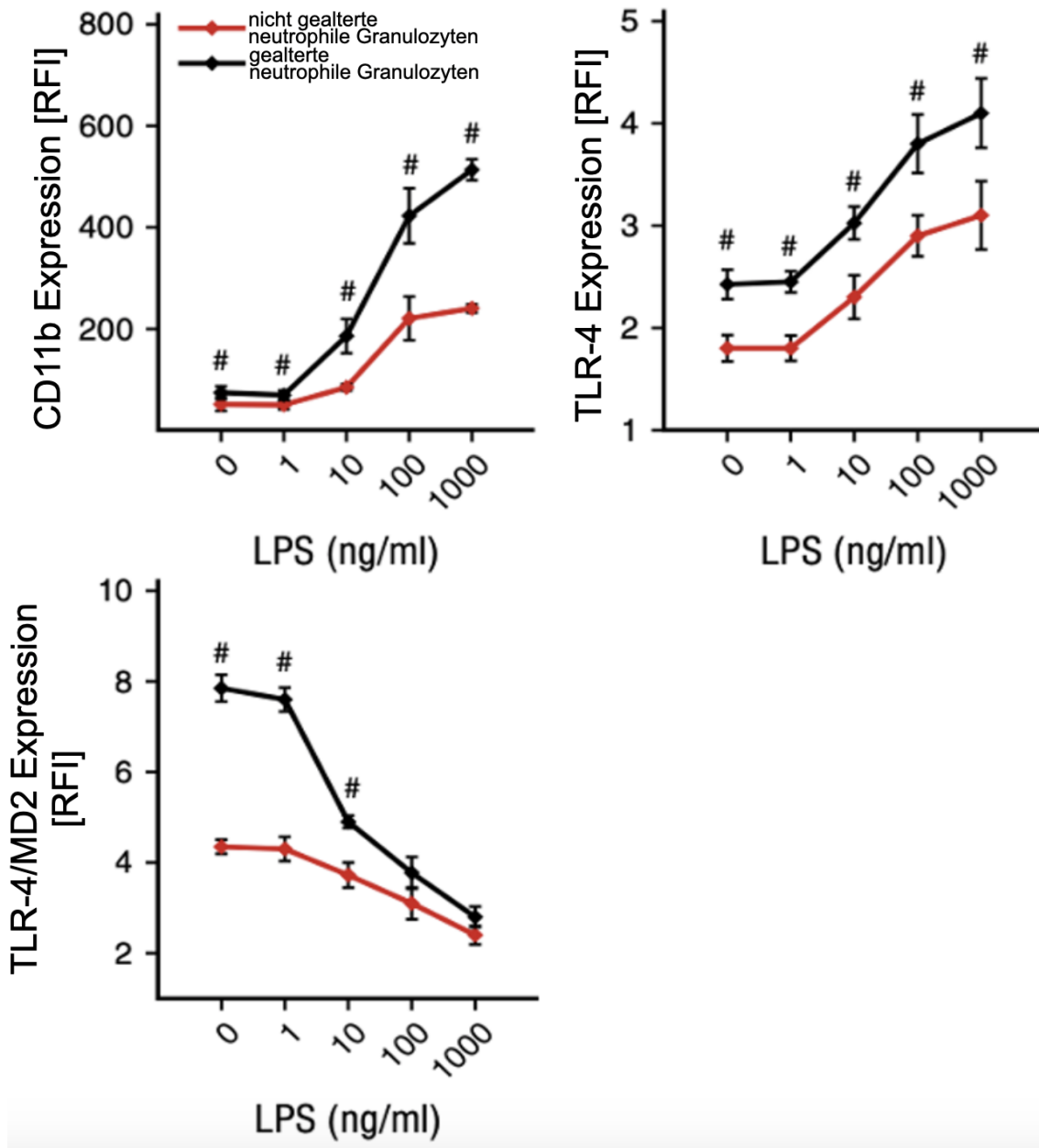


Abbildung 25. Graphische Darstellung der Oberflächenexpression von CD11b, TLR-4 sowie dem TLR-4/MD2-Komplex auf gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten aus dem Blut von WT-Mäusen nach Stimulation mit PBS oder LPS. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente (n=4-6; # = p<0.05 vs. nicht gealterte neutrophile Granulozyten); (modifiziert nach [144])

Zudem sollte untersucht werden, durch welche Prozesse die gesteigerte Expression von CD11b/Mac-1 auf neutrophilen Granulozyten des gealterten Subtyps vermittelt wurde. Nach Applikation des TLR-4 Inhibitors TAK-242 und sowie nach Inhibition von p38MAPK mittels SB203580 ließ sich eine signifikant geringere Steigerung der Mac-1/CD11b Expression unter inflammatorischer Stimulation darstellen. Die Inhibition von CXCR4, ERK 1/2 MAPK und JNK 1/2/3

Ergebnisse

MAPK resultierte dagegen in keinen signifikanten Unterschieden des gesteigerten Expressionsniveaus von Mac-1/CD11b (Vgl. Abbildung 26). [144]

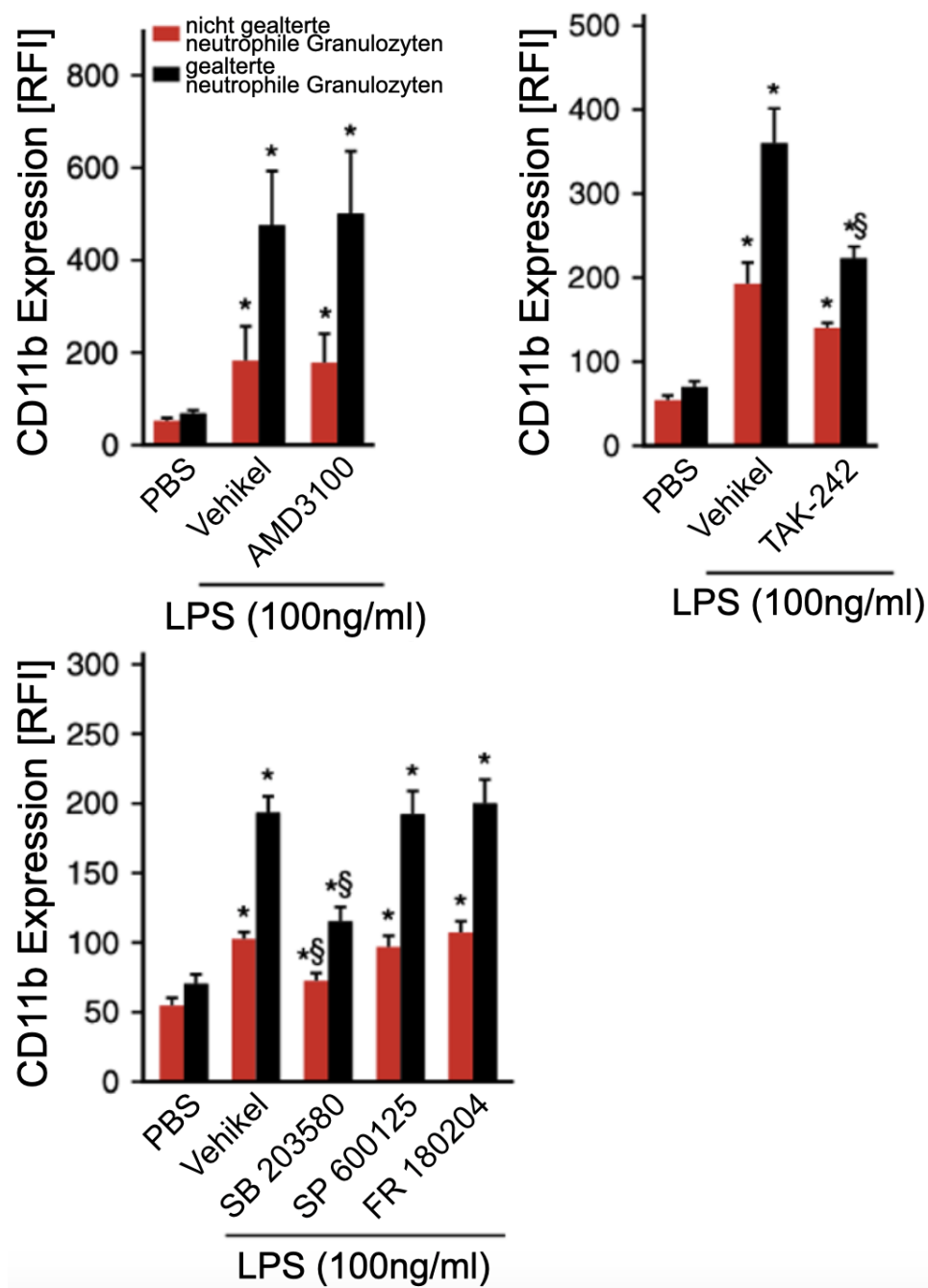


Abbildung 26. Graphische Darstellung der Oberflächenexpression von CD11b auf gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten aus dem Blut von WT-Mäusen nach Stimulation mit PBS oder LPS sowie systemischer Applikation von AMD3100 (CXCR4-Inhibitor), TAK-242 (TLR-4 Inhibitor) oder der MAPK Inhibitoren SB 203580 (p38 MAPK), SP 600125 (JNK 1/2/3 MAPK) oder FR 180204 (ERK 1/2 MAPK). Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente (n=4-6; * = $p < 0.05$ vs PBS; § = $p < 0.05$ vs Vehikel); (modifiziert nach [144])

Ergebnisse

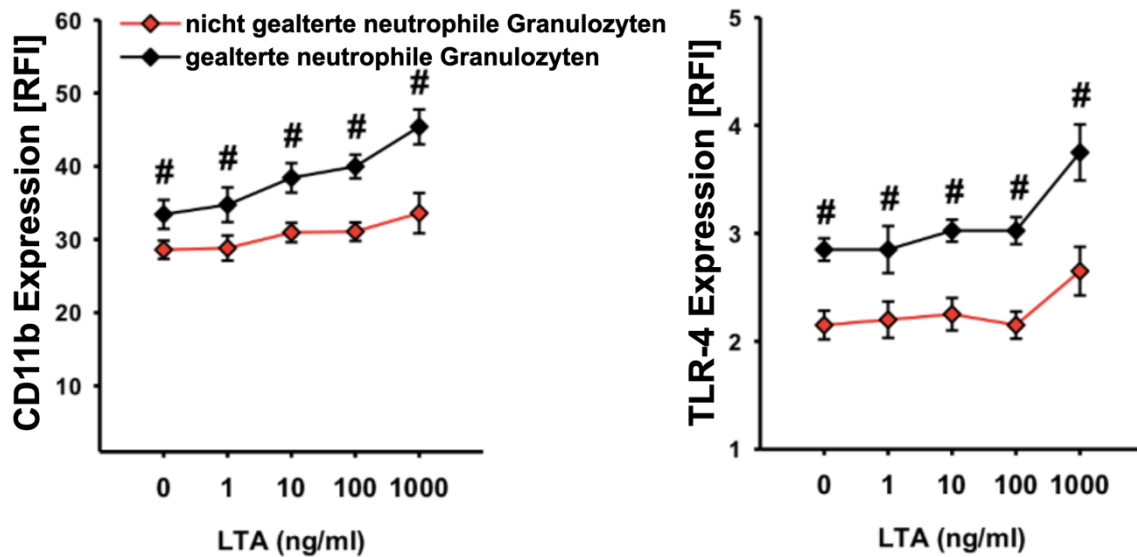


Abbildung 27. Graphische Darstellung der Oberflächenexpression von CD11b und TLR-4 auf gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten aus dem Blut von WT-Mäusen nach Stimulation mit PBS oder LTA. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente (n=4; # = p<0.05 vs. nicht gealterte neutrophile Granulozyten); (modifiziert nach [144])

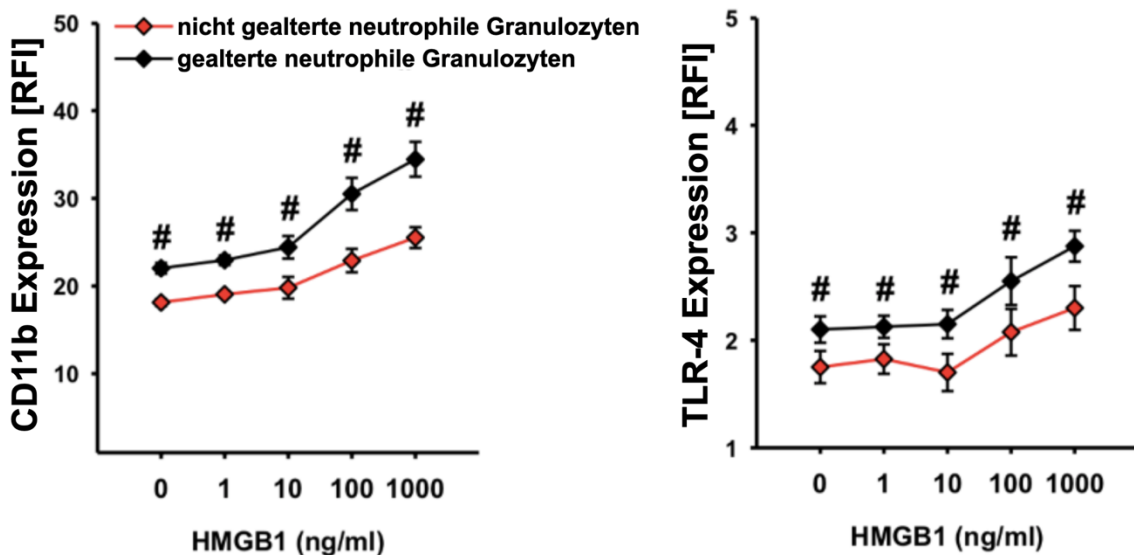


Abbildung 28. Graphische Darstellung der Oberflächenexpression von CD11b und TLR-4 auf gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten aus dem Blut von WT-Mäusen nach Stimulation mit PBS oder HMGB1. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente (n=4; # = p<0.05 vs. nicht gealterte neutrophile Granulozyten); (modifiziert nach [144])

1.3 Veränderungen der Affinität und der Konformation von relevanten Integrinen auf gealterten neutrophilen Granulozyten

Wie bereits eingangs erwähnt, können β 2-Integrine wie LFA-1/CD11a oder Mac-1/CD11b in verschiedenen Konformationen vorliegen, welche eine unterschiedliche Affinität für ihre Bindungspartner haben.

Die durch pro-inflammatorische Chemokine induzierte Aktivierung von Integrinen ist eine entscheidende Voraussetzung dafür, dass diese mit ihren endothelialen Liganden, z.B. ICAM-1/CD54 oder VCAM-1/CD106, Bindungen eingehen können. Diese Interaktionen wiederum sind grundlegender Bestandteil der leukozytären intravaskulären Adhärenz sowie der Transmigration in entzündetes Gewebe.

Deshalb sollte in weiteren Experimenten nach der quantitativen Analyse der Expression verschiedener Integrine auf gealterten neutrophilen Granulozyten untersucht werden, in welcher Konformation und damit in welchem Aktivitätszustand diese auf der Zelloberfläche vorliegen. [144]

Als Maß für die Gesamtaffinität der β 2-Integrine wurde, wie bereits unter Kapitel III 2.5.3 näher erläutert, das Bindungsverhalten von fluoreszenzmarkiertem ICAM-1/CD54 an gealterte und nicht gealterte neutrophile Granulozyten aus dem Blut von Wildtyp-Mäusen mittels Durchflusszytometrie analysiert. [144]

Ergebnisse

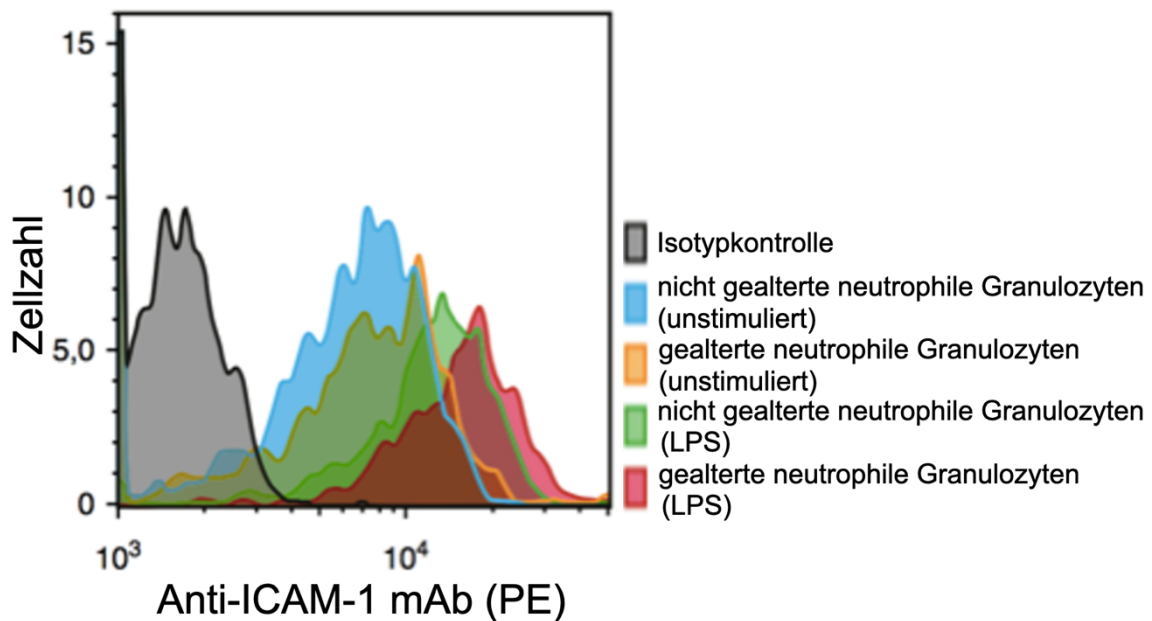


Abbildung 29. Repräsentatives Histogramm der durchflusszytometrischen Analyse des gebundenen β 2-Integrin-Liganden ICAM-1/CD54 an gealterte und nicht gealterte neutrophile Granulozyten aus dem Blut von WT-Mäusen unter unstimulierten Bedingungen oder nach LPS-Stimulation; (modifiziert nach [144])

Sowohl unter unstimulierten Bedingungen als auch nach Stimulation mit LPS, LTA und HMGB-1, banden die ICAM-1 Moleküle deutlich effektiver an die Oberfläche von gealterten neutrophilen Granulozyten als an nicht gealterte neutrophile Granulozyten. Die unter inflammatorischen Bedingungen festgestellte Steigerung der Gesamtaffinität der β 2-Integrine für deren fluoreszenzmarkierte Liganden zeigte sich unter Inhibition des LPS-Rezeptors TLR-4 sowie der MAP-Kinasen p38 MAPK und JNK 1/2/3 MAPK signifikant reduziert. Unter Gabe von ERK-MAP-Kinase-Inhibitoren konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden (Vgl. Abbildungen 29-31) Die inflammationsbedingte Erhöhung der Gesamtaffinität für ICAM-1-Moleküle war also abhängig von TLR-4 und der MAP-Kinasen p38 MAPK und JNK MAPK, jedoch nicht von der ERK-MAP-Kinase. [144]

Ergebnisse

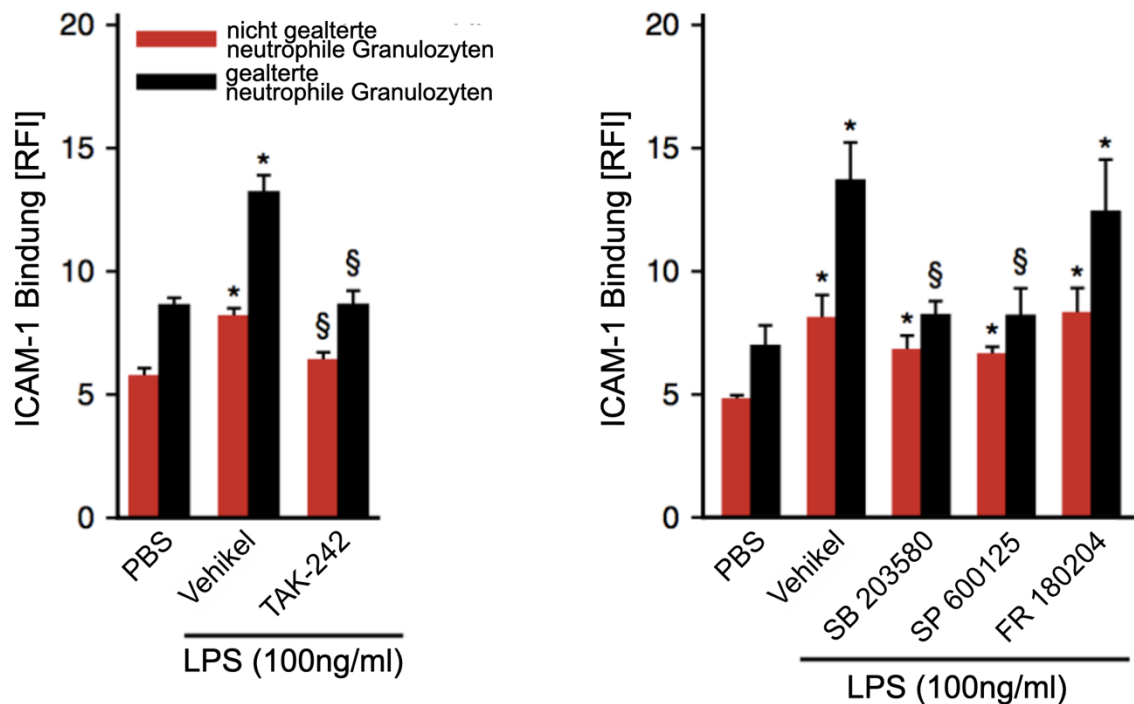


Abbildung 30. Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung des Bindungsverhaltens von ICAM-1/CD54 an gealterte und nicht gealterte Granulozyten aus dem Blut von WT-Mäusen nach Gabe von PBS oder Stimulation mit LPS sowie systemischer Applikation von TAK-242 (TLR-4 Inhibitor) oder der MAPK Inhibitoren SB 203580 (p38 MAPK), SP 600125 (JNK 1/2/3 MAPK) oder FR 180204 (ERK 1/2 MAPK). Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente (n=4-6; * = $p < 0.05$ vs PBS; § = $p < 0.05$ vs Vehikel); (modifiziert nach [144])

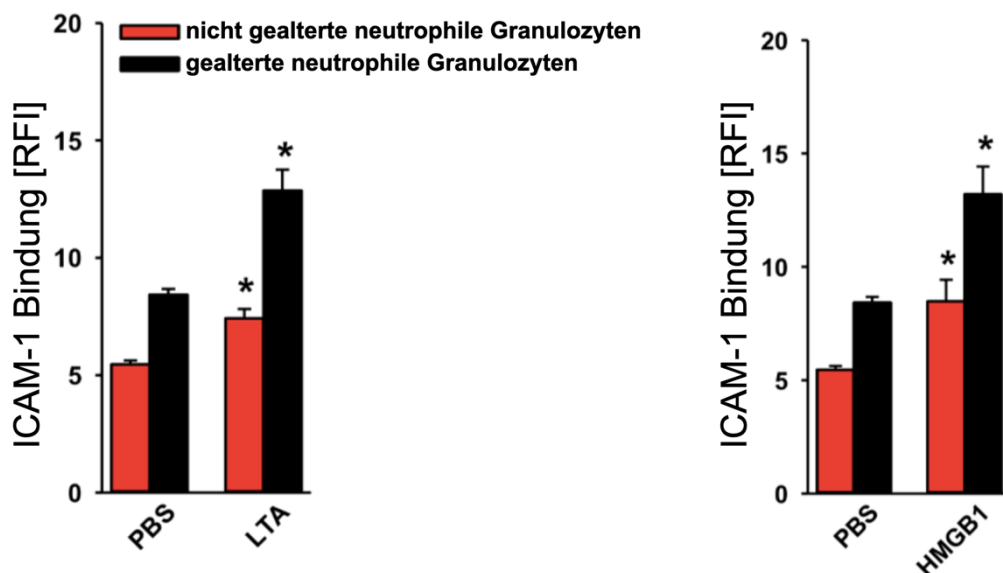


Abbildung 31. Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung des Bindungsverhaltens von ICAM-1/CD54 an gealterte und nicht gealterte Granulozyten aus dem Blut von WT-Mäusen nach Gabe von PBS oder Stimulation mit LTA oder

Ergebnisse

*HMGB1. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente (n=5; * = p<0.05 vs PBS); (modifiziert nach [144])*

Auch in humanem Blut ließen sich zwischen gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten Unterschiede hinsichtlich der Integrinaffinität nachweisen. Während sich für β 2-Integrine in mittel- und hochaffiner Konformation (Markierung über die Bindung des kim127-Antikörpers) keine Unterschiede im Vergleich zum Kontrollblut zeigten, banden nach Stimulation mit LPS signifikant mehr mAb 24-Antikörper (spezifisch für die hochaffine Konformation von β 2-Integrinen) an die Oberfläche der untersuchten Zellen. Dieser Anstieg der mAb 24-Bindungs Kapazität unter Gabe eines proinflammatorischen Stimulus war auf gealterten neutrophilen Granulozyten signifikant höher als auf nicht gealterten neutrophilen Granulozyten (Vgl. Abbildungen 32 und 33). [144]

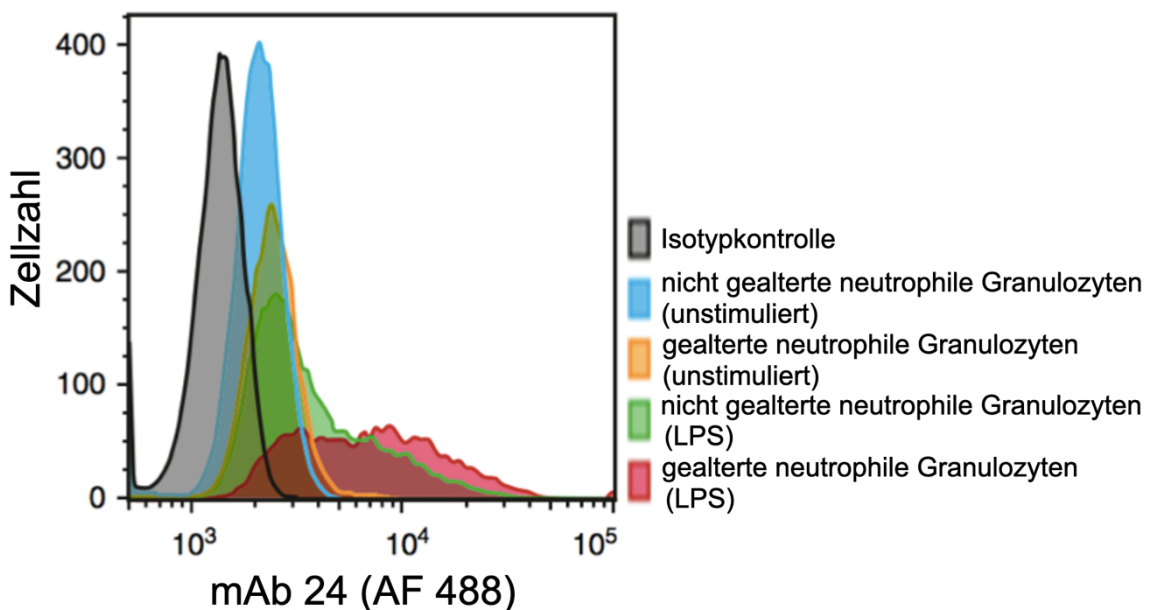


Abbildung 32. Repräsentatives Histogramm der durchflusszytometrischen Analyse des gebundenen mAb 24-Antikörpers (spezifisch für die hochaffine Konformation von β 2-Integrinen) an gealterte und nicht gealterte neutrophile Granulozyten aus humanem Blut von gesunden Spendern unter unstimulierten Bedingungen oder nach LPS-Stimulation; (modifiziert nach [144])

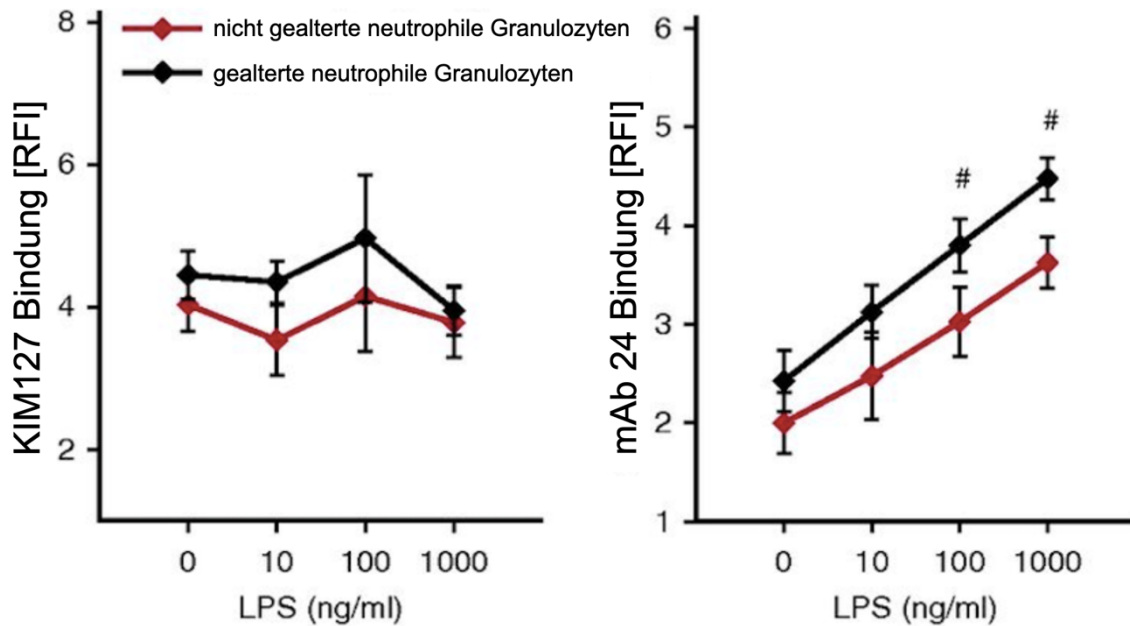


Abbildung 33. Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung des Bindungsverhaltens von kim127-Antikörpern (spezifisch für die intermediär- und hochaffine Konformation von β 2-Integrinen) und mAb 24-Antikörpern (spezifisch für die hochaffine Konformation von β 2-Integrinen) an gealterte und nicht gealterte Granulozyten aus humanem Blut von gesunden Probanden nach Gabe von PBS oder Stimulation mit LPS. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente ($n=4-6$; # = $p<0.05$ vs nicht gealterte neutrophile Granulozyten); (modifiziert nach [144])

1.4 Bedeutung der Moleküle Mac-1/CD11b, TLR-4, SDF1- α und CXCR4 für die Rekrutierung von gealterten neutrophilen Granulozyten bei experimenteller Sepsis

Nachdem auf gealterten neutrophilen Granulozyten ein verändertes Expressionsprofil im Vergleich zum nicht gealterten Subtyp nachgewiesen werden konnte, war es konsequent von Interesse, welche funktionelle Relevanz jene Moleküle besitzen, die auf gealterten neutrophilen Granulozyten signifikant höher exprimiert waren als auf nicht gealterten neutrophilen Granulozyten. [144] Wie bereits in Abschnitt IV 1.2. gezeigt, bewirkte eine LPS-Stimulation eine TLR-4-vermittelte, signifikante Erhöhung der Expression des Integrins Mac-1/CD11b auf gealterten neutrophilen Granulozyten. Deshalb wurde mit blockierenden Antikörpern und genetisch veränderten Mäusen die Bedeutung von Mac-

Ergebnisse

1/CD11b und TLR-4 für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten des gealterten Subtyps untersucht. [144]

Das unter Abschnitt IV 1.1. beschriebene Migrationsverhalten von gealterten neutrophilen Granulozyten hatte bei systemischer experimenteller Sepsis eine signifikante Verminderung der Anzahl dieser Leukozytensubpopulation in Blut und Knochenmark sowie eine signifikante Erhöhung in Leber, Niere und Lunge gezeigt. [144]

Sowohl nach Antikörper-vermittelter Blockade von Mac-1/CD11b, als auch in Mäusen mit durch Mutation inaktiviertem TLR-4-Gen war die Migration von gealterten neutrophilen Granulozyten in die genannten Organe beinahe aufgehoben. Auch in TLR-2-defizienten Mäusen und unter antikörpervermittelter Blockade des TLR-4-Rezeptors war eine signifikante Reduktion der inflammatorischen Effekte auf die Migration dieser gealterten neutrophilen Granulozyten zu verzeichnen (Vgl. Abbildung 34). [144]

Aus wissenschaftlichen Vorarbeiten ist bekannt, dass der Chemokinrezeptor CXCR4 auch LPS als Liganden binden kann. [168] Die pharmakologische Inhibition des im Zuge der Alterung auf neutrophilen Granulozyten verstärkt exprimierten CXCR4 und dessen Liganden SDF1- α zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Mäusen, die mit LPS und dem entsprechenden Vehikel behandelt worden waren (Vgl. Abbildung 34). [144]

Ergebnisse

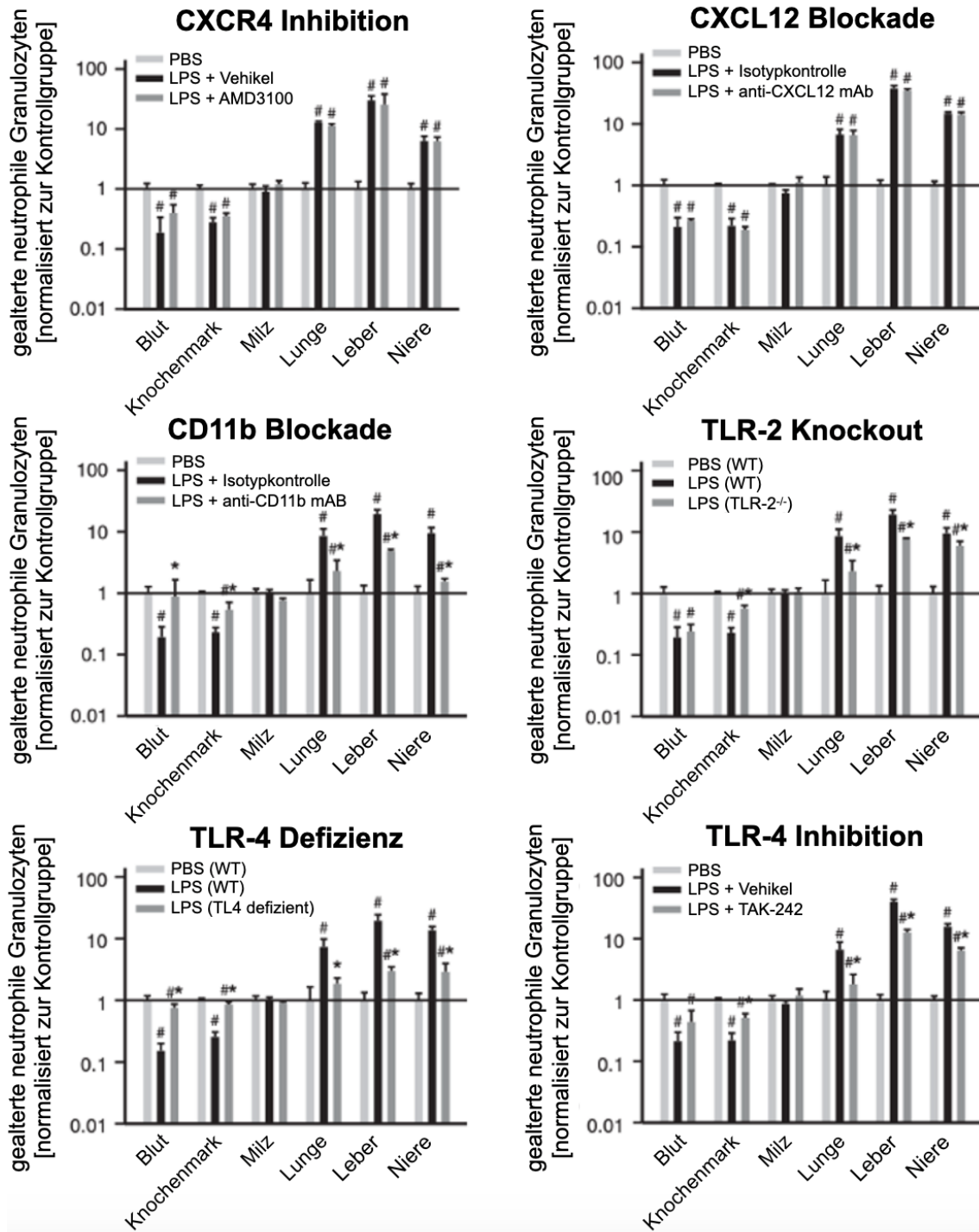


Abbildung 34. Graphische Darstellung der zur Kontrollgruppe normalisierten Anzahl gealterter neutrophiler Granulozyten in Blut, Knochenmark und relevanten homogenisierten Organen aus Wildtyp-Mäusen, TLR-2 Knockout Mäusen (TLR-2^{-/-}), TLR-4 defizienten Mäusen sowie aus Wildtyp-Mäusen mit systemischer Applikation von AMD3100 (CXCR4-Inhibitor), anti-CXCL12 mAb (blockierender monoklonaler anti-CXCL12-Antikörper), TAK-242 (TLR-4-Inhibitor) oder Vehikel/Isotyp-Antikörpern nach Stimulation mit PBS oder LPS. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente (n=4-6; # = p<0.05 vs PBS; * = p<0.05 vs Vehikel/isotyp/WT); (modifiziert nach [144])

1.5 Produktion von ROS und Zytokinen durch gealterte neutrophile Granulozyten

Wir erweiterten die funktionelle Charakterisierung gealterter neutrophiler Granulozyten in weiteren Experimenten durch die Analyse der intrazellulären Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) sowie der Synthese pro- und anti-inflammatorischer Zytokine.

Hierfür wurden Leukozyten aus dem Blut von Wildtyp-Mäusen isoliert und am Durchflusszytometer untersucht. Zwischen gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten waren sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch nach Stimulation mit LPS keine signifikanten Unterschiede in der mitochondrialen oder zytosolischen Produktion von ROS zu verzeichnen (Vgl. Abbildung 35).

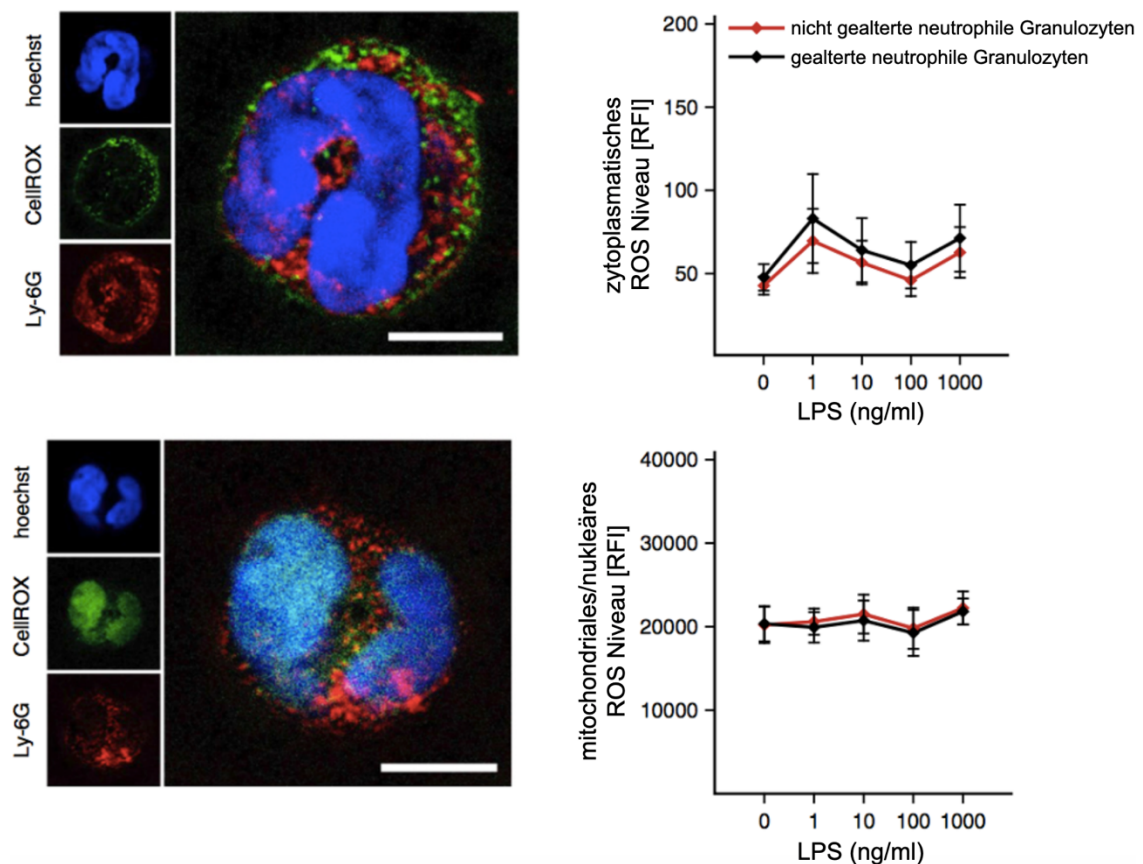


Abbildung 35. Repräsentative Bilder von mitochondrialen und zytosolischen ROS in gealterten neutrophilen Granulozyten mittels Indikatorfluoreszenzfarbstoffen und Konfokalmikroskopie (Maßstabsbalken entspricht 5 μ m). Quantitative Auswertung von ROS in Zytoplasma und Mitochondrien/Nukleus in unstimulierten und LPS-stimulierten gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente (n=4-6); (modifiziert nach [144])

Ergebnisse

Die beiden Subtypen zeigten auch hinsichtlich der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1a, IL-1b, IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF), Interferon (IFN)- γ) und anti-inflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-10, Interferon (IFN)- α) keine Unterschiede, wobei eine LPS-Stimulation einen signifikanten Anstieg der Produktion verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine durch beide Zellpopulationen bewirkte (Vgl. Abbildung 36). [144]

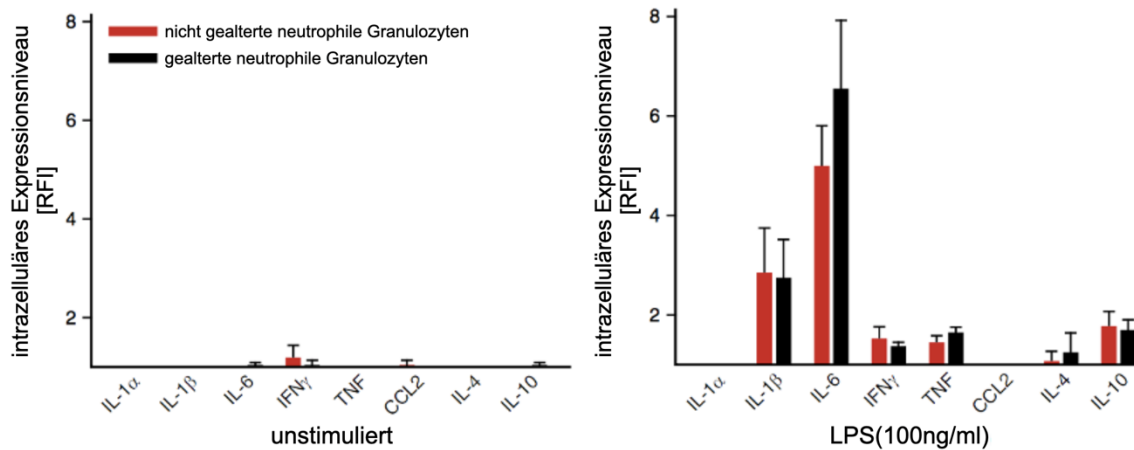


Abbildung 36. Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung der Zytokinproduktion gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten nach Inkubation mit PBS (links) oder LPS (rechts). Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente (n=4-6); (modifiziert nach [144])

1.6 Phagozytosepotential gealterter neutrophiler Granulozyten

Zur Analyse des Phagozytoseverhaltens gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten wurde per Durchflusszytometrie zunächst die *In-vitro*-Aufnahme von *E. coli*- und *S. aureus*-Partikeln in neutrophile Granulozyten untersucht. Die Immunzellen waren zuvor aus dem Blut von Wildtyp-Mäusen isoliert worden. [144]

In unstimuliertem Blut unterschied sich die Phagozytose der Biopartikel nicht signifikant zwischen gealterten und nicht gealterten Zellen. Nach Aktivierung der Zellen durch LPS oder LTA entwickelten gealterte neutrophile Granulozyten dagegen im Vergleich zum nicht gealterten Subtyp eine signifikant höhere Phagozytosekapazität (Vgl. Abbildungen 38, 40, 41). [144]

Ergebnisse

Dieses erhöhte Phagozytosepotential von gealterten neutrophilen Granulozyten zeigte sich nach Gabe von anti-Mac-1/CD11b blockierenden, monoklonalen Antikörpern sowie nach Gabe des *spleen tyrosine kinase inhibitors* BAY 61-3606 signifikant reduziert und war demzufolge entsprechend abhängig vom Phagozytose-Rezeptor Mac-1/CD11b und von Signalwegen der *Spleen-Tyrosine-Kinase* (SYK). Die Applikation des pharmakologischen CXCR4-Inhibitors AMD3100 zeigte wiederum keine Veränderung des Phagozytoseverhaltens (Vgl. Abbildungen 38 und 41). [144]

Übereinstimmend mit den Resultaten der *In-vitro*-Versuche fanden sich auch in Leber, Niere und Lunge von LPS-stimulierten Wildtyp-Tieren Unterschiede hinsichtlich der *E. coli*-Phagozytosekapazität der vorhandenen gealterten neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu nicht gealterten neutrophilen Granulozyten. Auch hier hatten Zellen des gealterten Subtyps signifikant mehr Biopartikel aufgenommen als nicht gealterte neutrophile Granulozyten. Die größte Steigerung der Biopartikelaufnahme fand sich in aus der Leber isolierten neutrophilen Granulozyten. In Blut und Milz zeigte sich dagegen bei generell etwas geringerem Phagozytosepotential kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Subpopulationen neutrophiler Granulozyten (Vgl. Abbildung 39). [144]

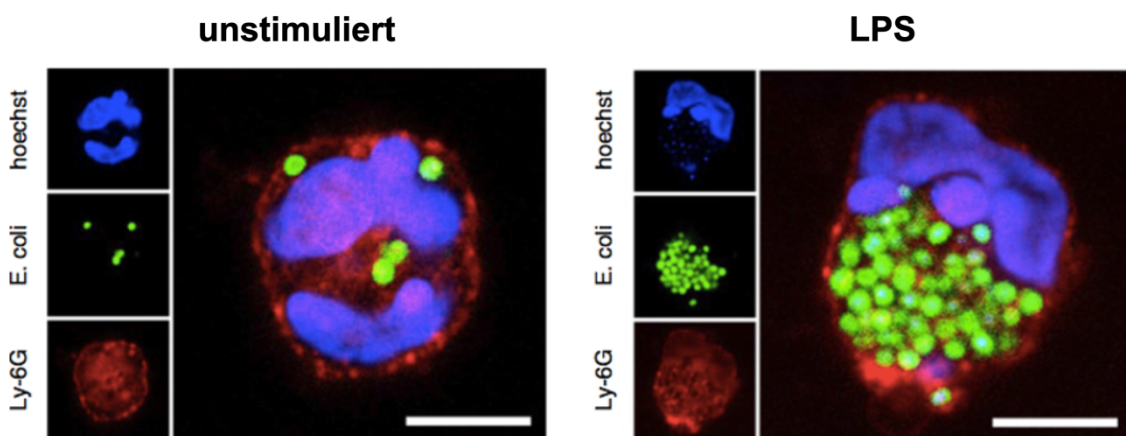


Abbildung 37. Repräsentative konfokalmikroskopische Bilder der phagozytierten *E. coli* Partikel durch unstimulierte und LPS-stimulierte neutrophile Granulozyten (Maßstabsbalken entspricht 5 μ m). Darstellung des Zellkerns (hoechst), der *E. coli* Partikel (pHrodo Green) und Ly-6G (Alexa Fluor 594); (modifiziert nach [144])

Ergebnisse

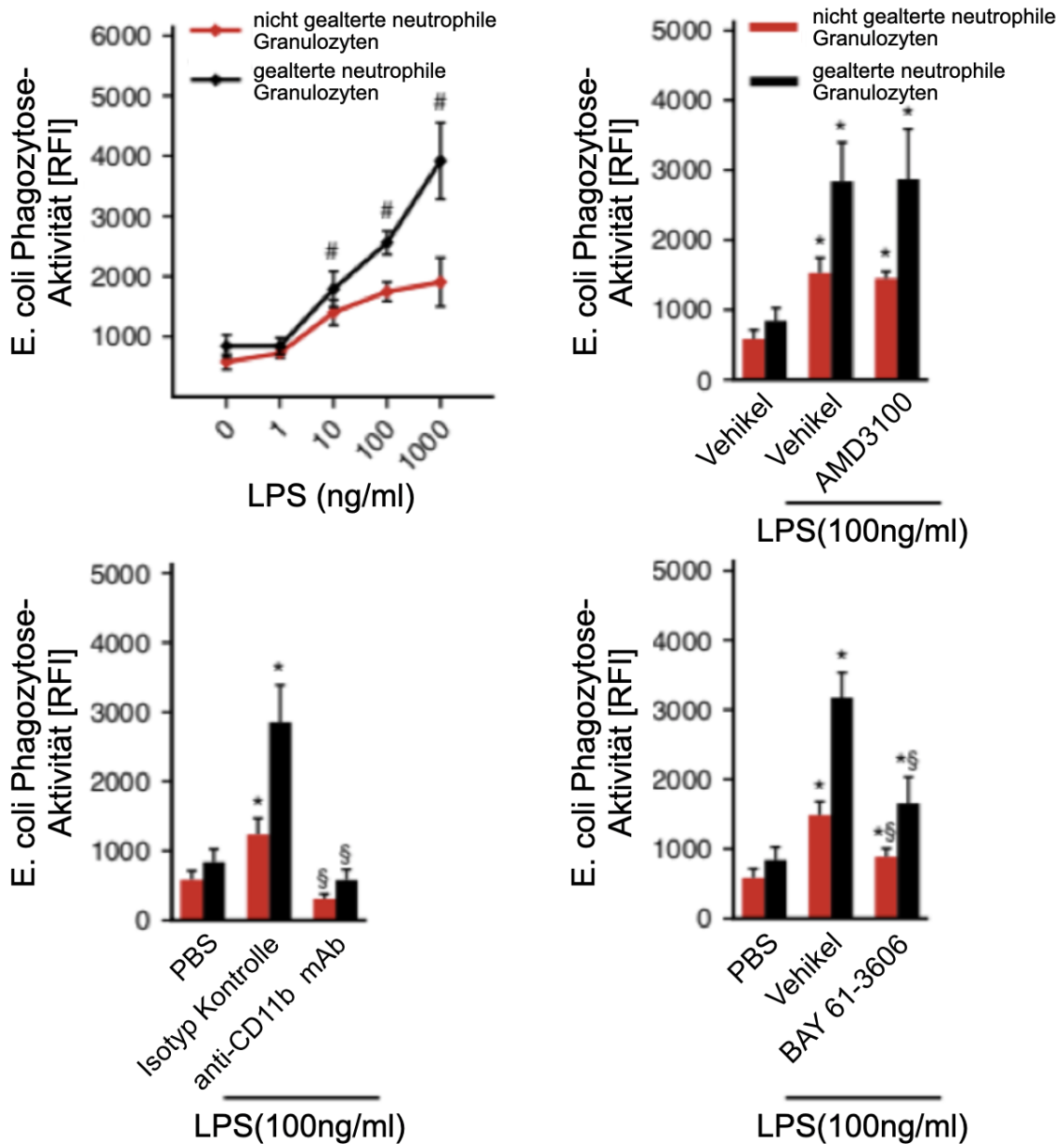


Abbildung 38. Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung des *E. coli*-Phagozytosepotentials von gealterten und nicht gealterten Granulozyten aus dem Blut von WT-Mäusen nach Gabe von PBS oder verschiedenen Konzentrationen von LPS, sowie dem pharmakologischen CXCR4-Inhibitor AMD3100, anti-Mac-1/CD11b blockierenden monoklonalen Antikörpern, dem spleen tyrosine kinase inhibitor BAY 61-3606, oder einem Vehikel/Isotyp-Kontrollantikörper. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente ($n=4$; # = $p<0.05$ vs nicht gealterte neutrophile Granulozyten; * = $p<0.05$ vs PBS; § = $p<0.05$ vs Vehikel/Isotyp-Kontrollantikörper); (modifiziert nach [144])

Ergebnisse

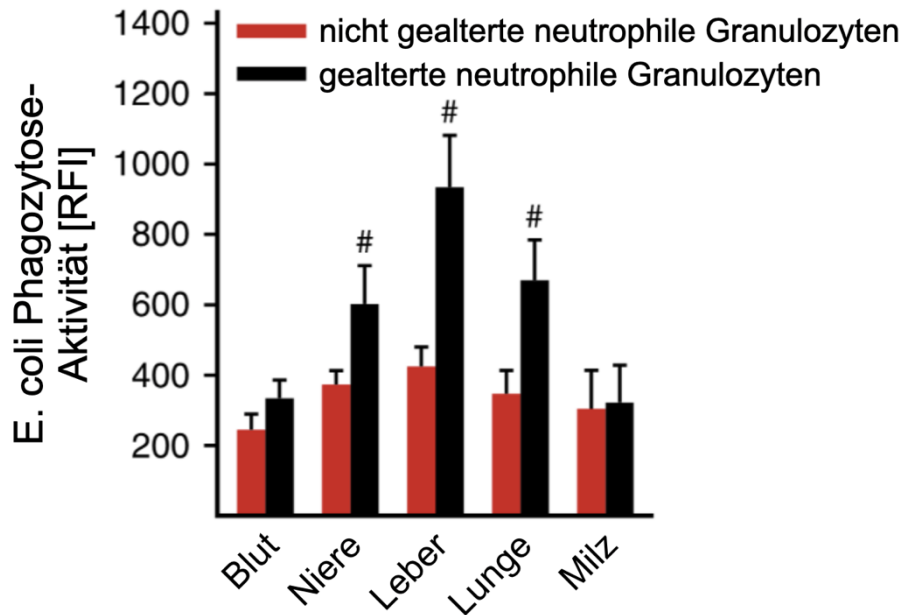


Abbildung 39. Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung des Phagozytosepotentials gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten aus dem Blut oder verschiedenen lysierten Organen von WT-Mäusen nach intraarterieller Applikation von *E. coli* Biopartikeln und intraperitonealer LPS-Injektion. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente ($n=5$; # = $p<0.05$ vs nicht gealterte neutrophile Granulozyten); (modifiziert nach [144])

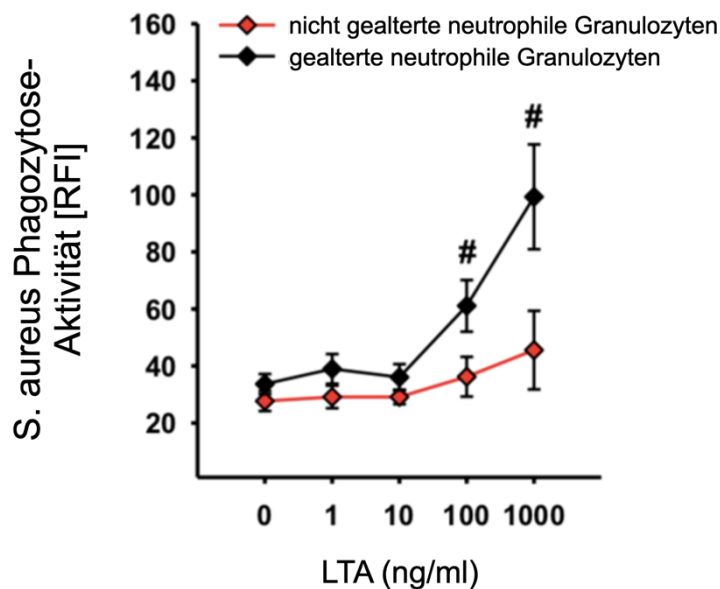


Abbildung 40. Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung des *S. aureus*-Phagozytosepotentials von gealterten und nicht gealterten Granulozyten aus dem Blut von WT-Mäusen nach Gabe von PBS oder verschiedenen Konzentrationen von LTA. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente ($n=4$; # = $p<0.05$ vs nicht gealterte neutrophile Granulozyten); (modifiziert nach [144])

Ergebnisse

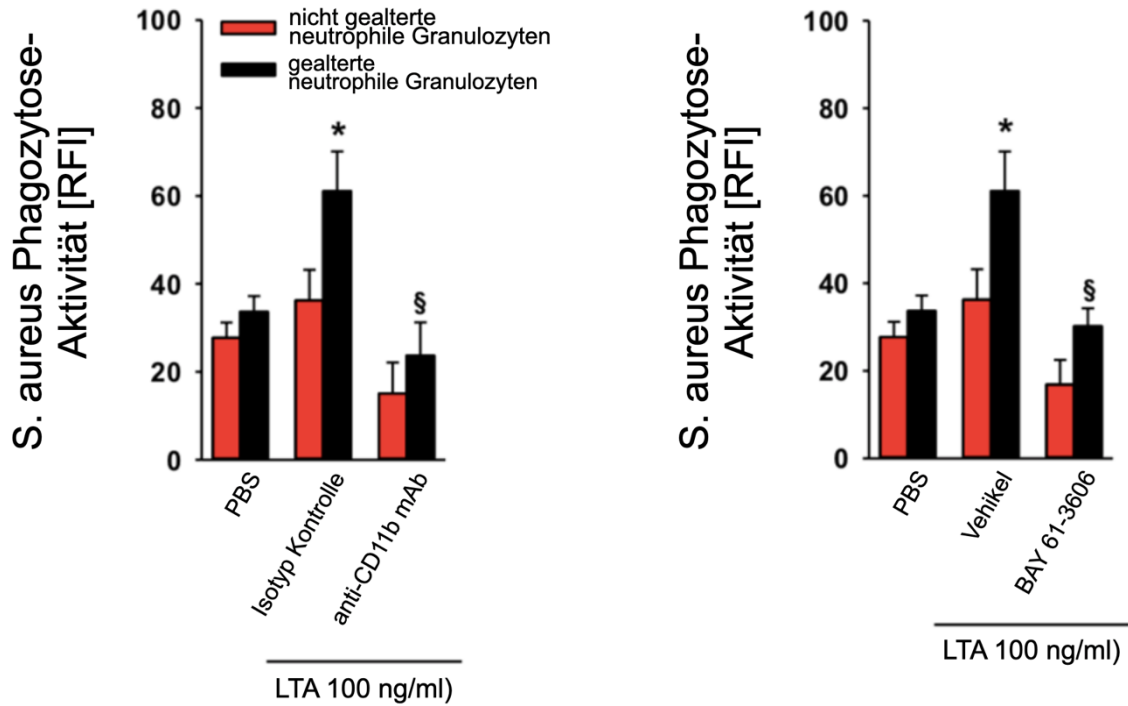


Abbildung 41. Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung des *S. aureus*-Phagozytosepotentials von gealterten und nicht gealterten Granulozyten aus dem Blut von WT-Mäusen nach Gabe von PBS oder 100 ng/ml LTA, sowie anti-Mac-1/CD11b blockierenden monoklonalen Antikörpern, dem Spleen tyrosine kinase Inhibitor BAY 61-3606, oder einem Vehikel/Isotyp-Kontrollantikörper. Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente ($n=4$; * = $p<0.05$ vs PBS; § = $p<0.05$ vs Vehikel/ Isotyp-Kontrollantikörper); (modifiziert nach [144])

V Diskussion

Neutrophile Granulozyten werden bei Infektionen als erste Leukozytensubpopulation aus der Blutzirkulation zum Ort der Schädigung im paravaskulären Gewebe rekrutiert und besitzen ein breites Repertoire an Mechanismen zur Abwehr und Eliminierung eingedrungener Erreger. [26, 27, 89] Sie sind damit für die initiale Entzündungsreaktion der angeborenen Immunität von zentraler Bedeutung. [26, 27, 89] Auch aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer wurde lange angenommen, dass neutrophile Granulozyten eine homogene Zellpopulation darstellen. [94, 169] Zunehmend finden sich jedoch Hinweise für die Existenz verschiedener Subpopulationen und Phänotypen neutrophiler Granulozyten. Diese unterscheiden sich in ihren Eigenschaften und Funktionen bei verschiedenen Prozessen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, beispielsweise in der akuten Entzündungsreaktion, bei Autoimmunerkrankungen oder bei der Angiogenese. [123, 132, 170-172] Reife neutrophile Granulozyten durchlaufen nach der Leukopoese und Freisetzung aus dem Knochenmark im Blutkreislauf einen biologischen Alterungsprozess, welcher zur Ausbildung des Phänotyps der sogenannten gealterten neutrophilen Granulozyten führt. Unter anderem durch den Kontakt zum Mikrobiom und dessen Sekretionsprodukten verändern sich die funktionellen Eigenschaften dieser Immunzellen und damit einhergehend die Expression verschiedener funktionell relevanter Oberflächenmoleküle. [99] So ist dieser Alterungsprozess beispielsweise mit einer vermehrten Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 assoziiert, wodurch gealterte neutrophile Granulozyten am Ende ihres Lebenszyklus in der Blutzirkulation über die Interaktion mit dem Chemokin CXCL12 in Knochenmark, Leber und Milz rekrutiert und dort abgebaut werden. Diese Prozesse bewirken unter homöostatischen Bedingungen eine negative Feedback-Regulierung der Produktion neuer Granulozyten und eine rhythmische Modulation des Pools an hämatopoetischen Stammzellen. [93, 102, 173] Die Relevanz der Alterung von neutrophilen Granulozyten für akute inflammatorische Prozesse war bisher jedoch nur unzureichend verstanden.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Bedeutung von gealterten neutrophilen Granulozyten für den akuten Entzündungsprozess näher charakterisiert werden. Hierfür wurde zunächst das Migrationsverhalten von gealterten neutrophilen Granulozyten in der akuten Entzündungsreaktion untersucht, indem die relative Verteilung von neutrophilen Granulozyten des gealterten sowie des nicht gealterten Phänotyps in verschiedenen Organen bei experimenteller Sepsis analysiert und verglichen wurde. Mittels intravitalmikroskopischer Versuche konnten anschließend die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung in postkapillären Venolen nach lokaler Entzündungsinduktion im Detail untersucht werden. Um ein umfassenderes Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen zu erlangen, wurden ergänzend phänotypische und funktionelle Eigenschaften dieser gealterten neutrophilen Granulozyten bestimmt. Hierfür erfolgten Analysen des Expressionsprofils von relevanten Signal- und Adhäsionsmolekülen auf gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten vergleichend unter homöostatischen und entzündlichen Bedingungen. Anschließend wurde untersucht, welche funktionelle Relevanz jene Signal- und Adhäsionsmoleküle für die unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften von gealterten neutrophilen Granulozyten in der akuten Entzündungsreaktion besitzen, die auf diesem Immunzellsubtyp vermehrt exprimiert werden. Zuletzt wurde das Phagozytosepotential von gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten differentiell analysiert und deren Fähigkeit zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies sowie von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen als essentielle funktionelle Parameter für die Abwehr von Pathogenen ausgewertet.

1. Diskussion der angewandten Methoden

Wie eingangs beschrieben, stellt die Rekrutierung von Leukozyten aus der Mikrozirkulation in das umliegende paravaskuläre Gewebe einen vielschichtigen, hoch regulierten Vorgang dar. [89, 110, 174, 175] Die Grundlage dieser Prozesse bildet das Zusammenspiel von Blutplättchen, Leukozyten und verschiedenen Bestandteilen der Gefäßwand, unter anderem von Endothelzellen, der

Diskussion

Basallamina oder Perizyten sowie weiteren Elementen des perivaskulären Gewebes und der zirkulierenden Blutbestandteile. [89, 110, 174, 175] Die Signalwege dieses komplexen Zusammenwirkens stehen zudem unter dem Einfluss multipler weiterer Faktoren, wie z. B. der Freisetzung von Zytokinen oder Chemokinen, aber auch Sauerstoff- bzw. Stickstoffradikalen oder Proteasen im Gewebe. [89, 110, 174, 175] Gleichzeitig unterliegen die Interaktionen von Leukozyten und Thrombozyten mit Endothelzellen sowie der Aufbau der endothelialen Glykokalix dem Einfluss verschiedener Kreislaufparameter wie der Viskosität des Blutes, der Scherrate oder dem Blutdruck. [176-179] Insgesamt verdeutlichen diese geschilderten Aspekte zu den ablaufenden Prozessen deren Abhängigkeit von einem intakten Gesamtorganismus und somit die Notwendigkeit von *In-vivo*-Experimenten zur suffizienten Untersuchung der vorliegenden Fragestellungen.

Um die Fragestellung somit im Kontext des Gesamtorganismus zu untersuchen, erfolgten die vorliegenden Studien unter anderem am Mausmodell. Die Maus ist ein genetisch umfassend charakterisiertes Versuchstier, für welches eine Vielfalt an Reagenzien und genetisch veränderten Tierlinien verfügbar ist. C57BL/6-Mäuse weisen ein hohes Maß an Uniformität bezüglich ihres Phänotyps und ihrer Reaktion auf experimentelle Maßnahmen auf. Sie stellen den am häufigsten untersuchten Mausstamm in der experimentellen Forschung dar. [180] Aufgrund der dargestellten Eigenschaften und der zu erwartenden hohen Vergleichbarkeit unserer Messungen mit denen anderer Versuchsgruppen, wurden C57BL/6 Mäuse für einen Großteil unserer Experimente verwendet. In ausgewählten Experimenten kamen Tlr2-Knockout Mäuse [136], Tlr4-defiziente Mäuse [137, 138] und P-Selektin/CD62P-defiziente Mäuse [139] auf dem C57BL/6-Hintergrund zum Einsatz, um die Relevanz dieser Signal- und Adhäsionsmoleküle für die Rekrutierung gealterter neutrophiler Granulozyten in den angewandten Modellen zu überprüfen.

Ein grundlegender Aspekt der experimentellen Forschung ist die Translation der gewonnenen Erkenntnisse auf das Krankheitsbild im menschlichen Organismus. In diesem Kontext sind daher Differenzen zwischen der Methodik tierexperimenteller Arbeiten (in diesem Fall des Mausmodells) und der Eigenschaften der Sepsis im Menschen zu beachten. Die Erkenntnisse aus der

Diskussion

Stimulation mit LPS, LTA oder HMGB-1 im Mausmodell lassen sich entsprechend nicht notwendigerweise auf die Verhältnisse der Sepsis beim Menschen übertragen. So besteht beispielsweise in der Gesamtheit der menschlichen Sepsis-Patienten eine genetische Diversität, während in der experimentellen Forschung aufgrund multipler Vorteile dieser Methodik vor allem genetisch homogene Tiere verwendet werden. Darüber hinaus können auch altersspezifische Unterschiede oder das Vorliegen von Begleit- oder Grunderkrankungen relevante Aspekte darstellen, welche in der experimentellen Untersuchung akuter Entzündungsreaktionen wie der Sepsis von Interesse sind. In diesem Kontext ist zu erwähnen, dass in der vorliegenden Arbeit Versuchsreihen an Mäusen unterschiedlichen Alters durchgeführt wurden. Interessanterweise zeigte sich hierbei, dass das Migrationsverhalten gealterter neutrophiler Granulozyten bei experimenteller Sepsis für Mäuse im Alter von ungefähr 6 Wochen mit dem von Mäusen im Alter von 10 bis 15 Wochen vergleichbar war. [144]

1.1 Intravitalmikroskopie des *M. cremasters*

Zur Visualisierung des mikrovaskulären Gewebes und Analyse der Interaktionen neutrophiler Granulozyten mit dem Gefäßendothel wurden intravitalmikroskopische Untersuchungen am *M. cremaster* von Versuchstieren durchgeführt. Das gewählte Verfahren ist ein in der immunologischen Forschung weit verbreitetes Modell zur Darstellung und Untersuchung der Mikrozirkulation *in vivo*. Innerhalb der Arbeitsgruppe bestand durch diverse Vorarbeiten bereits eine entsprechende Expertise in der Anwendung des Modells. [106, 107, 115, 181-183] Wie bereits im Kapitel *Material und Methoden* dargestellt, kam ein nach *Baez et al* modifizierter Versuchsaufbau zur Anwendung. [140]

Die Vorteile der gewählten Methode liegen in der ausgeprägten Vaskularisierung des *M. cremaster* bei gleichzeitig nahezu zweidimensionaler Architektur des Gefäßsystems. Nach Einleitung einer adäquaten Narkose und sorgfältiger Präparation bietet sich so die Möglichkeit, am lebenden Tier hochqualitative Beobachtungen zu leukozytären Rekrutierungsprozessen in Echtzeit vorzunehmen. Nach systemischer Applikation von Antikörpern lassen sich mit

Diskussion

Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie auch ausgewählte Leukozytensubtypen differenziert darstellen. Zur Induktion inflammatorischer Prozesse können Entzündungsmediatoren (z.B. LPS) aufgrund der guten Zugangsmöglichkeit des Scrotums weitestgehend atraumatisch und komplikationsarm intraskrotal appliziert werden.

Aus anatomischen Gesichtspunkten ist die Anwendung des Modells jedoch auf männliche Versuchstiere limitiert. Hinsichtlich dieses geschlechtsspezifischen Versuchsaufbaus sollte zukünftig zur Erweiterung des Verständnisses in anderen Modellen mit weiblichen Tieren überprüft werden, welche Bedeutung die in männlichen Tieren charakterisierten Mechanismen der Entzündungsreaktion für weibliche Tiere besitzen. Entsprechend aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse bestehen zudem gewisse gewebe- und organspezifische Unterschiede in der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. [184, 185] Es bedarf daher Untersuchungen mit weiteren Methoden und Modellen, um zu bestätigen, ob die beobachteten Prozesse auch in anderen Organen gleichermaßen ablaufen.

Ergänzend zu erwähnen ist, dass die Präparation der Strukturen des Kremastermuskels trotz aller Sorgfalt zwangsläufig zu einem gewissen Grad an Gewebstraumatisierung mit entsprechender entzündlicher Aktivierung der untersuchten Strukturen führt, weswegen entsprechende Kontrollexperimente durchgeführt werden müssen. [186]

Aufgrund der genannten Vorteile stellt die Mikroskopie des *M. cremaster* dennoch bei sorgfältiger und zügiger Präparationstechnik sowie der Aufrechterhaltung einer stabilen Mikrozirkulation (unter anderem durch die kontinuierliche Superfusion mit warmer gepufferter Lösung und Wärmeerhalt des Versuchstiers) eine sehr gut geeignete Methode zur Untersuchung entsprechender immunologischer Fragestellungen dar.

1.2 Phänotypische und funktionelle Differenzierung gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten

In der vorliegenden Arbeit wurden neutrophile Granulozyten hinsichtlich ihres Alterungsstatus differenziert und Oberflächenexpressionsprofile von funktionell

Diskussion

relevanten Signal- und Adhäsionsmolekülen erstellt. Die phänotypische Charakterisierung der Zellen erfolgte überwiegend durch eine immunzytochemische Fluoreszenzmarkierung dieser Moleküle in Kombination mit einer *Ex-vivo*-Analyse mittels Durchflusszytometrie.

Die optische Untersuchung fluoreszenzmarkierter Zellen am Durchflusszytometer stellt ein etabliertes Verfahren zur phänotypischen Differenzierung von Leukozyten dar. Die Etablierung neuer, spezifischer Antikörper schuf dabei die Grundlage für aktuelle Fortschritte unter anderem in der Charakterisierung neutrophiler Granulozyten. So basiert das zunehmende Wissen hinsichtlich der Plastizität und Heterogenität neutrophiler Granulozyten unter anderem auf durchflusszytometrischen Methoden. [132]

Im Verlauf der Granulopoese befinden sich die Vorläuferzellen neutrophiler Granulozyten im Knochenmark ab einem gewissen Zeitpunkt im postmitotischen Stadium. Die Markierung mit dem fluoreszenzmarkierten Thymidin-Analogen BrdU erlaubte eine Differenzierung neutrophiler Granulozyten hinsichtlich ihres relativen Alters im Blut, bzw. in den Organen der Maus, da das markierte DNA-Substrat nur in entsprechend relativ „jüngeren“ Zellen vorhanden war, die BrdU zum Zeitpunkt der Applikation noch in ihre DNA integrierten konnten. BrdU ist ein seit langem etablierter Marker zur Detektion mitotischer Zellen, wie z.B. neuronaler oder hämatopoetischer Stammzellen oder in der Analyse der Zellproliferation. [187-190] Zur Untersuchung der altersabhängigen Heterogenität neutrophiler Granulozyten fand die metabolische Markierung mit BrdU erstmals durch Hidalgo und Kollegen Anwendung. [102] Dem vorbeschriebenen Vorgehen wurde bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen entsprochen.

Da neutrophile Granulozyten im Verlauf der Alterungsprozesse vermehrt CXCR4 auf ihrer Oberfläche exprimieren, ließ sich der Alterungsstatus der untersuchten Zellen orientierend auch anhand der CXCR4-Expression bestimmen. [99, 102] Sowohl während der Homöostase als auch unter inflammatorischen Bedingungen bestätigte sich der mittels BrdU bestimmte Alterungszustand anhand einer erhöhten CXCR4-Expression (Vgl. Abbildung 17).

In der vorliegenden Arbeit wurden relevante Signal- und Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche markiert und somit Expressionsprofile gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten unter homöostatischen Bedingungen und im

Diskussion

Kontext der Inflammation erstellt und miteinander verglichen. Mithilfe konformationsspezifischer Antikörper konnte zudem bestimmt werden, in welcher Konformation die für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten essentiellen beta2-Integrine auf der leukozytären Oberfläche vorlagen und welche Affinität sie demzufolge für ihre Bindungspartner auf dem Gefäßendothel besaßen.

Die Markierung intrazellulärer Strukturen ermöglichte eine zusätzliche Analyse funktioneller Eigenschaften der einzelnen Zellgruppen. Anhand dieser Vorgehensweise konnte das Phagozytosepotential sowie die Produktion von ROS und pro-inflammatorischen Zytokinen visualisiert und ausgewertet werden.

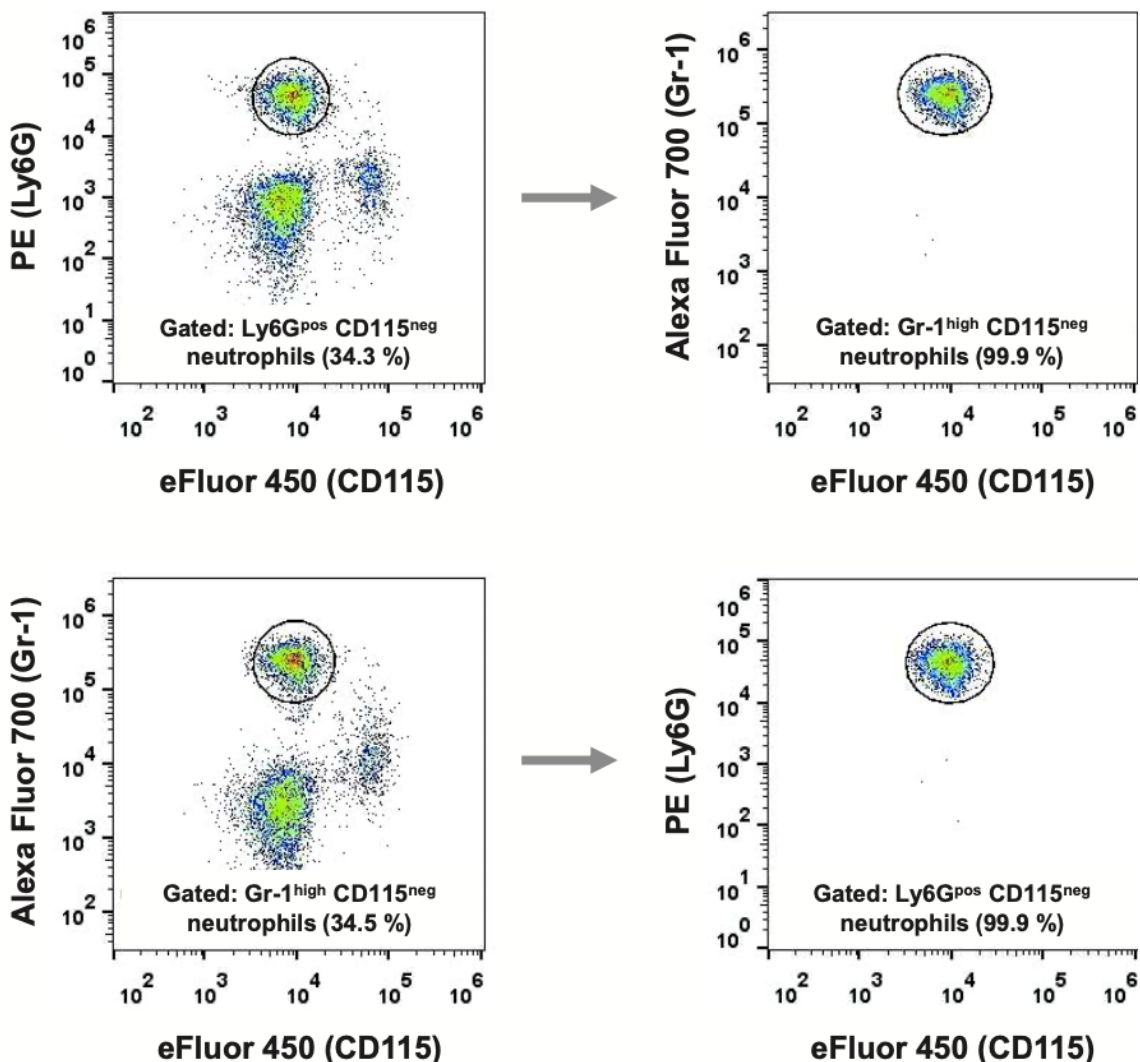


Abbildung 42. Repräsentative Durchflusszytometriediagramme von Kontrollexperimenten zur Identifikationsstrategie neutrophiler Granulozyten aus dem Blut von Wildtyp-Mäusen mit Hilfe immunzytochemischer Färbung und anschließender Durchflusszytometrie. Bestimmung der Population neutrophiler Granulozyten mittels der Oberflächenexpression von Gr-1 (in hohem Maße auf neutrophilen Granulozyten und

klassischen Monozyten exprimiert), CD115 (auf klassischen und nicht-klassischen Monozyten exprimiert) und Ly6G (auf neutrophilen Granulozyten exprimiert). Über 99,9% der als Ly6G-positiv gewerteten Zellen waren negativ für CD115 und zeigten eine hohe Expression von Gr-1. Umgekehrt waren mehr als 99,9% der Gr-1 hoch exprimierenden und CD115-negativen Zellen positiv für eine Expression von Ly6G; (modifiziert nach [144])

1.3 Untersuchung des Migrationsverhaltens neutrophiler Granulozyten

Um die gewebspezifische Migration gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten unter homöostatischen Bedingungen sowie in der systemischen Entzündungsreaktion zu analysieren, wurden die neutrophilen Granulozyten der Maus zunächst mit Hilfe von BrdU metabolisch markiert, was eine Differenzierung anhand des relativen Alters der Zellen ermöglichte. [102] Anschließend wurde über die intraperitoneale Injektion von LPS eine systemische Entzündung induziert, in deren Folge eine quantitative Analyse der Verteilung gealterter und nicht gealterter neutrophiler Immunzellen in Blut und Knochenmark sowie in Leber, Niere und Lunge durchgeführt wurde. Die Induktion der Endotoxämie mittels LPS orientierte sich in Hinblick auf die Applikationsart und -dosis sowie die Dauer der Stimulation an bereits publizierten Vorarbeiten. [166, 167]

Im Einklang hiermit hatte sich in ergänzenden Versuchsreihen dieser Arbeit gezeigt, dass durch das Verwenden einer wesentlich niedrigeren LPS-Dosierung lediglich eine gering ausgeprägte Entzündungsreaktion hinsichtlich der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten erzielt werden konnte.

Anhand der quantitativen Analyse der Zellzahlen in den genannten Organen zu einem definierten Zeitpunkt ließen sich jedoch keine Aussagen über die zeitliche Dynamik der Rekrutierungsprozesse der zu untersuchenden Zellen treffen.

1.4 Analyse einzelner Rekrutierungsschritte gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten nach Isolation und Zelltransfer

Aus wissenschaftlichen Vorarbeiten ist bekannt, dass P-Selektin/CD62P als Schlüsselmolekül leukozytärer Interaktionen mit der Gefäßwand auch für die homöostatische Rückrekrutierung gealterter neutrophiler Granulozyten ins Knochenmark und deren dortigen Abbau von essentieller Bedeutung ist. [102]

Da in der Zirkulation gealterte neutrophile Granulozyten ohne P-Selektin/CD62P nur vermindert zurück ins Knochenmark rekrutiert werden können, besteht die Population der neutrophilen Granulozyten in Blut von P-Selektin/CD62P defizienten (SELP^{-/-}) Mäusen unter homöostatischen Bedingungen zum überwiegenden Anteil aus Zellen des gealterten Phänotyps. [99] Dagegen weist bei Wildtyptieren (unter homöostatischen Bedingungen) nur etwa 20% der im Blut befindlichen neutrophilen Granulozyten einen gealterten Phänotyp auf.

Die Isolation und differenzielle Fluoreszenzmarkierung neutrophiler Granulozyten aus Wildtyp-Mäusen und aus P-Selektin/CD62P-defizienten Mäusen (SELP^{-/-}) mit anschließender systemischer Applikation (i.a. *A. femoralis*) beider Populationen ermöglicht in Kombination mit der Intravitalmikroskopie des *M. cremaster* eine simultane, subtypspezifische Darstellung und Analyse einzelner Rekrutierungsschritte in der Mikrozirkulation der Versuchstiere.

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass durch die Verfahren der Isolation, Markierung und Applikation der Zellen eine vermehrte inflammatorische Aktivierung neutrophiler Granulozyten ausgelöst wird. Aufgrund der für beide Subtypen analogen Vorgehensweise, war dennoch ein Vergleich zwischen gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten möglich.

2. Diskussion der erhobenen Daten

In wissenschaftlichen Vorarbeiten zum biologischen Alterungsprozess von neutrophilen Granulozyten in der Blutzirkulation konnte beobachtet werden, dass diese Immunzellen infolge unter anderem mikrobiotisch vermittelter Alterungsprozesse in der Blutzirkulation die Expression spezieller

Diskussion

Oberflächenmoleküle wie des Chemokinrezeptors CXCR4 verändern. Über die Interaktion von CXCR4 mit dem Chemokin CXCL12 werden sie unter homöostatischen Bedingungen am Ende des Lebenszyklus in der Blutbahn schließlich sukzessive aus der Zirkulation rekrutiert und in Knochenmark, Milz und Leber abgebaut. [101, 103, 173, 191-193] Dieser Prozess beeinflusst wiederum im Sinne einer IL17/G-CSF vermittelten negativen Feedback-Schleife die Granulopoese im Knochenmark und reguliert gleichzeitig das Freisetzen neu gebildeter neutrophiler Granulozyten und hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. [99, 102, 173] In Anbetracht dieser Erkenntnisse und unter Berücksichtigung vorbeschriebener phänotypischer und funktioneller Veränderungen wie einer verringerten CXCR2-Expression, einem für die Leukozytenrekrutierung wichtigen Chemokinrezeptor [101], und einer vermehrten NET-Produktion, einem potentiell gewebschädigenden Abwehrmechanismus [99], wurde initial vermutet, dass gealterte neutrophile Granulozyten einen sehr stark aktivierten und gleichzeitig funktionell eingeschränkten Zelltyp darstellen, der unter homöostatischen Bedingungen aufgrund der potentiell gewebschädigenden Eigenschaften aus der Blutzirkulation entfernt wird. [99, 102, 173, 194] Welche Rolle diese gealterten neutrophilen Granulozyten in der akuten Entzündungsreaktion spielen, war jedoch überwiegend unklar.

Wir haben deshalb in einer ersten Reihe an Experimenten untersucht, welche Migrationsrouten gealterte neutrophile Granulozyten in der systemischen Entzündungsreaktion aufweisen. Dafür haben wir die Anzahl dieser Immunzellen in verschiedenen relevanten Organen der Maus in der experimentellen Sepsis analysiert. Interessanterweise fanden sich nach Induktion einer Endotoxämie mittels LPS im Knochenmark signifikant weniger gealterte neutrophile Granulozyten als in der Kontrollgruppe. Gleichzeitig war nach der LPS-Stimulation eine signifikante Erhöhung der Anzahl gealterter neutrophiler Granulozyten in Leber, Niere und Lunge festzustellen. Dies deutet darauf hin, dass gealterte neutrophile Granulozyten während eines akuten Infektionsgeschehens nicht zurück ins Knochenmark migrieren, um dort abgebaut werden, sondern zum Ort der Entzündung rekrutiert werden. [144]

Diskussion

Durch weiterführende intravitalmikroskopische Analysen der Leukozytenrekrutierung im murinen *M. cremaster* wollten wir den Rekrutierungsprozess von gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten vergleichend und im Detail charakterisieren. In P-Selektin/CD62P-defizienten Mäusen können gealterte neutrophile Granulozyten nur reduziert aus der Zirkulation entfernt werden und akkumulieren deshalb anteilig auf > 90%. In Wildtypmäusen finden sich überwiegend nicht gealterte neutrophile Granulozyten (ungefähr 20% gealterte neutrophile Granulozyten). In Zelltransferexperimenten wurden deshalb die neutrophilen Granulozytenpopulationen dieser verschiedenen Mäuse gewonnen, differentiell fluoreszenzmarkiert und in Donor-Wildtypmäuse transferiert. Die Analyse des Rekrutierungsverhaltens dieser Zellpopulationen zeigte, dass nach Entzündungsinduktion die überwiegend gealterten neutrophilen Granulozyten (aus P-Selektin/CD62P-defizienten Mäusen) im Vergleich zu den überwiegend nicht gealterten neutrophilen Granulozyten (aus Wildtypmäusen) zeitlich früher und in höherer Anzahl an den postkapillären Venolen entzündeter Gewebe rollten und adhären waren. [144]

Zusammenfassend ist daher festzustellen, dass sich das Migrationsverhalten gealterter neutrophiler Granulozyten unter inflammatorischen Bedingungen grundlegend zu verändern scheint. Sie werden unter diesen Umständen nicht mehr aus der Zirkulation entfernt und abgebaut, sondern gehören sogar zu den ersten, an den Ort der Entzündung rekrutierten Immunzellen.

In weiteren Untersuchungsreihen wollte ich die Mechanismen der im Rahmen der Inflammation veränderten Migrationsmuster genauer aufschlüsseln. Für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in entzündetes Gewebe stellen die Interaktionen von entzündlichen Signalmolekülen mit ihren jeweiligen Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten sowie das Zusammenspiel von Adhäsionsmolekülen auf dem Gefäßendothel mit wiederum auf neutrophilen Granulozyten vorhandenen Molekülen Schlüsselprozesse dar. Aus diesem Grund untersuchten wir das Expressionsprofil von für die Extravasation dieser Leukozytensubpopulation relevanten Signal- und Adhäsionsmolekülen. Zwischen gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression von PSGL-

Diskussion

1/CD162, ICAM-2/CD102, VCAM-1/CD106 oder TLR-2. Im Gegensatz dazu fand sich bei gealterten neutrophilen Granulozyten eine signifikant vermehrte Expression von LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b, VLA-4/CD49d, CD44, PECAM-1/CD31, ICAM-1/CD54 und TLR4. [144]

Gleichzeitig kann sich die Expression bestimmter Signal- und Adhäsionsmoleküle neutrophiler Granulozyten unter inflammatorischen Bedingungen verändern. [132] Interessanterweise konnte auf gealterten neutrophilen Granulozyten nach entzündlicher Stimulation mit LPS, einem klassischen Endotoxin gramnegativer Bakterien, eine signifikant erhöhte Expression des β 2-Integrins Mac-1/CD11b und des LPS-Rezeptors TLR4 im Vergleich zu unstimulierten Zellen beobachtet werden. Auf nicht gealterten neutrophilen Granulozyten fiel diese entzündlich bedingte Expressionserhöhung dagegen nur sehr moderat aus. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass diese Moleküle von besonderer Relevanz für das veränderte Migrationsverhalten gealterter neutrophiler Granulozyten unter inflammatorischen Bedingungen sind. Die Expression des TLR-4/MD-2-Komplexes, welcher bei Aktivierung gebildet und internalisiert wird, sank dagegen auf entzündlich stimulierten gealterten neutrophilen Granulozyten. Zusätzlich zu LPS waren diese Veränderungen auch durch die Stimulation mit LTA, einem typischen Bestandteil grampositiver Bakterien [35], und mit HMGB1, einem körpereigenen, schadensassoziierten molekularen Entzündungsstimulus (DAMP) [40], zu beobachten. [144]

Insgesamt deuten diese Daten an, dass gealterte neutrophile Granulozyten eine hohe Reaktivität gegenüber inflammatorischen Stimuli unterschiedlicher Genese aufweisen, welche sich unter entzündlichen Bedingungen im Vergleich zu nicht gealterten neutrophilen Granulozyten nochmals deutlich verstärkt.

In nachfolgenden Experimenten untersuchten wir die Mechanismen dieser entzündlich induzierten Veränderungen auf gealterten neutrophilen Granulozyten. Durch den Einsatz von blockierenden Antikörpern und pharmakologischen Inhibitoren konnten wir nachweisen, dass die oben beschriebenen entzündlich induzierten Veränderungen durch TLR-4- und p38 MAPK-abhängige Signalwege vermittelt werden. [144] Die Veränderungen waren dagegen unabhängig von JNK, ERK1/2, MAPK oder dem Chemokinrezeptor CXCR4, welcher als alternativer LPS-Rezeptor fungieren

Diskussion

kann [168] und, wie bereits erwähnt, unter homöostatischen Bedingungen im Zusammenspiel mit dem Liganden CXCL12 und SDF-1 α die Rekrutierung und den Abbau von gealterten neutrophilen Granulozyten in Knochenmark, Leber und Milz vermittelt.

Die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an das Endothel der entzündeten Mikrozirkulation und die nachfolgende Transmigration erfordern unter anderem eine Aktivierung von leukozytären β 2-Integrinen (z.B. Mac-1/CD11b), wodurch diese eine Konformation annehmen, welche eine höhere Affinität für den endothelialen Liganden, in diesem Fall z.B. ICAM-1, besitzt. [89, 156] Unter homöostatischen Bedingungen wiesen gealterte und nicht gealterte neutrophile Granulozyten ein ähnliches Aktivierungsniveau hinsichtlich des Konformationsstatus und somit eine ähnliche Bindungsaffinität auf. Bei entzündlicher Zellaktivierung exprimierten gealterte neutrophile Granulozyten jedoch signifikant mehr hochaffine β 2-Integrine als nicht gealterte neutrophile Granulozyten. Es zeigte sich, dass diese inflammationsbedingten Aktivierungsprozesse ebenfalls über TLR-4- und p38 MAPK-abhängige Signalwege vermittelt werden. Zugleich waren auch diese Veränderungen nach Stimulation mit LTA und HMGB1 ebenfalls nachweisbar. [144]

Folglich besitzen gealterte neutrophile Granulozyten ein adaptives und hochreaktives Expressionsprofil. Unsere Daten weisen darauf hin, dass dieser Immunzellphänotyp nicht generell überaktiviert ist, sondern in der Lage ist, spezifisch und sensitiv auf eine inflammatorische Stimulation zu reagieren.

In darauf aufbauenden Experimenten sollte die Bedeutung jener *in vitro* identifizierten Signal- und Adhäsionsmoleküle, welche insbesondere bei entzündlicher Aktivierung verstärkt durch gealterte neutrophile Granulozyten exprimiert werden, für das tatsächliche Migrationsverhalten dieser Immunzellen im Rahmen der systemischen septischen Entzündungsreaktion evaluiert werden. Interessanterweise ergaben unsere Ergebnisse nach Induktion einer experimentellen Endotoxämie, dass in TLR-4-defizienten Mäusen, in TLR-2 Knockout-Mäusen sowie in Mäusen, welche mit anti-Mac-1/CD11b blockierenden Antikörpern behandelt wurden, im Vergleich zu Kontrolltieren

Diskussion

tatsächlich deutlich weniger gealterte neutrophile Granulozyten in Leber, Lunge und Niere rekrutiert wurden. [144] Dies lässt darauf schließen, dass das beobachtete Migrationsverhalten gealterter neutrophiler Granulozyten in entzündliches Gewebe entscheidend von der Beteiligung der Moleküle TLR-4 und Mac-1/CD11b abhängig ist. Essentiell für die Interpretation der Daten ist die Tatsache, dass sich bei TLR-4 defizienten und TLR-2 Knockout Mäusen generell signifikant weniger gealterte neutrophile Granulozyten in der Blutzirkulation finden als in Wildtyp-Mäusen, da die beiden Rezeptoren an der Interaktion neutrophiler Granulozyten mit dem Mikrobiom und folglich den Alterungsprozessen dieser Immunzellen in der Zirkulation beteiligt sind. [99] Doch auch die Applikation eines TLR-4-Inhibitors unmittelbar vor Auslösung einer Inflammation, was diesen Effekt ausschließt, verringerte die Rekrutierung gealterter neutrophiler Granulozyten in die peripheren Organe um ein signifikantes Ausmaß. Dahingegen zeigten sich unter Inhibition des Chemokinrezeptors CXCR4 oder dessen Liganden SDF-1 α /CXCL12 keine signifikanten Veränderungen der Rekrutierung gealterter neutrophiler Granulozyten infolge dieser systemischen inflammatorischen Stimulation. [144] Die Moleküle CXCL12 und CXCR4, welche unter Homöostase entscheidend an der Rekrutierung und dem Abbau gealterter neutrophiler Granulozyten in Knochenmark, Leber und Milz beteiligt sind, scheinen im Kontext der Endotoxämie also keine funktionelle Relevanz bezüglich der Rekrutierung gealterter neutrophiler Granulozyten in entzündliches Gewebe zu besitzen.

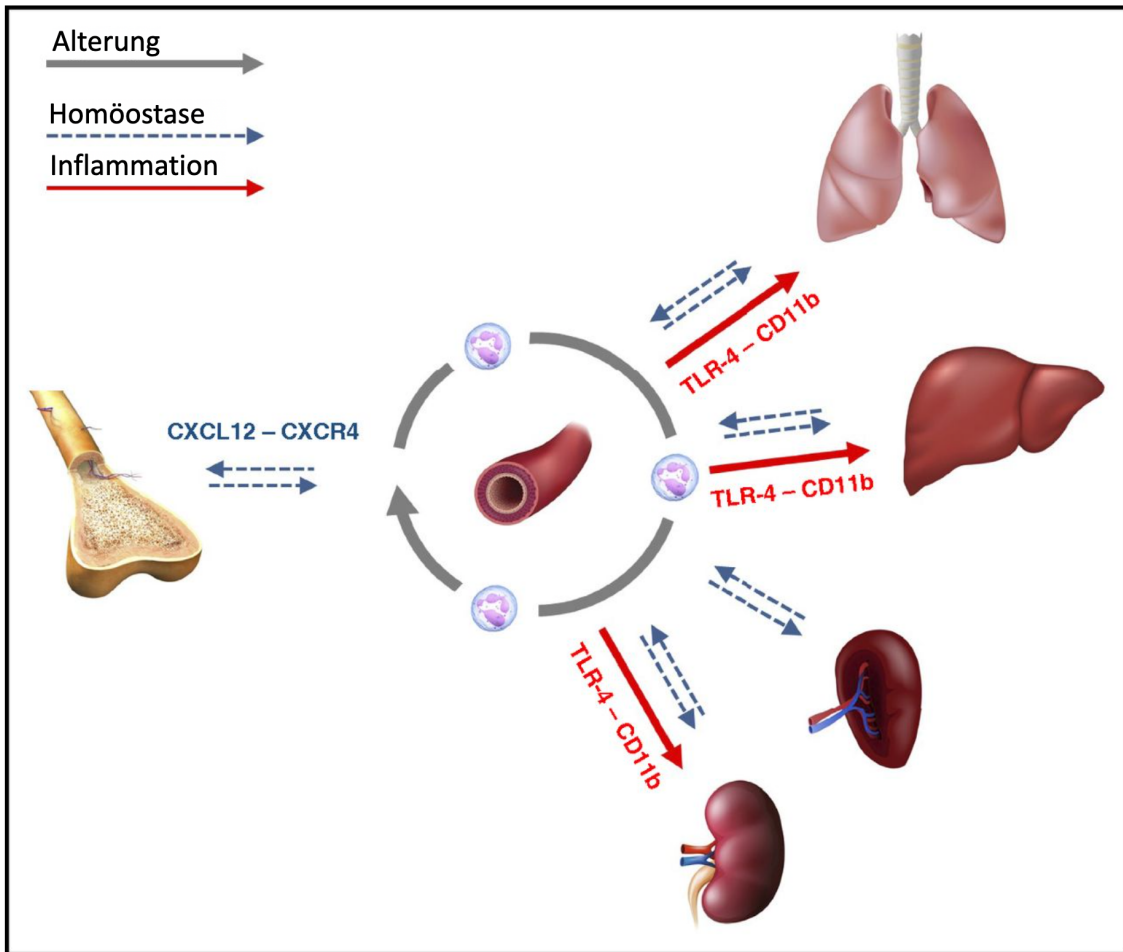


Abbildung 43. Schematische Darstellung des Migrationsverhaltens gealterter neutrophiler Granulozyten unter homöostatischen Bedingungen sowie bei Entzündung. Im Rahmen der Homöostase bewirkt die Interaktion von CXCL12 und CXCR4 eine Rekrutierung von gealterten neutrophilen Granulozyten aus dem Blut, woraufhin ein Abbau dieser Zellen unter anderem in Knochenmark, Milz und Leber stattfinden kann. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete inflammationsbedingte Änderung des Migrationsverhaltens in Form einer Rekrutierung gealterter neutrophiler Granulozyten zum Ort der Entzündung war maßgeblich von TLR-4 und Mac-1/CD11b abhängig; (modifiziert nach [144])

In der Zusammenschau deuten die erhobenen Daten darauf hin, dass gealterte neutrophile Granulozyten inflammatorische Stimuli rasch erkennen können und durch p38 MAPK- und TLR-4-vermittelte Signalwege eine Hochregulierung essentieller Signal- und Adhäsionsmoleküle sowie eine Konformationsänderung der membranständigen β 2-Integrine initiieren. Die dadurch erreichte höhere Affinität für infektiöse Stimuli sowie für endotheliale Liganden ermöglicht es gealterten neutrophilen Granulozyten als erste Immunzellsubpopulation zum Ort des Entzündungsgeschehens zu gelangen.

Diskussion

Eine grundlegende, aus unseren Ergebnissen hervorgehende Fragestellung ist, ob die nachgewiesene, frühzeitige Migration gealterter neutrophiler Granulozyten in entzündetes Gewebe positive oder negative Effekte für den Wirtsorganismus hat.

Die Antwort auf diese Frage hängt zunächst davon ab, ob bei den ins Gewebe rekrutierten gealterten neutrophilen Granulozyten weiterhin eine funktionelle Integrität besteht. Reaktive Sauerstoffspezies werden durch neutrophile Granulozyten einerseits zur Abwehr und Elimination mikrobieller Pathogene gebildet. Andererseits besitzen sie auch eine Relevanz für den Lebenszyklus dieser Immunzellen und spielen beispielsweise bei der Apoptose eine wichtige Rolle. [195, 196] Aus diesem Grund haben wir die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten untersucht. Unsere Analysen ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen gealterten und nicht gealterten neutrophilen Granulozyten. Eine weitere essentielle Funktion von neutrophilen Granulozyten ist die Produktion pro-entzündlicher oder anti-entzündlicher Botenstoffe, sogenannter Zytokine. Über diese können Immunzellen den weiteren Verlauf einer Entzündungsreaktion kontrollieren, indem sie beispielsweise die Rekrutierung anderer Immunzellen beeinflussen. [197] Interessanterweise zeigen unsere Ergebnisse auch hinsichtlich der Produktion relevanter pro- und antiinflammatorischer Zytokine keine signifikanten Unterschiede. Insgesamt implizieren diese Untersuchungsergebnisse eine regelrechte Funktionsfähigkeit von neutrophilen Granulozyten auch nach der Alterung in der Blutzirkulation. Im Kontext der Sepsis ist bekannt, dass die Interaktion verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine entscheidend an der akuten Phase der Pathophysiologie des Krankheitsbildes beteiligt ist. [3, 9, 198] Eine erhöhte Konzentration bestimmter Zytokine wie IL-6 oder IL-10 ist mit einer hierbei mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. [199] Hinsichtlich der in unserer Arbeit untersuchten Zytokine scheint der Alterungsprozess neutrophiler Granulozyten nicht zu einer übermäßigen, potentiell negativen Zytokinproduktion im Falle einer Inflammation beizutragen.

Ein weiterer funktioneller Aspekt in der Beurteilung gealterter neutrophiler Granulozyten ist das Ausbilden und Freisetzen von sogenannten *neutrophil extracellular traps* (NETs). Diese netzartigen Gebilde bestehen aus Chromatin-

Diskussion

Fasern des Zellkernes und können von neutrophilen Granulozyten in den Extrazellulärraum abgegeben werden. An die Oberfläche dieser Netzstrukturen sind wiederum Proteine wie Histone, aber auch granuläre Substanzen wie z.B. neutrophile Elastase, Myeloperoxidase oder Lactoferrin geknüpft. Mithilfe der NETs können neutrophile Granulozyten verschiedene extrazelluläre Erreger immobilisieren und durch die antimikrobiellen Bestandteile bekämpfen. [131, 200] In den Arbeiten anderer Forschungsgruppen wurde gezeigt, dass gealterte neutrophile Granulozyten, verglichen mit nicht gealterten neutrophilen Granulozyten, vermehrt NETs freisetzen können. [99, 102, 201]

In Ergänzung zu diesen Beobachtungen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass gealterte neutrophile Granulozyten im inflammatorischen Milieu gegenüber nicht gealterten neutrophilen Granulozyten eine signifikant erhöhte Phagozytosekapazität für Bakterien aufweisen. Ferner zeigte sich, dass das unter Inflammationsbedingungen erhöhte Phagozytosepotential gealterter neutrophiler Granulozyten vom $\beta 2$ Integrin Mac-1/CD11b abhängig war und Signalkaskaden der *spleen tyrosine kinase* (SYK) in die zugrundeliegenden Mechanismen involviert waren.

Die Alterung neutrophiler Granulozyten äußert sich also neben einer im Vergleich zu nicht gealterten neutrophilen Granulozyten höheren Extravasationsgeschwindigkeit auch in einer Veränderung essentieller funktioneller Eigenschaften wie dem Phagozytosepotential oder der NET-Bildung, welche für die Bekämpfung pathogener Erreger wichtig sind und damit eine effektivere akute Immunreaktion ermöglichen könnten. In der Summe deuten diese Ergebnisse aus unserer und anderen Studien auf einen möglichen Vorteil für den Wirtsorganismus durch die Existenz gealterter neutrophiler Granulozyten bei der akuten Infektion hin. So weisen Mäuse beispielsweise ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines septischen Krankheitsbildes auf, wenn sie in der Ruhephase mit inflammatorischen Stimuli konfrontiert werden. [201] Dies deckt sich mit dem Zeitraum, in dem insgesamt nur wenige gealterte neutrophile Granulozyten im murinen Blut zirkulieren. [102]

Wie sich die phänotypischen und funktionellen Veränderungen im Verhältnis zu potentiell negativen Effekten gealterter neutrophiler Granulozyten auswirken und ob die bisher gewonnenen Erkenntnisse auch therapeutische Konsequenzen für

die Behandlung systemischer Inflammationserkrankungen wie der Sepsis bergen, wird in weiterfolgenden wissenschaftlichen Arbeiten zu untersuchen sein.

3. Stärken und Limitationen der Studie

Nachdem aus vorangegangenen Untersuchungen bereits bekannt war, dass neutrophile Granulozyten im Zuge der Zirkulation im Blutkreislauf und unter anderem durch Interaktionen mit dem Mikrobiom biologischen Alterungsprozessen unterliegen, wurden in der vorliegenden Arbeit der Phänotyp und die funktionellen Eigenschaften gealterter neutrophiler Granulozyten im Kontext inflammatorischer Bedingungen unter kombinierter Anwendung von verschiedenen *In-vitro*- und *In-vivo*-Ansätzen mit murinen, aber auch menschlichen Zellen genauer charakterisiert. [99, 102, 144]

In dieser Kombination von Experimentengruppen auf unterschiedlichem biologischen Niveau (u.a. zellulär *in vitro*, zellulär *ex vivo*, Gesamtorganismus *in vivo*) und von verschiedenen Spezies (murines und humanes Gewebe) zum Ausgleich der jeweils bestehenden wissenschaftlichen Limitationen der einzelnen Versuchsansätze liegt eine der grundlegenden Stärken der vorliegenden Arbeit. Diese Versuche ermöglichten eine fundierte, bislang unbekannte Aussage über den unterschiedlichen Phänotypen und das veränderte Migrationsmuster gealterter neutrophiler Granulozyten, welche mechanistisch über die Einzelzellebene bis in das Gesamtorgansystem auch mit Einzelvergleichen zwischen murinem und humanem System nachvollzogen werden konnte. Insbesondere mit den aufwändigen *In-Vivo*-Experimenten konnten die komplexen Zusammenhänge zwischen angepasstem Rückrekrutierungsmuster in die Abbauorgane und der frühzeitigen und vermehrten Rekrutierung des gealterten Subtyps in geschädigte Gewebe unter inflammatorischen Bedingungen aufgedeckt werden. Anhand intravitalmikroskopischer Aufnahmen des *M. cremaster* nach Isolation und Zelltransfer konnte die Dynamik der einzelnen Schritte der Rekrutierungskaskade gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten in Echtzeit im

Diskussion

Gesamtorgansystem dargestellt und die zwischen beiden Subtypen bestehenden Unterschiede nachgewiesen werden. Weiterführende Untersuchungen zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung gealterter neutrophiler Granulozyten zeigten in Ergänzung zu den Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen eine durch LPS induzierbare, TLR-4- und p38 MAPK-vermittelte Erhöhung der Mac-1/CD11b Expression auf gealterten neutrophilen Granulozyten als Zeichen derer Adaptabilität. Zusätzlich konnten für diesen Leukozytensubtyp erstmals konformationsbedingte Steigerungen der Affinität leukozytärer β 2-Integrine für ICAM-1 nachgewiesen werden. [144]

Als grundsätzliche Limitation der vorliegenden Arbeit ist zunächst anzuführen, dass der überwiegende Anteil der Versuche im Mausmodell durchgeführt wurde. Wie bereits in Abschnitt V 1. erwähnt, stellen Untersuchungen an der Maus, aufgrund von multiplen Vorteilen ein etabliertes Modell zur Untersuchung der Leukozytenrekrutierung im intakten Gesamtorganismus dar. [89, 111, 184] Allerdings bestehen auch physiologische und immunologische Unterschiede zwischen dem menschlichen und dem murinen Organismus, beispielsweise bezüglich der zirkadianen Rhythmik, der Sensitivität auf Endotoxine oder der Verhältnisse und Eigenschaften zellulärer Blutkomponenten. [202-205]

Ferner lässt sich die Sepsis als hinsichtlich der Pathogenese und des Wirtsorganismus vielschichtiges, multifaktorielles Krankheitsbild im experimentellen Kontext nur schwer standardisiert und zugleich umfassend abbilden. Grundsätzlich beruhen Ansätze zur Induktion einer septischen Immunreaktion in der Maus entweder auf Methoden zur Unterbrechung physiologischer Barrieren (z.B. coecaler Ligatur und Punktion), der Verabreichung intakter Pathogene (z.B. einzelner Bakterienstämme oder Darminhalt) oder der Applikation von Toxinen (z.B. LPS, LTA). [206, 207] Im Rahmen dieser Arbeit wurde überwiegend LPS zur Stimulation *in vivo* und *in vitro* verwendet. Die Verabreichung eines Endotoxins gramnegativer Bakterien kann jedoch nur im Ansatz den längerfristigen immunologischen Verlauf oder eine polymikrobielle Infektsituation im Organismus widerspiegeln. In Teilen der *In-vitro*-Experimente wurden zusätzliche Versuchsreihen mit Verabreichung von LTA und HMGB-1 als alternative inflammatorische Stimuli durchgeführt, wobei vergleichbare Effekte wie unter LPS-Stimulation beobachtet werden konnten. Für

Diskussion

eine umfassendere Beurteilung bezüglich einer universellen Rolle der gealterten neutrophilen Granulozyten im Krankheitsbild der Sepsis bedürfte es jedoch einer erweiterten Anwendung von LTA und HMGB-1 auf sämtliche (*In-vivo*) Experimente sowie ergänzend alternativer Sepsis Modelle wie beispielsweise mittels coecaler Ligatur und Punktion.

Eine weitere Limitation besteht in der Tatsache, dass genetisch homogene, unter standardisierten Haltungsbedingungen lebende Mauspopulationen nicht die genotypische Vielfalt von menschlichen SepsispatientInnen repräsentieren können. Auch altersspezifische Unterschiede oder der Einfluss von Komorbiditäten wären im Kontext der Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse zu berücksichtigen. In diesem Kontext ist zu erwähnen, dass bei glücklicherweise ethisch-moralisch streng limitierten Möglichkeiten zur Untersuchung menschlichen Materials oder gar dem Gesamtorganismus Mensch alternative Modelle entwickelt werden müssen, um möglichst nahe an die Bedingungen des menschlichen Mechanismus anzuknüpfen. [208, 209]

Wie bereits unter Kapitel V 1.1. dargestellt, ist bei der Bewertung von Ergebnissen aus dem Kremastermodell neben der anatomisch bedingten Beschränkung auf männliche Tiere und den damit einhergehenden potentiellen Abweichungen bei weiblichen Mäusen zusätzlich zu beachten, dass die Rekrutierung von Leukozyten im Organismus gewebs- und organspezifischen Unterschieden unterliegt. Die Ergebnisse hinsichtlich der einzelnen Rekrutierungsschritte in der Mikrozirkulation müssten somit für eine fundiertere Aussage nochmals in jedem einzelnen Erfolgsorgan untersucht werden. [184, 185]

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen, vielschichtigen Erkenntnisse zum tieferen Verständnis der Mechanismen der phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von gealterten neutrophilen Granulozyten im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion signifikant beigetragen haben, jedoch nur näherungsweise Aussagen über den Einfluss gealterter neutrophiler Granulozyten auf das Outcome der Sepsis in der Maus oder im Menschen ermöglichen und die Untersuchungsergebnisse in weiteren Experimentengruppen noch weiter untermauert werden könnten.

VI Zusammenfassung

Trotz erheblicher wissenschaftlicher Bemühungen ist die Sepsis als systemische Entzündungsreaktion nach wie vor ein Krankheitsbild von globaler medizinischer Relevanz. In wissenschaftlichen Untersuchungen zur akuten Entzündungsreaktionen konnten in den letzten Jahren die zugrundeliegenden Mechanismen zunehmend aufgeschlüsselt werden. Neutrophile Granulozyten stellen dabei einen Hauptakteur der akuten Entzündungsreaktion dar. Nachdem neutrophile Granulozyten lange als homogene Gruppe von Immunzellen mit einfacher Funktionalität betrachtet wurden, haben sich in der jüngeren Vergangenheit zunehmend Hinweise für eine relevante phänotypische und funktionelle Heterogenität innerhalb der neutrophilen Granulozyten gezeigt, welche die Immunreaktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems bei verschiedenen Erkrankungen wie beispielsweise Infektionen, Autoimmunerkrankungen oder bösartigen Tumoren modulieren. Nach Reifung und Freisetzung aus dem Knochenmark interagieren neutrophile Granulozyten während der Zirkulation im Blutkreislauf des Organismus unter anderem mit dem Mikrobiom und dessen Sekretionsprodukten. Dadurch verändern sich diese Immunzellen im Rahmen eines Alterungsprozesses, welches zur Ausbildung charakteristischer phänotypischer und funktioneller Eigenschaften, beispielsweise der Expression bestimmter Oberflächenproteine wie dem Chemokinrezeptor CXCR4 und oder dem Signal- und Adhäsionsmolekül CD62L/L-Selektin führt. Die molekularen Veränderungen der Zelloberfläche ermöglichen unter homöostatischen Bedingungen eine Rückrekrutierung aus der Blutzirkulation und den Abbau der gealterten Zellen in Knochenmark, Leber und Milz und sind zudem in einem Feedback-regulierten Mechanismus an der Mobilisation neu gebildeter neutrophiler Granulozyten und Stammzellen beteiligt. Nachfolgende Studien weisen auf eine starke Aktivierung gealterter neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu nicht gealterten neutrophilen Granulozyten hin. Die Bedeutung dieses Leukozytenphänotyps unter inflammatorischen Bedingungen sowie den phänotypischen und funktionellen Charakteristika war jedoch größtenteils unklar.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte deshalb das Migrationsverhalten gealterter neutrophiler Granulozyten im Kontext der akuten Entzündungsreaktion untersucht und eine phänotypische sowie funktionelle Charakterisierung dieser Zellen vorgenommen werden. Zunächst wurde im Mausmodell die Verteilung gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten unter homöostatischen Bedingungen sowie nach Induktion einer systemischen experimentellen Sepsis untersucht. Im Vergleich zur Homöostase war im Rahmen der Inflammation eine signifikant höhere Anzahl gealterter neutrophiler Granulozyten in Leber, Niere und Lunge festzustellen. Dagegen fanden sich, verglichen mit Kontrolltieren, signifikant weniger gealterte neutrophile Granulozyten im Knochenmark der LPS-stimulierten Mäuse. Im Anschluss an einen Zelltransfer differentiell fluoreszenzmarkierter neutrophiler Granulozyten mit unterschiedlichem Alterungsgrad wurden intravitalmikroskopische Analysen der Leukozytenrekrutierung im Kremastermodell der Maus durchgeführt. Es zeigte sich, dass die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung (Rolling, Adhärenz, Transmigration) bei neutrophilen Granulozyten des gealterten Phänotyps zeitlich früher und in höherer Anzahl erfolgten. In der Zusammenschau deuten diese Daten darauf hin, dass sich das Migrationsverhalten gealterter neutrophiler Granulozyten im Kontext der Inflammation grundlegend verändert und die gealterten neutrophilen Granulozyten frühzeitig an den Ort des Entzündungsgeschehens rekrutiert werden.

In der weiteren phänotypischen und funktionellen Charakterisierung gealterter neutrophiler Granulozyten war bereits unter homöostatischen Bedingungen eine vermehrte Expression der Signal- und Adhäsionsmoleküle LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b, VLA-4/CD49d, CD44, PECAM-1/CD31, ICAM-1/CD54 und TLR4 auf gealterten neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu nicht gealterten neutrophilen Granulozyten nachweisbar. Nach inflammatorischer Stimulation konnte sogar eine Zunahme der altersabhängigen Unterschiede der Expression von Mac-1/CD11b nachgewiesen werden, da gealterte neutrophile Granulozyten das Expressionsniveau dieses Moleküls durch TLR4- und p38 MAPK-vermittelte Prozesse im Vergleich zu nicht gealterten Zellen überproportional steigerten. Die Aktivierung leukozytärer Integrine stellt eine der Grundlagen für eine effektive Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in der entzündeten Mikrozirkulation dar.

Zusammenfassung

Im unstimulierten Zustand befand sich die Integrinkonformation gealterter und nicht gealterter neutrophiler Granulozyten auf einem vergleichbaren Aktivierungsniveau. Nach Stimulation wiesen neutrophile Granulozyten des gealterten Phänotyps im Vergleich zu nicht gealterten Zellen jedoch eine signifikant höhere Anzahl an hochaffinen β 2-Integrinen auf. Auch diese Effekte waren abhängig von TLR4 und p38 MAPK. In der Zusammenschau deuten diese Daten darauf hin, dass gealterte neutrophile Granulozyten hochreaktive und spezifisch agierende Immunzellen darstellen, welche sensitiv auf inflammatorische Stimuli reagieren, was wiederum die Grundlage für ihre rasche und spezifische Rekrutierung an den Ort einer Entzündung bildet. Somit stellen gealterte neutrophile Granulozyten bei Homöostase und insbesondere bei entzündlicher Stimulation hochreaktive Immunzellen dar.

Zuletzt wurden weitere funktionelle Eigenschaften gealterter neutrophiler Granulozyten, welche für eine effektive Pathogenabwehr erforderlich sind, analysiert und mit Zellen des nicht gealterten Subtyps verglichen. Interessanterweise bestanden hinsichtlich der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies sowie der Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Phänotypen. Unter inflammatorischen Bedingungen wiesen gealterte neutrophile Granulozyten, verglichen mit nicht gealterten Zellen, jedoch eine signifikant erhöhte Phagozytosekapazität für Bakterien auf, welche von Mac-1/CD11b und SYK abhängig war. Diese Ergebnisse deuten einerseits auf eine volle Funktionalität gealterter neutrophiler Granulozyten hin, andererseits implizieren sie auch, dass die Alterungsprozesse in der Blutzirkulation Verbesserungen der funktionellen anti-pathogenen Eigenschaften dieser Immunzellen induzieren.

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass gealterte neutrophile Granulozyten hochreaktive und spezifische Immunzellen darstellen, welche sensitiv auf inflammatorische Stimuli reagieren. Diese Eigenschaften wiederum bilden die Grundlage für ihre rasche und spezifische Rekrutierung an den Ort einer Entzündung, wo sie ihre teilweise gesteigerte anti-mikrobielle Funktionalität für eine effektive Pathogenabwehr einsetzen können.

VII Abkürzungsverzeichnis

Ab	Antibody
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
CMP	Common myeloid progenitor
CXCL	CXC chemokine ligand
CXCR	CXC chemokine receptor
DAMP	Damage-associated molecular pattern
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonucleic acid, <i>Desoxyribonukleinsäure</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2
FDZ	Forschungsdatenzentrum
FiO₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
g	Gramm
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HBSS	Hank's balanced salt solution
HMGB1	High-Mobility Group Box 1
HPF	High power field
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JNK	Jun N-terminal kinase
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Liter
LFA-1	Leucocyte function associated antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichoic acid, <i>Lipoteichonsäure</i>
LXR	Liver X receptor

Abkürzungsverzeichnis

Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
<i>M. cremaster</i>	<i>Musculus cremaster</i>
M-CSFR	Macrophage colony-stimulating factor receptor
mAb	monoclonal antibody
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MAP	Mean arterial pressure, <i>Mittlerer arterieller Blutdruck</i>
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MFI	Mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NET	Neutrophil extracellular trap
ng	Nanogramm
NLR	NOD-like receptor
nM	Nanomolar
PAI-1	<i>plasminogen-activator inhibitor type-1</i>
PaO₂	Sauerstoffpartialdruck
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PRR	Pattern recognition receptor
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand
qSOFA	quick sequential organ failure assessment
RFI	Relative fluorescence intensity
RNA	Ribonucleic acid, <i>Ribonukleinsäure</i>
ROS	Reactive oxygen species, <i>reactive Sauerstoffspezies</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Standard error of mean,
SOFA	Sequential organ failure assessment
SYK	Spleen tyrosine kinase
TLR	Toll-like-receptor

Abkürzungsverzeichnis

TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	very late antigen-4
WHO	World Health Organization, <i>Weltgesundheitsorganisation</i>
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

VIII Literaturverzeichnis

1. Geroulanos, S. and E.T. Douka, *Historical perspective of the word "sepsis"*. Intensive Care Medicine, 2006. **32**(12): p. 2077-2077.
2. Funk, D.J., J.E. Parrillo, and A. Kumar, *Sepsis and septic shock: a history*. Critical care clinics, 2009. **25**(1): p. 83-101.
3. Angus, D.C. and T. van der Poll, *Severe Sepsis and Septic Shock*. New England Journal of Medicine, 2013. **369**(9): p. 840-851.
4. Cerra, F.B., *The Systemic Septic Response: Multiple Systems Organ Failure*. Critical care clinics, 1985. **1**(3): p. 591-607.
5. Wiersinga, W.J., et al., *Host innate immune responses to sepsis*. Virulence, 2014. **5**(1): p. 36-44.
6. Gotts, J.E. and M.A. Matthay, *Sepsis: pathophysiology and clinical management*. Bmj, 2016. **353**: p. i1585.
7. Hotchkiss, R.S. and I.E. Karl, *The pathophysiology and treatment of sepsis*. New England Journal of Medicine, 2003. **348**(2): p. 138-150.
8. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 885.
9. van der Poll, T., et al., *The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets*. Nature Reviews Immunology, 2017. **17**: p. 407.
10. van der Poll, T. and S.M. Opal, *Host-pathogen interactions in sepsis*. The Lancet infectious diseases, 2008. **8**(1): p. 32-43.
11. Reinhart, K., et al., *Recognizing sepsis as a global health priority—a WHO resolution*. New England Journal of Medicine, 2017. **377**(5): p. 414-417.
12. Fleischmann, C., et al., *Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-Patienten im Krankenhaus*. Dtsch Arztebl International, 2016. **113**(10): p. 159-166.
13. Gaieski, D.F., et al., *Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States*. Crit Care Med, 2013. **41**(5): p. 1167-74.
14. Paoli, C.J., et al., *Epidemiology and Costs of Sepsis in the United States—An Analysis Based on Timing of Diagnosis and Severity Level*. Crit Care Med, 2018. **46**(12): p. 1889-1897.
15. Fleischmann, C., et al., *Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations*. Am J Respir Crit Care Med, 2016. **193**(3): p. 259-72.
16. Rudd, K.E., et al., *Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study*. Lancet, 2020. **395**(10219): p. 200-211.
17. Eitze, S., et al., *Determinants of sepsis knowledge: a representative survey of the elderly population in Germany*. Critical Care, 2018. **22**(1): p. 273.
18. Kaukonen, K.-M., et al., *Mortality Related to Severe Sepsis and Septic Shock Among Critically Ill Patients in Australia and New Zealand, 2000-2012* *Mortality Related to Severe Sepsis and Septic Shock*. JAMA, 2014. **311**(13): p. 1308-1316.
19. Verbundprojekt impfen60+ und Thüringer Ministerium für Arbeit, S., Gesundheit, Frauen und Familie (TMASGFF), verantwortlich PD Dr. Cornelia Betsch Universität Erfurt *Kurze Fakten: Sepsis*.

[cited

; Available from: <https://www.thueringen-impft.de/kurze-fakten/sepsis/>.

20. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. *Jama*, 2016. **315**(8): p. 801-10.
21. Ferreira, F.L., et al., *Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients*. *Jama*, 2001. **286**(14): p. 1754-1758.
22. Vincent, J.L., et al., *The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine*. *Intensive Care Med*, 1996. **22**(7): p. 707-10.
23. Shankar-Hari, M., et al., *Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. *Jama*, 2016. **315**(8): p. 775-787.
24. Medzhitov, R. and C. Janeway Jr, *Innate immunity*. *New England Journal of Medicine*, 2000. **343**(5): p. 338-344.
25. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway Immunologie*. 2018: Springer-Verlag.
26. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, *The multifaceted functions of neutrophils*. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2014. **9**: p. 181-218.
27. Nauseef, W.M. and N. Borregaard, *Neutrophils at work*. *Nature Immunology*, 2014. **15**: p. 602.
28. Silva, M.T., *When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system*. *Journal of leukocyte biology*, 2010. **87**(1): p. 93-106.
29. Dinarello, C.A., *Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock*. *Chest*, 1997. **112**(6): p. 321S-329S.
30. Janeway Jr, C.A. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. *Annual review of immunology*, 2002. **20**(1): p. 197-216.
31. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 805-820.
32. Saito, T. and M. Gale Jr, *Principles of intracellular viral recognition*. *Current opinion in immunology*, 2007. **19**(1): p. 17-23.
33. Jiang, Q., et al., *Cutting edge: lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and Toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF- κ B*. *The Journal of Immunology*, 2000. **165**(7): p. 3541-3544.
34. Hoshino, K., et al., *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product*. *The Journal of Immunology*, 1999. **162**(7): p. 3749-3752.
35. Knapp, S., et al., *Lipoteichoic acid-induced lung inflammation depends on TLR2 and the concerted action of TLR4 and the platelet-activating factor receptor*. *The Journal of Immunology*, 2008. **180**(5): p. 3478-3484.
36. Takeuchi, O., et al., *Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components*. *Immunity*, 1999. **11**(4): p. 443-451.
37. Schwandner, R., et al., *Peptidoglycan-and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(25): p. 17406-17409.

38. Lien, E., et al., *Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(47): p. 33419-33425.
39. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annual review of immunology, 1994. **12**(1): p. 991-1045.
40. Harris, H.E., U. Andersson, and D.S. Pisetsky, *HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease*. Nature Reviews Rheumatology, 2012. **8**(4): p. 195.
41. McDonald, B., et al., *Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation*. Science, 2010. **330**(6002): p. 362-366.
42. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity*. Annual review of immunology, 2000. **18**(1): p. 621-663.
43. Siebenlist, U., G. Franzoso, and K. Brown, *Structure, regulation and function of NF- κ B*. Annual review of cell biology, 1994. **10**(1): p. 405-455.
44. Rittirsch, D., M.A. Flierl, and P.A. Ward, *Harmful molecular mechanisms in sepsis*. Nature Reviews Immunology, 2008. **8**(10): p. 776-787.
45. Ma, A. and P. Kubes, *Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2008. **6**(3): p. 415-420.
46. Reid, V. and N.R. Webster, *Role of microparticles in sepsis*. British journal of anaesthesia, 2012. **109**(4): p. 503-513.
47. Aird, W.C., *The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2003. **101**(10): p. 3765-3777.
48. Ward, P.A., *The dark side of C5a in sepsis*. Nature Reviews Immunology, 2004. **4**(2): p. 133-142.
49. Levi, M., et al., *Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis*. Jama, 1993. **270**(8): p. 975-979.
50. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. Nature Reviews Immunology, 2013. **13**(1): p. 34-45.
51. Uhrig, A. and N. Suttorp, *297 Sepsis und septischer Schock*, in *Harrisons Innere Medizin*, N. Suttorp, et al., Editors. 2020, ABW Verlag.
52. Seymour, C.W., et al., *Time to treatment and mortality during mandated emergency care for sepsis*. New England Journal of Medicine, 2017. **376**(23): p. 2235-2244.
53. Gaieski, D.F., et al., *Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department*. Critical care medicine, 2010. **38**(4): p. 1045-1053.
54. Kumar, A., et al., *Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*. Critical care medicine, 2006. **34**(6): p. 1589-1596.
55. Liu, V.X., et al., *The timing of early antibiotics and hospital mortality in sepsis*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2017. **196**(7): p. 856-863.
56. Levy, M.M., et al., *Sepsis change bundles: converting guidelines into meaningful change in behavior and clinical outcome*. Critical care medicine, 2004. **32**(11): p. S595-S597.

57. Dellinger, R.P., et al., *Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock*. Intensive care medicine, 2004. **30**(4): p. 536-555.
58. Levy, M.M., L.E. Evans, and A. Rhodes, *The surviving sepsis campaign bundle: 2018 update*. Intensive care medicine, 2018. **44**(6): p. 925-928.
59. Hotchkiss, R.S., et al., *Sepsis and septic shock*. Nature reviews Disease primers, 2016. **2**(1): p. 1-21.
60. Leisman, D.E., et al., *Patterns and outcomes associated with timeliness of initial crystalloid resuscitation in a prospective sepsis and septic shock cohort*. Critical Care Medicine, 2017. **45**(10): p. 1596-1606.
61. Andrews, B., et al., *Effect of an early resuscitation protocol on in-hospital mortality among adults with sepsis and hypotension: a randomized clinical trial*. Jama, 2017. **318**(13): p. 1233-1240.
62. Leisman, D.E., et al., *Survival benefit and cost savings from compliance with a simplified 3-hour sepsis bundle in a series of prospective, multisite, observational cohorts*. Critical care medicine, 2017. **45**(3): p. 395-406.
63. Ospina-Tascón, G.A., et al., *Effects of very early start of norepinephrine in patients with septic shock: a propensity score-based analysis*. Critical Care, 2020. **24**(1): p. 1-11.
64. Martin, C., et al., *Effect of norepinephrine on the outcome of septic shock*. Critical care medicine, 2000. **28**(8): p. 2758-2765.
65. De Backer, D., et al., *Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock*. New England Journal of Medicine, 2010. **362**(9): p. 779-789.
66. De Backer, D., et al., *Dopamine versus norepinephrine in the treatment of septic shock: a meta-analysis*. Critical care medicine, 2012. **40**(3): p. 725-730.
67. Sandiumenge, A., et al., *Therapy of ventilator-associated pneumonia*. Intensive care medicine, 2003. **29**(6): p. 876-883.
68. Cohen, J., et al., *Sepsis: a roadmap for future research*. The Lancet infectious diseases, 2015. **15**(5): p. 581-614.
69. Kang, J.H., et al., *An extracorporeal blood-cleansing device for sepsis therapy*. Nature medicine, 2014. **20**(10): p. 1211-1216.
70. Van der Poll, T., *Future of sepsis therapies*. 2016, BioMed Central.
71. Seymour, C.W., et al., *Derivation, validation, and potential treatment implications of novel clinical phenotypes for sepsis*. Jama, 2019. **321**(20): p. 2003-2017.
72. Richard B Johnston, J., MD, *An overview of the innate immune system*, in *UpToDate*, M. Anna M Feldweg, Editor. 2020, UpToDate Inc.: Waltham, MA.
73. Matlung, H.L., et al., *Neutrophils kill antibody-opsonized cancer cells by trogoptosis*. Cell Reports, 2018. **23**(13): p. 3946-3959. e6.
74. Urban-Wojciuk, Z., et al., *The role of TLRs in anti-cancer immunity and tumor rejection*. Frontiers in immunology, 2019. **10**: p. 2388.
75. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system*. New England journal of medicine, 2000. **343**(1): p. 37-49.
76. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. The Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-1789.
77. Kaufmann, S.H., *Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff*. Nature immunology, 2008. **9**(7): p. 705-712.

78. Stone, K.D., C. Prussin, and D.D. Metcalfe, *IgE, mast cells, basophils, and eosinophils*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010. **125**(2): p. S73-S80.
79. Westermann, J., *Eosinophile Granulozyten*, in *Harrisons Innere Medizin*, N. Suttrop, et al., Editors. 2020, ABW Verlag.
80. Furuta, G.T. and D.A. Katzka, *Eosinophilic esophagitis*. *New England Journal of Medicine*, 2015. **373**(17): p. 1640-1648.
81. Humbles, A.A., et al., *A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling*. *Science*, 2004. **305**(5691): p. 1776-1779.
82. Rothenberg, M.E. and S.P. Hogan, *The eosinophil*. *Annual review of immunology*, 2006. **24**.
83. O'Connell, K.E., et al., *Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research*. *Comparative medicine*, 2015. **65**(2): p. 96-113.
84. Hahn, J.-M., *Laborwerte – Normbereiche*, in *Checkliste Innere Medizin*, J.-M. Hahn, Editor. 2018, Georg Thieme Verlag.
85. Soehnlein, O. and L. Lindbom, *Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation*. *Nature Reviews Immunology*, 2010. **10**(6): p. 427-439.
86. Alves-Filho, J.C., et al., *The role of neutrophils in severe sepsis*. *Shock*, 2008. **30**(7): p. 3-9.
87. Ley, K., et al., *Neutrophils: new insights and open questions*. *Science immunology*, 2018. **3**(30).
88. Kruger, P., et al., *Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(3): p. e1004651.
89. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(3): p. 159-175.
90. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. *Immunity*, 2010. **33**(5): p. 657-670.
91. Hidalgo, A., et al., *The neutrophil life cycle*. *Trends in immunology*, 2019. **40**(7): p. 584-597.
92. Manz, M.G. and S. Boettcher, *Emergency granulopoiesis*. *Nature reviews Immunology*, 2014. **14**(5): p. 302-314.
93. Stark, M.A., et al., *Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17*. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 285-294.
94. Basu, S., et al., *Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2002. **100**(3): p. 854-861.
95. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. *Blood*, 2010. **116**(4): p. 625-627.
96. Simon, S.I. and M.-H. Kim, *A day (or 5) in a neutrophil's life*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2010. **116**(4): p. 511-512.
97. Li, K.W., et al., *Deuterium and neutrophil kinetics*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2011. **117**(22): p. 6052-6053.
98. Tofts, P.S., et al., *Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2011. **117**(22): p. 6050-6052.
99. Zhang, D., et al., *Neutrophil ageing is regulated by the microbiome*. *Nature*, 2015. **525**(7570): p. 528-32.

100. Martin, C., et al., *Chemokines Acting via CXCR2 and CXCR4 Control the Release of Neutrophils from the Bone Marrow and Their Return following Senescence*. *Immunity*, 2003. **19**(4): p. 583-593.
101. Rankin, S.M., *The bone marrow: a site of neutrophil clearance*. *Journal of leukocyte biology*, 2010. **88**(2): p. 241-251.
102. Casanova-Acebes, M., et al., *Rhythmic Modulation of the Hematopoietic Niche through Neutrophil Clearance*. *Cell*, 2013. **153**(5): p. 1025-1035.
103. Furze, R.C. and S.M. Rankin, *Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow*. *Immunology*, 2008. **125**(3): p. 281-288.
104. Nourshargh, S. and R. Alon, *Leukocyte Migration into Inflamed Tissues*. *Immunity*, 2014. **41**(5): p. 694-707.
105. Petri, B., M. Phillipson, and P. Kubes, *The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective*. *The Journal of Immunology*, 2008. **180**(10): p. 6439-6446.
106. Reichel, C.A., et al., *Chemokine receptors Ccr1, Ccr2, and Ccr5 mediate neutrophil migration to postischemic tissue*. *Journal of leukocyte biology*, 2006. **79**(1): p. 114-122.
107. Reichel, C.A., et al., *CC motif chemokine CCL3 and canonical neutrophil attractants promote neutrophil extravasation through common and distinct mechanisms*. *Blood*, 2012. **120**(4): p. 880-890.
108. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. *Immunity*, 2000. **12**(2): p. 121-127.
109. Luster, A.D., *Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation*. *New England Journal of Medicine*, 1998. **338**(7): p. 436-445.
110. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(9): p. 678-689.
111. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2006. **203**(12): p. 2569-2575.
112. Filippi, M.-D., *Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives*. *blood*, 2019. **133**(20): p. 2149-2158.
113. Proebstl, D., et al., *Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo*. *Journal of Experimental Medicine*, 2012. **209**(6): p. 1219-1234.
114. Stark, K., K. Pekayvaz, and S. Massberg, *Role of pericytes in vascular immunosurveillance*. *Front. Biosci*, 2018. **23**: p. 767-781.
115. Lerchenberger, M., et al., *Matrix metalloproteinases modulate ameboid-like migration of neutrophils through inflamed interstitial tissue*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2013. **122**(5): p. 770-780.
116. Nauseef, W.M., *Biological roles for the NOX family NADPH oxidases*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(25): p. 16961-16965.
117. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 1998. **92**(9): p. 3007-3017.
118. Yipp, B.G. and P. Kubes, *NETosis: how vital is it?* *Blood*, 2013. **122**(16): p. 2784-2794.
119. Branzk, N., et al., *Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens*. *Nature immunology*, 2014. **15**(11): p. 1017-1025.

120. Taylor, P.R., et al., *Activation of neutrophils by autocrine IL-17A–IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR γ t and dectin-2*. *Nature immunology*, 2014. **15**(2): p. 143-151.
121. Silvestre-Roig, C., A. Hidalgo, and O. Soehnlein, *Neutrophil heterogeneity: Implications for homeostasis and pathogenesis*. *Blood*, 2016. **127**.
122. Hidalgo, A., et al., *Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury*. *Nature medicine*, 2009. **15**(4): p. 384-391.
123. Woodfin, A., et al., *ICAM-1–expressing neutrophils exhibit enhanced effector functions in murine models of endotoxemia*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2016. **127**(7): p. 898-907.
124. Woodfin, A., et al., *The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo*. *Nature immunology*, 2011. **12**(8): p. 761-769.
125. Zhang, Y.-P., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of pulmonary fibroblasts by Ca²⁺ signaling*. *Thrombosis research*, 2013. **131**(1): p. 64-71.
126. Lekstrom-Himes, J.A. and J.I. Gallin, *Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes*. *New England Journal of Medicine*, 2000. **343**(23): p. 1703-1714.
127. Bodey, G.P., et al., *Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia*. *Annals of internal medicine*, 1966. **64**(2): p. 328-340.
128. Hoesel, L.M., et al., *Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis*. *Shock*, 2005. **24**(1): p. 40-47.
129. Brown, A.E., *Neutropenia, fever, and infection*. *The American journal of medicine*, 1984. **76**(3): p. 421-428.
130. Pizzo, P.A., *Management of Fever in Patients with Cancer and Treatment-Induced Neutropenia*. *New England Journal of Medicine*, 1993. **328**(18): p. 1323-1332.
131. McDonald, B., et al., *Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis*. *Cell host & microbe*, 2012. **12**(3): p. 324-333.
132. Beyrau, M., J.V. Bodkin, and S. Nourshargh, *Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity*. *Open biology*, 2012. **2**(11): p. 120134.
133. Sônego, F., et al., *Paradoxical roles of the neutrophil in sepsis: protective and deleterious*. *Frontiers in immunology*, 2016. **7**: p. 155.
134. Czaikoski, P.G., et al., *Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis*. *PloS one*, 2016. **11**(2): p. e0148142.
135. McDonald, B., et al., *Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2017. **129**(10): p. 1357-1367.
136. Wooten, R.M., et al., *Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi**. *J Immunol*, 2002. **168**(1): p. 348-55.
137. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene*. *Science*, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.

138. Vogel, S.N., C.T. Hansen, and D.L. Rosenstreich, *Characterization of a congenitally LPS-resistant, athymic mouse strain*. J Immunol, 1979. **122**(2): p. 619-22.
139. Bullard, D.C., et al., *P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli*. J Clin Invest, 1995. **95**(4): p. 1782-8.
140. 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.
141. Lichtman, J.W. and J.-A. Conchello, *Fluorescence microscopy*. Nat Meth, 2005. **2**(12): p. 910-919.
142. Mempel, T.R., et al., *Visualization of leukocyte transendothelial and interstitial migration using reflected light oblique transillumination in intravital video microscopy*. Journal of vascular research, 2003. **40**(5): p. 435-441.
143. Rottenfusser, R., E.E. Wilson, and M.W. Davidson. *Education in Microscopy and Digital Imaging*. Carl Zeiss Microscopy Online Campus [cited 2019 27. März]; Available from: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/fluorescence.html>.
144. Uhl, B., et al., *Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response*. Blood, 2016. **128**(19): p. 2327-2337.
145. Piston, D.W., T.J. Fellers, and M.W. Davidson. *Fundamentals and Applications in Multiphoton Excitation Microscopy*. Multiphoton Microscopy 2016; Available from: <https://www.microscopyu.com/techniques/multi-photon/multiphoton-microscopy>.
146. Stadtmann, A., et al., *The PSGL-1–L-selectin signaling complex regulates neutrophil adhesion under flow*. Journal of Experimental Medicine, 2013. **210**(11): p. 2171-2180.
147. Brown, M. and C. Wittwer, *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology*. Clinical Chemistry, 2000. **46**(8): p. 1221-1229.
148. Jahan-Tigh, R.R., et al., *Flow Cytometry*. Journal of Investigative Dermatology, 2012. **132**(10): p. 1-6.
149. Tonks, N.K., et al., *Demonstration that the leukocyte common antigen (CD45) is a protein tyrosine phosphatase*. Biochemistry, 1988. **27**(24): p. 8695-8701.
150. Broz, M.L. and M.F. Krummel, *The emerging understanding of myeloid cells as partners and targets in tumor rejection*. Cancer immunology research, 2015. **3**(4): p. 313-319.
151. Becher, B., et al., *High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system*. Nature Immunology, 2014. **15**(12): p. 1181-1189.
152. Sunderkötter, C., et al., *Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in Maturation Stage and Inflammatory Response*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(7): p. 4410-4417.
153. Lagasse, E. and I.L. Weissman, *Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes*. Journal of Immunological Methods, 1996. **197**(1): p. 139-150.
154. Drechsler, M., et al., *Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis*. Circulation, 2010. **122**(18): p. 1837-1845.
155. Carayon, P. and A. Bord, *Identification of DNA-replicating lymphocyte subsets using a new method to label the bromo-deoxyuridine incorporated*

- into the DNA*. Journal of immunological methods, 1992. **147**(2): p. 225-230.
156. Lefort, C.T., et al., *Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2012. **119**(18): p. 4275-4282.
 157. Hyduk, S.J., et al., *Paxillin selectively associates with constitutive and chemoattractant-induced high-affinity $\alpha 4\beta 1$ integrins: implications for integrin signaling*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2818-2824.
 158. Nagase, H., et al., *Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils*. Journal of leukocyte biology, 2002. **71**(4): p. 711-717.
 159. Weisel, K.C., et al., *Modulation of CXC chemokine receptor expression and function in human neutrophils during aging in vitro suggests a role in their clearance from circulation*. Mediators of inflammation, 2009. **2009**.
 160. Hogg, N., I. Patzak, and F. Willenbrock, *The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function*. Nature Reviews Immunology, 2011. **11**(6): p. 416-426.
 161. Evans, R., et al., *Integrins in immunity*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 2): p. 215-25.
 162. Kaufmann, S.H. and A. Dorhoi, *Molecular determinants in phagocyte-bacteria interactions*. Immunity, 2016. **44**(3): p. 476-491.
 163. Schwab, L., et al., *Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage*. Nature medicine, 2014. **20**(6): p. 648-654.
 164. Freches, D., et al., *Mice genetically inactivated in interleukin-17 A receptor are defective in long-term control of Mycobacterium tuberculosis infection*. Immunology, 2013. **140**(2): p. 220-231.
 165. Chung, W.-S., et al., *Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways*. Nature, 2013. **504**(7480): p. 394-400.
 166. Nakamura, A., et al., *Increased susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)-deficient mice*. The Journal of experimental medicine, 2003. **197**(5): p. 669-674.
 167. Roger, T., et al., *Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(7): p. 2348-2352.
 168. Triantafilou, K., M. Triantafilou, and R.L. Dedrick, *A CD14-independent LPS receptor cluster*. Nature immunology, 2001. **2**(4): p. 338-345.
 169. Cartwright, G., J. Athens, and M. Wintrobe, *Analytical review: The kinetics of granulopoiesis in normal man*. Blood, 1964. **24**(6): p. 780-803.
 170. Silvestre-Roig, C., A. Hidalgo, and O. Soehnlein, *Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis*. Blood, 2016. **127**(18): p. 2173-81.
 171. Christoffersson, G., et al., *VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2012. **120**(23): p. 4653-4662.
 172. Denny, M.F., et al., *A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs*. The journal of immunology, 2010. **184**(6): p. 3284-3297.
 173. Adrover, J.M., J.A. Nicolás-Ávila, and A. Hidalgo, *Aging: a temporal dimension for neutrophils*. Trends in immunology, 2016. **37**(5): p. 334-345.

174. Nourshargh, S., P.L. Hordijk, and M. Sixt, *Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010. **11**: p. 366.
175. Vestweber, D., *How leukocytes cross the vascular endothelium*. Nature Reviews Immunology, 2015. **15**(11): p. 692-704.
176. Dewey Jr, C., et al., *The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress*. 1981.
177. Green, C.E., et al., *Shear-dependent capping of L-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 by E-selectin signals activation of high-avidity β 2-integrin on neutrophils*. the Journal of Immunology, 2004. **172**(12): p. 7780-7790.
178. Cinamon, G., et al., *Chemoattractant signals and β 2 integrin occupancy at apical endothelial contacts combine with shear stress signals to promote transendothelial neutrophil migration*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(12): p. 7282-7291.
179. Gimbrone Jr, M.A., et al., *Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis a*. Annals of the new york academy of sciences, 2000. **902**(1): p. 230-240.
180. Matsuo, N., et al., *Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains*. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 2010. **4**(29).
181. Zuchriegel, G., et al., *Platelets guide leukocytes to their sites of extravasation*. PLoS biology, 2016. **14**(5): p. e1002459.
182. Reichel, C.A., et al., *Plasmin inhibitors prevent leukocyte accumulation and remodeling events in the postischemic microvasculature*. PloS one, 2011. **6**(2): p. e17229.
183. Allam, R., et al., *Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4*. Journal of the American Society of Nephrology, 2012. **23**(8): p. 1375-1388.
184. Margraf, A., K. Ley, and A. Zarbock, *Neutrophil recruitment: from model systems to tissue-specific patterns*. Trends in immunology, 2019. **40**(7): p. 613-634.
185. Rossaint, J. and A. Zarbock, *Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney*. Journal of innate immunity, 2013. **5**(4): p. 348-357.
186. Kunkel, E.J., et al., *Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and intercellular adhesion molecule 1*. The Journal of experimental medicine, 1996. **183**(1): p. 57-65.
187. Gratzner, H.G., *Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication*. Science, 1982. **218**(4571): p. 474-475.
188. Nowakowski, R., S. Lewin, and M. Miller, *Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population*. Journal of neurocytology, 1989. **18**(3): p. 311-318.
189. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-841.
190. Wojtowicz, J.M. and N. Kee, *BrdU assay for neurogenesis in rodents*. Nature protocols, 2006. **1**(3): p. 1399.
191. Furze, R.C. and S.M. Rankin, *The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse*. The FASEB Journal, 2008. **22**(9): p. 3111-3119.

192. Suratt, B.T., et al., *Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2001. **281**(4): p. L913-L921.
193. von Vietinghoff, S. and K. Ley, *Homeostatic regulation of blood neutrophil counts*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(8): p. 5183-5188.
194. Whyte, M., et al., *Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis*. The Journal of Immunology, 1993. **150**(11): p. 5124-5134.
195. Winterbourn, C.C., A.J. Kettle, and M.B. Hampton, *Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function*. Annu Rev Biochem, 2016. **85**: p. 765-92.
196. Yamamoto, A., et al., *Role of reactive oxygen species in neutrophil apoptosis following ingestion of heat-killed Staphylococcus aureus*. Clin Exp Immunol, 2002. **129**(3): p. 479-84.
197. Tecchio, C., A. Micheletti, and M.A. Cassatella, *Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 508.
198. Matsumoto, H., et al., *The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis*. Scientific reports, 2018. **8**(1): p. 1-11.
199. Kellum, J.A., et al., *Understanding the Inflammatory Cytokine Response in Pneumonia and Sepsis: Results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study*. Archives of Internal Medicine, 2007. **167**(15): p. 1655-1663.
200. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. science, 2004. **303**(5663): p. 1532-1535.
201. Curtis, A., et al., *Circadian Clock Proteins and Immunity*. Immunity, 2014. **40**: p. 178-186.
202. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(5): p. 2731-2738.
203. McCarron, E.P., et al., *Exploring the translational disconnect between the murine and human inflammatory response: analysis of LPS dose-response relationship in murine versus human cell lines and implications for translation into murine models of sepsis*. Journal of inflammation research, 2015: p. 201-209.
204. Born, J., et al., *Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells*. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 1997. **158**(9): p. 4454-4464.
205. Scheiermann, C., et al., *Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues*. Immunity, 2012. **37**(2): p. 290-301.
206. Korneev, K., *Mouse models of sepsis and septic shock*. Molecular Biology, 2019. **53**: p. 704-717.
207. Lewis, A.J., C.W. Seymour, and M.R. Rosengart, *Current murine models of sepsis*. Surgical infections, 2016. **17**(4): p. 385-393.
208. Marshall, J.C. and A. Leligdowicz, *Gaps and opportunities in sepsis translational research*. EBioMedicine, 2022. **86**.
209. Lewis, A.J., J.S. Lee, and M.R. Rosengart, *Translational sepsis research: spanning the divide*. Critical care medicine, 2018. **46**(9): p. 1497.

IX Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl für die Aufnahme an das Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin.

Mein herzlicher Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. vet. Fritz Krombach und Herrn Prof. Dr. med. Christoph Reichel für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe des Walter-Brendel-Zentrums für experimentelle Medizin und die Überlassung dieses hochinteressanten Forschungsthemas.

Das entgegengebrachte Vertrauen, die vorgelebte Begeisterung für experimentelle medizinische Forschung sowie der offene und unterstützende Umgang mit persönlichen Fragen und Problemen schafften ein Umfeld, welches Doktorandinnen und Doktoranden auf ihrem individuellen Karriereweg bestärkte und gleichzeitig einen einzigartigen Zusammenhalt in der Gruppe förderte.

Ganz besonders danke ich auch Herrn Dr. Bernd Uhl, der mich während aller Phasen dieses Projektes hervorragend betreute. Unter großem persönlichem Einsatz wies er mich in die Konzepte des wissenschaftlichen Arbeitens und in die Methoden dieses Forschungsprojektes ein. Nicht nur bei der Planung und Durchführung der Experimente, sondern auch bei jeglichen anderen Fragen stand er jederzeit unterstützend zur Verfügung. Seine Geduld, Kollegialität und sein wissenschaftlicher Ehrgeiz waren mir stets ein Vorbild.

Ebenso gilt mein Dank den anderen Doktorandinnen und Doktoranden der Arbeitsgruppe, Dr. Gabriele Zuchriegel, Dr. Daniel Puhr-Westerheide, Dr. Kariem Sharaf, Dr. Matthias Fabritius, Johanna Schaubächer, Laura Mittmann, Lena Padovan und Constanze Braun sowie den Mitarbeitern Gerhard Adam und Claudia Fahney für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Vor allem möchte ich mich zuletzt von ganzem Herzen bei meiner Frau Anna Polasek, meinen Eltern und bei meiner restlichen Familie für die bedingungslose Unterstützung, das aufgebrachte Verständnis und das Interesse an meiner Arbeit bedanken.

X Publikationen

Aus der Dissertation hervorgegangene Publikation:

Uhl, B., Vadhau, Y., Zuchtriegel, G., Nekolla, K., Sharaf, K., Gaertner, F., Massberg, S., Krombach, F., & Reichel, C. A., *Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response*. *Blood*, 2016 **128**(19): p. 2327–2337.