

**Aus dem
Institut für Chirurgische Forschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl**

**DIE BEDEUTUNG DES
ADHÄSIONSMOLEKÜLS JAM-A SOWIE DER
CHEMOKINREZEPTOREN CCR1, -2 UND -5
FÜR DIE REKRUTIERUNG VON LEUKOZYTEN
BEI ENTZÜNDUNG UND ISCHÄMIE-
REPERFUSION**

DISSERTATION

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

vorgelegt von
Christoph Andreas Reichel
aus München
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Krombach

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Lorenz

Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. G. Kuhnle

Prof. Dr. M. Dichgans

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. A. Khandoga

Dekan:

Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2008

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	7
1.	ENTZÜNDUNG	7
2.	ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN	8
2.1	Ischämie	8
2.2	Reperfusion	9
3.	LEUKOZYTEN	11
3.1	Zellen des unspezifischen Immunsystems bei Entzündung und I/R ...	11
3.1.1	<i>Granulozyten</i>	11
3.1.2	<i>Monozyten</i>	12
3.1.3	<i>Natürliche Killerzellen</i>	13
3.2	Zellen des spezifischen Immunsystems bei Entzündung und I/R	13
3.2.1	<i>T-Lymphozyten</i>	13
3.2.2	<i>B-Lymphozyten</i>	14
3.3	Rekrutierung von Leukozyten	15
3.4	Junctional adhesion molecule-A	17
3.5	Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5	19
II.	ZIELSETZUNG	24
III.	MATERIAL UND METHODEN	25
1.	VORBEMERKUNGEN	25
2.	MODELL	25
2.1	Versuchstiere	25
2.2	Narkose	25
2.3	Chirurgische Technik	26
2.3.1	<i>Chirurgische Präparation des M. cremaster</i>	26
2.3.2	<i>Makrohämodynamik</i>	26
2.3.3	<i>Reversible, globale Ischämie und Reperfusion</i>	26
2.3.4	<i>Intraskrotale Injektion</i>	27

2.3.5	<i>Superfusion</i>	27
2.4	RLOT-Intravitalmikroskopie	27
2.4.1	<i>Technischer Aufbau</i>	27
2.4.2	<i>Quantifizierung der Leukozytenkinetik</i>	28
2.4.3	<i>Mikrohämodynamische Parameter</i>	29
2.5	Systemische Leukozytenzahl	29
2.6	Immunhistochemische und histochemische Färbungen	30
2.6.1	<i>CD45-, Ly-6G- und F4/80-Färbung</i>	30
2.6.2	<i>Toluidinblau-Färbung</i>	30
2.7	Durchflusszytometrische Analyse	31
3.	VERSUCHSPROTOKOLLE	31
3.1	Etablierung eines Modells zur Untersuchung der Rekrutierung von Leukozyten bei I/R	31
3.1.1	<i>Versuchsgruppen</i>	31
3.1.2	<i>Versuchsablauf</i>	32
3.2	Bedeutung von JAM-A für die Leukozytenrekrutierung	33
3.2.1	<i>Versuchsgruppen</i>	33
3.2.2	<i>Versuchsablauf</i>	34
3.3	Bedeutung der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 für die Leukozytenrekrutierung	37
3.3.1	<i>Versuchsgruppen</i>	37
3.3.2	<i>Versuchsablauf</i>	38
4.	STATISTIK	40
IV.	ERGEBNISSE	41
1.	WEITERENTWICKLUNG DES KREMASTERMODELLS ZUR UNTERSUCHUNG DER REKRUTIERUNG VON LEUKOZYTEN BEI I/R	41
1.1	Mittlerer arterieller Blutdruck	41
1.2	Mikrohämodynamik und systemische Leukozytenzahl	42
1.3	Intravitalmikroskopische Befunde	43
1.3.1	<i>Einfluss unterschiedlicher Ischämie- und Reperforationszeiten auf die Leukozytenrekrutierung</i>	43
1.3.2	<i>Leukozytenrekrutierung nach I/R im zeitlichen Verlauf</i>	45
1.3.3	<i>Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten</i>	48

2.	BEDEUTUNG VON JAM-A FÜR DIE REKRUTIERUNG VON LEUKOZYTEN	49
2.1	I/R-induzierte Entzündung	49
2.1.1	<i>Mikrohämodynamik und systemische Leukozytenzahl</i>	49
2.1.2	<i>Intravitalmikroskopische Befunde</i>	50
2.1.3	<i>Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten</i>	53
2.2	IL-1 β -induzierte Entzündung	54
2.2.1	<i>Mikrohämodynamik und systemische Leukozytenzahl</i>	54
2.2.2	<i>Intravitalmikroskopische Befunde</i>	55
2.2.3	<i>Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten</i>	58
2.3	LTB $_4$ -induzierte Entzündung	60
2.3.1	<i>Mikrohämodynamik und systemische Leukozytenzahl</i>	60
2.3.2	<i>Intravitalmikroskopische Befunde</i>	61
2.3.3	<i>Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten</i>	64
3.	BEDEUTUNG DER CHEMOKINREZEPTOREN CCR1, CCR2 UND CCR5 FÜR DIE REKRUTIERUNG VON LEUKOZYTEN ...	65
3.1	Untersuchungen zur Bedeutung von Ccr2 bei MCP-1-induzierter Entzündung	65
3.1.1	<i>Mikrohämodynamik und systemische Leukozytenzahl</i>	65
3.1.2	<i>Intravitalmikroskopische Befunde</i>	66
3.1.3	<i>Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten</i>	68
3.2	Untersuchungen zur Bedeutung von Ccr1 bei MIP-1 α -induzierter Entzündung	70
3.2.1	<i>Mikrohämodynamik und systemische Leukozytenzahl</i>	70
3.2.2	<i>Intravitalmikroskopische Befunde</i>	71
3.2.3	<i>Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten</i>	74
3.3	Untersuchungen zur Bedeutung von Ccr5 bei MIP-1 α -induzierter Entzündung	75
3.3.1	<i>Mikrohämodynamik und systemische Leukozytenzahl</i>	75
3.3.2	<i>Intravitalmikroskopische Befunde</i>	76
3.3.3	<i>Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten</i>	78
3.4	Untersuchungen zur Bedeutung von Ccr1, Ccr2 und Ccr5 bei I/R	80
3.4.1	<i>Mikrohämodynamik und systemische Leukozytenzahl</i>	80
3.4.2	<i>Intravitalmikroskopische Befunde</i>	81
3.4.3	<i>Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten</i>	84
3.4.4	<i>Analyse der Mastzellichte im M. cremaster</i>	85
3.4.5	<i>Chemokinrezeptor-Expression auf neutrophilen Granulozyten</i>	86

V.	DISKUSSION	87
1.	MODELL	87
1.1	Versuchstiere	87
1.2	Versuchsmodell und chirurgische Präparation	88
1.3	Experimentelles Protokoll	89
1.4	Verfahren zur Untersuchung der Leukozytentransmigration	90
1.4.1	<i>RLOT-Intravitalmikroskopie</i>	91
1.4.2	<i>Histochemische und immunhistochemische Färbungen</i>	93
1.5	Durchflusszytometrie	95
2.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	96
2.1	Regulation der Rekrutierung von Leukozyten in das Gewebe	96
2.1.1	<i>Selektine</i>	96
2.1.2	<i>Integrine</i>	98
2.1.3	<i>Immunoglobulin-ähnliche Proteine</i>	99
2.1.4	<i>Junctional adhesion molecules und andere an der Leukozytenrekrutierung beteiligten Moleküle</i>	101
2.2	Weiterentwicklung des Kremastermodells zur Untersuchung der Leukozytenrekrutierung bei I/R	105
2.3	Bedeutung von JAM-A für die Leukozytenrekrutierung	107
2.4	Bedeutung der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 für die Leukozytenrekrutierung bei Entzündung und I/R	115
VI.	SCHLUSSFOLGERUNG	124
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	126
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	128
IX.	DANKSAGUNG	143
X.	PUBLIKATIONEN	145
XI.	LEBENS LAUF	147

I. EINLEITUNG

1. ENTZÜNDUNG

Bereits in der Antike hatte der römische Schriftsteller Aulus Cornelius Celsus die Kardinalsymptome der Entzündung erkannt und sie als Rötung (*Rubor*), Wärme (*Calor*), Schmerz (*Dolor*) und Schwellung (*Tumor*) beschrieben. Als einer der bedeutendsten Vertreter der modernen Medizin ergänzte Rudolf Virchow im vorletzten Jahrhundert den Begriff der Funktionsstörung (*Functio laesa*) (152). Heute weiß man, dass Entzündung ein hochkomplexes Geschehen ist, in welches eine Vielzahl unterschiedlichster Mechanismen involviert ist. Aus pathologischer Sicht wird Entzündung als Anpassungsprozess des lebenden Organismus verstanden, welcher die Schädigung des Organismus durch verschiedenste Noxen unter Beteiligung des Immunsystems abwehren soll.

Die einzelnen Entzündungsformen sind nach Ätiologie, Pathogenese, Ausbreitung und zeitlichem Verlauf durch ein entsprechendes pathologisch-anatomisches Substrat und den daraus resultierenden klinischen Symptomen charakterisiert. In diesem Zusammenhang werden unbelebte ätiologische Faktoren einer Entzündung (mechanische, chemische, thermische, aktinische oder makromolekulare Noxen) von belebten Faktoren wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten unterschieden. Jeder einzelne dieser entzündungsauslösenden Faktoren bringt seine individuelle Pathogenese mit sich. Ferner kann die Entzündungsreaktion auf den Ort der Schädigung begrenzt sein (*lokale* Entzündung), sich aber auch *metastatisch* ausbreiten oder *generalisiert* den gesamten Organismus betreffen. Dem zeitlichen Verlauf entsprechend differenziert man zwischen akuten und chronischen Entzündungsformen (147).

Bei akuten Entzündungen kommt es im betroffenen Gewebe durch eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität zur Exsudation von Flüssigkeit. Auf diese Weise wird die Konzentration der entzündungsauslösenden Noxe vermindert und es können Entzündungsmediatoren an den Ort der Schädigung gelangen. Weiterhin erfolgt eine lokale Verlangsamung des Blutflusses, wodurch der Organismus vor einer Ausbreitung der Noxe geschützt werden soll. Schließlich treten Leukozyten von den postkapillären Venolen in das betroffene Gewebe über und beseitigen gezielt das schädigende Agens (147). Sollte dies nicht gelingen, kann es zur Generalisierung des Entzündungsgeschehens kommen bzw. komplizierende Sekundärerkrankungen auftreten oder aber ein Übergang in eine chronische Entzündungsform erfolgen.

Die Charakterisierung der den einzelnen Entzündungsvorgängen zugrunde liegenden biochemischen und molekularen Prozesse ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Ziel ist es, durch ein wachsendes Verständnis dieser Vorgänge innovative Therapiekonzepte zur Reduzierung der Morbidität und Mortalität von Erkrankungen zu entwickeln, welche durch eine exzessive bzw. fehlgerichtete inflammatorische Antwort hervorgerufen werden. In diesem Zusammenhang sind besonders die entzündlichen Erkrankungen des Darms (M. Crohn, Colitis ulcerosa), der Haut (Psoriasis, Ekzem) und des Nervensystems (Multiple Sklerose, M. Alzheimer) sowie Arteriosklerose, Asthma bronchiale, Rheumatoide Arthritis, juveniler Diabetes, Transplantatabstoßung und der Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) hervorzuheben.

2. ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN

Die temporäre Unterversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie die anschließende Wiederherstellung der Durchblutung eines Gewebes ist die häufigste Ursache für Organversagen bzw. -dysfunktion nach Myokardinfarkt, hämorrhagischem Schock und Transplantation. In der Fachliteratur werden diese, durch funktionelle und morphologische Veränderungen des betroffenen Gewebes charakterisierten Prozesse als I/R-Schaden bezeichnet (105). Aus pathologischer Sicht stellt der I/R-Schaden die Sonderform einer aseptischen Entzündung dar, welche auf einem komplexen Zusammenspiel unterschiedlicher pathophysiologischer Vorgänge basiert.

2.1 Ischämie

Nach Einsetzen der Ischämie nimmt in einem zuvor kontinuierlich perfundierten Gewebe die Sauerstoffkonzentration rapide ab. Der anaerobe Stoffwechsel führt durch die Akkumulation von sauren Valenzen wie Laktat, Protonen und anorganischem Phosphat zur Gewebsazidose. Zusammen mit der Depletion energiereicher Phosphatverbindungen wie Adenosintriphosphat (ATP) und Kreatinphosphat (KP) beeinträchtigt dies auf zellulärer Ebene die Aktivität von energieabhängigen Ionenpumpen (66). Hierdurch verändert sich an der Zellmembran der osmotische Gradient und es resultiert daraus ein Einstrom von freiem H₂O in das Zellinnere (53, 108). Darüber hinaus kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, welcher über die Aktivierung endogener Phospholipasen zu einer direkten Schädigung der Plasmamembran sowie konsekutiv zur Entwicklung eines Membranödems und zur Zellschwellung führt (121). Im weiteren Verlauf kommt es schließlich zu Apoptose

und Nekrose des ischämischen Gewebes. Der Grad der Gewebeschädigung hängt dabei maßgeblich von Ischämiezeit und -temperatur ab (54, 104).

2.2 Reperfusion

Die Wiederherstellung der funktionellen Kapillarperfusion ist primäres Therapieziel bei der Prävention des ischämischen Gewebeschadens. Allerdings wird die Reperfusion des postischämischen Gewebes durch die aus dem Flüssigkeitseinstrom in das Zellinnere resultierende intravasale Konzentration des Blutes erschwert (67, 114). Zusammen mit der ischämischen Endothelzellschwellung sowie den durch die Gewebsazidose veränderten viskoelastischen Eigenschaften der Leukozyten kommt es zu einer Verlegung des Kapillarstromgebiets. Diese Vorgänge haben eine auch nach dem Einsetzen der Reperfusion fortbestehende Ischämie zur Folge und werden als „no-reflow-phenomenon“ bezeichnet (114).

Darüber hinaus werden durch Reperfusion und Reoxygenierung des ischämischen Gewebes Mechanismen aktiviert, welche zusätzlich zu dem bereits bestehenden Ischämieschaden eine weitere funktionelle und strukturelle Schädigung des Gewebes induzieren. Bereits während Ischämie wird ATP über ADP zu Adenosin abgebaut und aufgrund des Sauerstoffmangels nicht wieder zu ATP phosphoryliert, sondern zur Purinbase Hypoxanthin umgesetzt. Bei der Reoxygenierung des Gewebes wird das in der Zelle akkumulierte Hypoxanthin dann mit Hilfe der Xanthinoxidase enzymkatalysiert unter Reaktion mit molekularem Sauerstoff in Xanthin umgewandelt (52). Im Zuge dessen kommt es zu einer massiven Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale, welche die Oxidation von Membranlipiden und anderen Zellbestandteilen zur Folge hat (109).

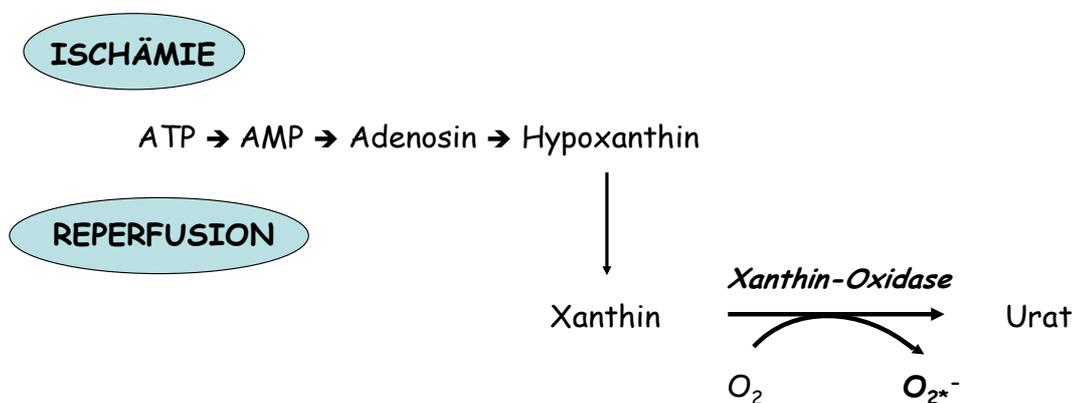


Abb. I/1: Entstehung von Superoxid-Anionen während I/R [nach (22)].

Physiologische Schutzmechanismen gegen diese reaktiven Sauerstoffspezies sind indes durch die Depletion von Superoxid-Dismutase, Gluthathion-Peroxidase und Katalase bereits während der Ischämiephase abgeschwächt (43). Der Verlust der zellulären Integrität führt dabei zu einem Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität und hat die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren im reperfundierten Gewebe zur Folge.

Darüber hinaus aktivieren reaktive Sauerstoffradikale redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder AP-1, welche zusätzlich die Synthese von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen induzieren (107). Diese proinflammatorischen Mediatoren dienen als Signale für die Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten. Aktivierte Thrombozyten verstärken den mikrovaskulären Schaden (78, 87, 103) und tragen zur Leukozytenaktivierung bei (40, 145, 146). Aktivierte Leukozyten akkumulieren in postkapillären Venolen und infiltrieren das postischämische Gewebe, wo sie ihrerseits zahlreiche proinflammatorische Mediatoren, proteolytische Enzyme und reaktive Sauerstoffradikale freisetzen (71, 141).

Diese durch die Reperfusion des postischämischen Gewebes induzierte Verstärkung von Mikrozyklationsstörung und Parenchymzellschaden wird in der Fachliteratur als „reflow-paradox“ beschrieben (113).

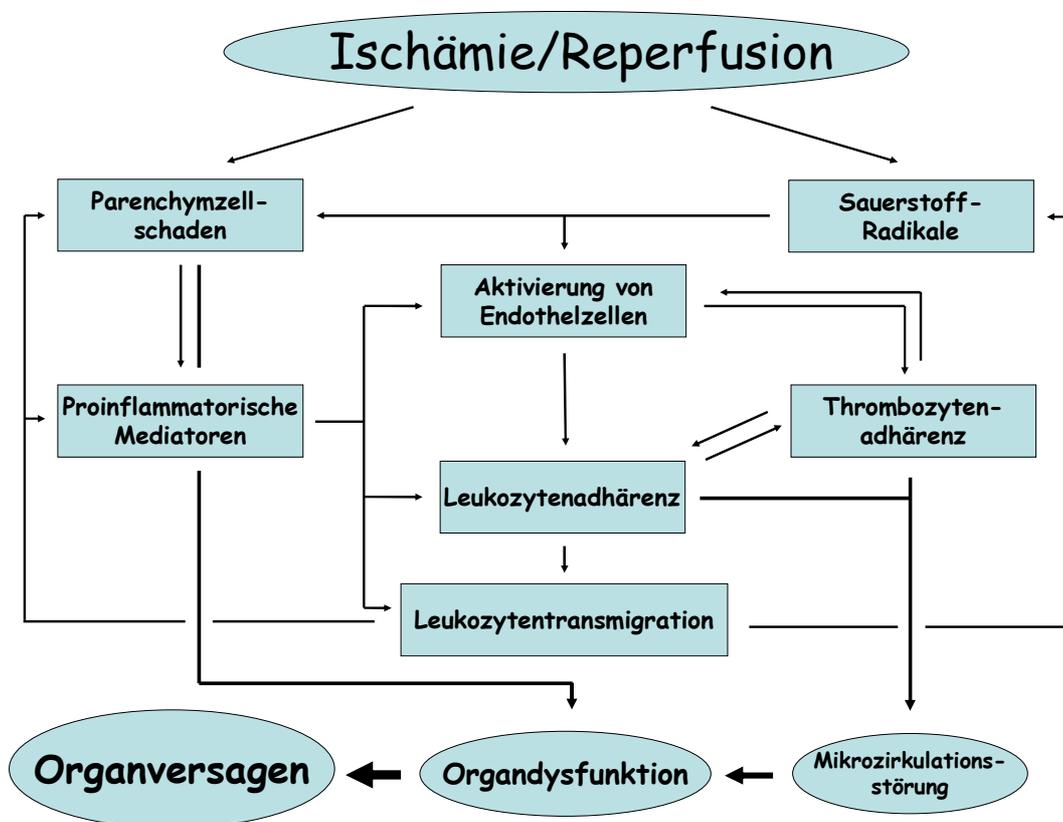


Abb. I/2: Vereinfachte Schemadarstellung relevanter pathophysiologischer Vorgänge bei I/R.

3. LEUKOZYTEN

Leukozyten dienen der Abwehr von belebten und unbelebten Noxen und schützen den Organismus vor genetischen Mutationen, welche z.B. die Entstehung von Tumoren induzieren können. Nach ihrer Bildung und Reifung im Knochenmark und in den lymphatischen Organen zirkulieren Leukozyten im Blut, bevor sie schließlich in das Gewebe auswandern und dort den größten Teil ihrer Aufgaben erfüllen. Überalterte Leukozyten werden in Milz, Leber und Knochenmark abgebaut. Die unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen können nach funktionellen Kriterien entweder dem unspezifischen, angeborenen und phylogenetisch älteren Immunsystem oder dem spezifischen, adaptiven, und phylogenetisch jüngeren Immunsystem zugeordnet werden (35).

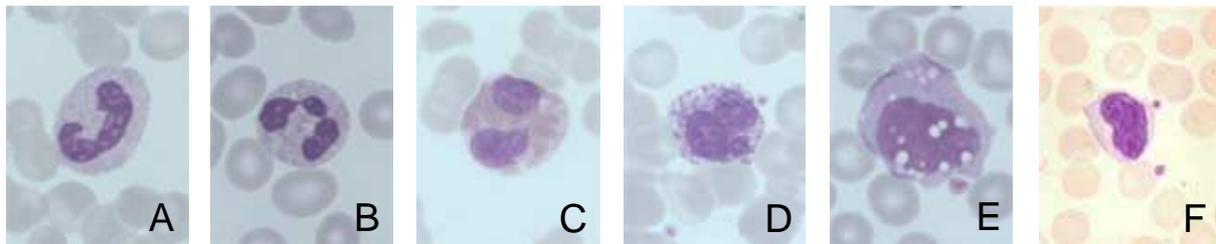


Abb. I/3: Blutausstrich nach Pappenheim: Stabkerniger (A) bzw. segmentkerniger (B) neutrophiler Granulozyt sowie eosinophiler Granulozyt (C), basophiler Granulozyt (D), Monozyt (E) und Lymphozyt (F); (nach www.charite.de).

3.1 Zellen des unspezifischen Immunsystems bei Entzündung und I/R

Die Hauptaufgabe des unspezifischen Immunsystems ist es, in den Organismus eingedrungene Pathogene mit Hilfe unspezifischer Mechanismen unschädlich zu machen. Hierbei spielen sowohl physikalische Faktoren wie z.B. die Haut-Schleimhaut-Barriere als auch humorale Faktoren wie z.B. Magensäure oder Lysozym im Speichel eine wichtige Rolle. Zellulär wird das unspezifische Abwehrsystem durch Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen sowie natürliche Killerzellen repräsentiert (35).

3.1.1 Granulozyten

Granulozyten werden entsprechend der histochemischen Anfärbbarkeit ihrer spezifischen Granula in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten eingeteilt.

Neutrophile Granulozyten lassen sich aufgrund der morphologischen Eigenschaften ihres Zellkerns in jugendliche, stabkernige und reife, segmentkernige Formen aufteilen. Sie sind die ersten Zellen, welche bei einer akuten Entzündungsreaktion zum Ort des Geschehens rekrutiert werden. Neutrophile sind vor allem bei der Abwehr bakterieller Infektionen durch ihr hohes Phagozytosepotential von herausragender Bedeutung (35). Während I/R kommt es zu einer massiven Infiltration des betroffenen Gewebes mit neutrophilen Granulozyten, welche durch die Freisetzung von Zytokinen, proteolytischen Enzymen und reaktiven Sauerstoffradikalen Gewebeschädigung und -zerstörung vermitteln (71, 141). In jüngster Zeit mehren sich allerdings die Hinweise darauf, dass neutrophile Granulozyten über die Phagozytose apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen, die Sekretion antiinflammatorischer Mediatoren und die Aktivierung von Monozyten/Makrophagen auch aktiv zu Heilung und Regeneration des postischämischen Gewebes beitragen (49, 81).

Eosinophile Granulozyten werden durch Bindung von IgE-Antikörpern zur Sekretion basischer Proteine angeregt, welche sowohl der Bekämpfung von Krankheitserregern wie auch der Anlockung weiterer leukozytärer Zellen dienen. Eosinophile Granulozyten besitzen in diesem Zusammenhang funktionelle Relevanz bei der Bekämpfung von Parasiten und sind wesentlich an der Pathogenese von allergischen Reaktionen und Asthma beteiligt (144). Sie scheinen ein nur schwaches Phagozytosepotential zu besitzen und spielen bei I/R keine wesentliche Rolle.

Auch basophile Granulozyten können über die Aktivierung membranständiger IgE-Rezeptoren zur Degranulation angeregt werden und hierbei z.B. das vasoaktive Histamin und das gerinnungshemmende Heparin sezernieren. Sie besitzen funktionelle Relevanz bei der Pathogenese von Asthma, atopischem Ekzem und Heufieber (35).

3.1.2 Monozyten

Monozyten zirkulieren für einige Tage im Blut, bevor sie in die unterschiedlichsten Organe auswandern. Dort differenzieren sie sich zu Makrophagen und nehmen ihre Aufgaben als *Kupffersche Sternzellen* der Leber, als *histiozytäre Retikulumszellen* von Knochenmark, Lymphknoten und Milz, als *Osteoklasten* des Knochens, als *Mesoglia* des Gehirns, sowie als *Peritoneal-* und *Pleuramakrophagen* der entsprechenden serösen Höhlen wahr. Hierbei phagozytieren Makrophagen unspezifisch Antigene und bauen diese intrazellulär durch enzymatische Lyse ab. Ferner sind sie über die Präsentation von Antigenen im Stande, T-Zellen zu aktivieren und stellen somit eine Verbindung mit dem spezifischen Immunsystem her. Darüber hinaus kommt Monozyten bzw. Makrophagen über Rezeption und Sekretion von

Zytokinen eine Vermittlerrolle zwischen unterschiedlichen Zellpopulationen zu. Im Rahmen entzündlicher Prozesse sowie bei I/R wird ihnen durch die Phagozytose apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen entscheidende Bedeutung für Wundheilung und Geweberegeneration zugesprochen (35).

3.1.3 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind in der Lage, Tumorzellen und virusinfizierte Zellen zu eliminieren, welche kein bzw. ein abnormales MHC-I auf ihrer Oberfläche exprimieren (35). Neuere Studien geben Hinweise darauf, dass natürliche Killerzellen auch in die Pathogenese des renalen I/R-Schadens involviert sind (7).

3.2 Zellen des spezifischen Immunsystems bei Entzündung und I/R

Im Gegensatz zum unspezifischen, angeborenen Immunsystem, wirkt das spezifische, adaptive Immunsystem, indem es dem Organismus ermöglicht, zwischen „eigen“ und „fremd“ zu unterscheiden, sehr differenziert. Die spezifische Immunabwehr wird vor allem von T- und B-Lymphozyten unterhalten, welche sich wie Granulozyten und Monozyten von den Stammzellen des Knochenmarks ableiten. Ihre Reifung findet in den primären lymphatischen Organen, Thymus und Knochenmark, statt, einige dieser Zellen wandern in die sekundären lymphatischen Gewebe von Lymphknoten, Milz, Tonsillen und mukosaassoziiertem lymphatischem Gewebe (MALT) ein (35).

3.2.1 T-Lymphozyten

Die Reifung von T-Lymphozyten erfolgt fast vollständig im Thymus. Auf ihrer Oberfläche tragen T-Lymphozyten sog. T-Zell-Rezeptoren, welche sie zur Erkennung von zellgebundenen, durch MHC-Moleküle präsentierte Antigene befähigen. Es werden mehrere Subpopulationen von T-Lymphozyten unterschieden, welche bei der Immunabwehr unterschiedliche Funktionen wahrnehmen (35).

T- Helferzellen exprimieren CD4-Corezeptoren auf ihrer Oberfläche. Sie erkennen Antigene, welche von MHC-II-Molekülen auf Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Lymphozyten präsentiert werden. Durch die Aktivierung unterschiedlicher T-Helferzell-Subtypen kann die Immunantwort in verschiedene Richtungen gelenkt werden.

T_H1-Zellen leiten über eine IFN- γ - und IL-2-vermittelte Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Lymphozyten eine zelluläre Immunantwort ein. Die Aktivierung von T_H2-Zellen hingegen führt über die Ausschüttung von IL-4, -5, -6, und -10 zur Anregung von B-Lymphozyten, welche durch die Bildung von neutralisierenden Antikörpern eine humorale Immunantwort induzieren (35).

Zytotoxische T-Lymphozyten tragen CD8-Corezeptoren und erkennen Antigene, welche ihnen von MHC-I-Molekülen auf kernhaltigen Zellen präsentiert werden. Mit Hilfe unterschiedlicher proteolytischer Enzyme sind sie in der Lage, körperfremde, virusinfizierte oder genetisch veränderter Zellen direkt zu zerstören (5).

Die Bedeutung von T-Suppressorzellen, T-Regulatorzellen und natürlichen Killer-T-Zellen ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass diese Zellen an der Regulation von Immuntoleranz beteiligt sind (68). Auch die Funktion von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten, welche vor allem im lymphatischen Systems des Darms aufzufinden sind, ist nicht eindeutig charakterisiert (50).

Jüngste Untersuchungen belegen, dass T-Lymphozyten auch an der Pathogenese des I/R-Schadens beteiligt sind. In einer aktuellen Studie aus unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass CD4⁺-Lymphozyten nicht aber CD8⁺-Lymphozyten Gewebeschädigung bei hepatischer I/R vermitteln (79).

3.2.2 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten besiedeln nach ihrer Bildung im Knochenmark vor allem die B-Zell-Regionen der lymphatischen Organe. Sie unterscheiden sich von den T-Lymphozyten durch die Anwesenheit von Immunglobulinen auf ihrer Oberfläche, welche sie zur Erkennung von freien Antigenen befähigen. B-Lymphozyten werden als Träger der humoralen Immunantwort angesehen, da sie sich nach ihrer Aktivierung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen entwickeln können. Alternativ differenzieren sich aktivierte B-Zellen auch zu Gedächtniszellen, welche über Jahrzehnte hinweg im Körper persistieren können (35). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass B-Lymphozyten auch bei der Pathogenese des renalen I/R-Schadens wesentlich sind (16).

3.3 Rekrutierung von Leukozyten

Leukozyten verlassen unter bestimmten Umständen wie z.B. bei Entzündungen die Blutbahn und wandern in das Gewebe aus. Dieser fein abgestimmte und kaskadenartig verlaufende Prozess lässt sich in die Schritte Rolling und Adhärenz sowie transendotheliale und interstitielle Migration gliedern (17). Dabei kommt es zu Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen, welche von spezifischen Adhäsionsmolekülen reguliert werden (117, 133, 171). Nach dem initialen Kontakt mit der Gefäßwand, dem sog. *Rolling*, welches durch Selektine und niedrig-affine Integrine vermittelt wird, kommt es zu einer Aktivierung des Leukozyten durch auf dem Gefäßendothel präsentierte Chemokine. *Feste Adhärenz* am Endothel wird daraufhin durch Interaktion leukozytärer Integrine mit endothelialen Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie mediiert.

Während diese frühen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses durch zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien weitgehend aufgeschlüsselt sind, sind die Mechanismen der transendothelialen und interstitiellen Migration unzulänglich geklärt.

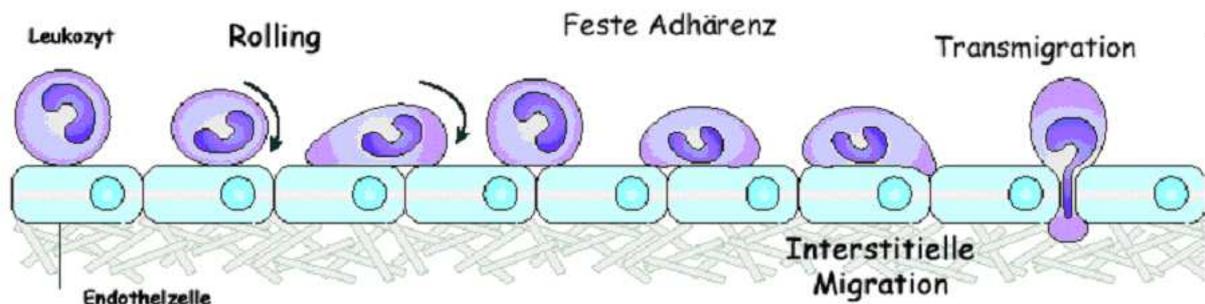


Abb. I/4: Leukozytäre Rekrutierungskaskade [nach (96)].

Morphologische Studien geben Hinweise darauf, dass zwischen 5 und 10 % der emigrierenden Leukozyten, abhängig von Leukozytensubpopulation und Typ der beteiligten Endothelzellen, transzellulär migrieren. Der Großteil der emigrierenden Leukozyten scheint jedoch über interzelluläre Kontakte zwischen Endothelzellen hindurch in das Gewebe auszuwandern und somit den parazellulären Transmigrationsweg zu bestreiten (39, 96).

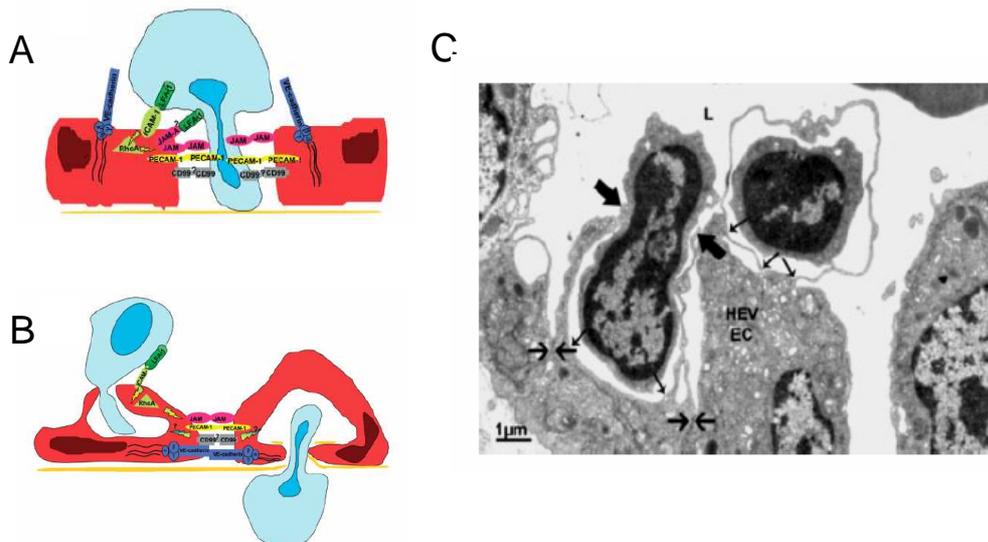


Abb. 1/5: Schemadarstellung der parazellulären (A) und transzellulären (B) Transmigration von Leukozyten. Elektronenmikroskopische Aufnahme zweier transmigrierender Lymphozyten (C; links: transzellulär; rechts: parazellulär) im Lymphknoten der Maus [nach (39)].

Aus der Charakterisierung der am Aufbau der Endothelzellkontakte beteiligten Moleküle ergaben sich potentielle Kandidaten für Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen. Jüngste Untersuchungen geben Hinweise auf die Beteiligung von *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), Mitgliedern der *junction adhesion molecules* (JAMs), CD99, *vascular-endothelial cadherin* (VE-Cadherin), *intercellular adhesion molecule-2* (ICAM-2) sowie *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM) beim Prozess der leukozytären Diapedese (117, 133, 171). Die exakten Mechanismen, welche der Regulation des leukozytären Transmigrationsprozesses *in vivo* durch diese Moleküle unterliegen, sind bislang nicht verstanden, ebenso die Mechanismen der interstitiellen Leukozytenmigration.

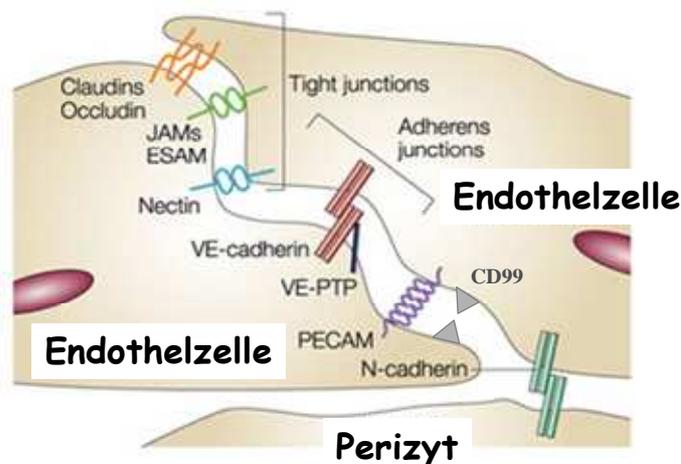


Abb. 1/6: Molekularer Aufbau der Endothelzellkontakte [nach (33)].

3.4 Junctional adhesion molecule-A

In den letzten Jahren sind insbesondere die *junctional adhesion molecules* zum Gegenstand der aktuellen Forschung geworden. Diese Moleküle bilden eine Familie von Transmembran-IgG-Glykoproteinen, welche auf den verschiedensten Zellpopulationen exprimiert werden. Derzeit sind fünf Mitglieder dieser Familie bekannt: JAM-A, -B, -C sowie JAM-4 und JAML (38, 101). JAM-A ist davon das im Gefäßsystem am weitesten verbreitete Molekül, welches sowohl auf der Oberfläche von Endothel- und Epithelzellen wie auch auf Thrombozyten, Erythrozyten und bestimmten Leukozytensubpopulationen exprimiert wird (33). Auf Endothel- und Epithelzellen ist JAM-A im Bereich der *tight junctions* lokalisiert, wo es mit benachbarten Zellen homophile Interaktionen einzugehen scheint (33). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass das β_2 -Integrin LFA-1 und das β_3 -Integrin $\alpha_v\beta_3$ als Liganden für JAM-A fungieren können. Ferner konnte JAM-A auch als Bindungsprotein für das Reovirus identifiziert werden (101).

Die Bedeutung des Moleküls JAM-A für die Transmigration von Leukozyten wurde erstmals im Jahre 1998 von Professor Dejana und Koautoren beschrieben. Es konnte damals gezeigt werden, dass der spezifisch gegen JAM-A gerichtete monoklonale Antikörper (mAB) BV-11 *in vitro* spontane und Chemokin-induzierte Transmigration von Monozyten zu inhibieren vermag (102). Auch *in vivo* konnte BV-11 in Modellen des subkutanen *air pouch* sowie der Zytokin-induzierten Meningitis die Rekrutierung von Leukozyten supprimieren (34, 102). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen hatten JAM-A-Antikörper in weiteren Studien jedoch keine Auswirkungen auf die Leukozytenrekrutierung. So wurde die Transmigration von Leukozyten in einem Flow-chamber-Modell durch BV-11-Antikörper nicht beeinflusst und auch in Modellen der bakteriellen bzw. viralen Meningitis wurde die Leukozyteninfiltration der Meningen nicht verhindert (92, 155).

Weitere Erkenntnisse konnten durch die Generierung von JAM-A-defizienten Mäusen gewonnen werden. In Modellen der Thioglycolat-induzierten Peritonitis sowie des hepatischen und myokardialen I/R-Schadens war in JAM-A-defizienten Mäusen die Rekrutierung von Leukozyten in das untersuchte Gewebe jeweils signifikant vermindert (28, 81). Allerdings brachten diese Studien erneut auch kontroverse Ergebnisse hervor. Untersuchungen mit spezifischen, für endotheliales JAM-A-defiziente Mäuse zeigten, dass endotheliales JAM-A (eJAM-A) die Transmigration von Leukozyten in die reperfundierte Leber, nicht aber in die entzündete Peritonealhöhle und das postschämische Myokard medieren kann (28, 81). Umgekehrt war in den letzteren beiden der genannten Modelle das leukozytäre JAM-A für die Regulation der Leukozytentransmigration verantwortlich (28).

Tab. I/1: Auswirkungen der Blockade von JAM-A unter verschiedenen inflammatorischen Bedingungen [nach (127)].

Modell	Blockade	Auswirkungen	Referenz
Boyden chamber	mAb	Verminderte Monozytentransmigration	(102)
Flusskammer	mAb	Keine Verminderung der Leukozytentransmigration	(155)
Dermatitis	mAb	Verminderte Monozyteninfiltration	(102)
Entzündliche Meningitis	mAb	Verminderte Infiltration von Neutrophilen/ Monozyten	(34)
Virale/Bakterielle Meningitis	mAb	Keine Verminderung der Leukozyteninfiltration	(92)
Peritonitis	genetisch	Verminderte Infiltration von Neutrophilen	(28)
I/R der Leber	genetisch mAb	- Verminderte Infiltration von Neutrophilen - Keine Verminderung der Infiltration von T-Zellen - Regulation durch endotheliales JAM-A - Verstärkter Gewebeschaden	(81)
I/R des Herzens	genetisch	- Verminderte Infiltration durch Neutrophile - Regulation durch leukozytäres JAM-A - Verstärkter Gewebeschaden	(28)
Verzögerte Hypersensitivität	genetisch	Verstärkte Migration von dendritischen Zellen zu Lymphknoten	(21)

Aufgrund dieser kontroversen Daten ist es notwendig, den gegenwärtigen Wissensstand zu JAM-A zu vertiefen.

In jüngster Zeit mehren sich die Hinweise darauf, dass Adhäsionsmoleküle wie z.B. PECAM-1, ICAM-2 und das Integrin $\alpha_6\beta_1$ die Transmigration von Leukozyten stimulus-spezifisch vermitteln (31, 63, 163). Ob auch JAM-A die Leukozytentransmigration in Abhängigkeit vom inflammatorischen Stimulus unterschiedlich reguliert, ist bislang allerdings nicht geklärt. In

der vorliegenden Arbeit soll daher die Bedeutung von JAM-A für den leukozytären Rekrutierungsprozess hinsichtlich einer potentiellen Stimulusspezifität untersucht werden und darüber hinaus die funktionelle Relevanz des endothelialen JAM-A näher charakterisiert werden.

3.5 Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5

Neben Adhäsionsmolekülen wie z.B. JAM-A scheinen auch Chemokine in die Regulation des leukozytären Rekrutierungsprozesses involviert zu sein. Chemokine bilden eine Familie strukturell verwandter chemotaktischer Zytokine. Sie sind kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von 8 bis 14 kDa, welche nach der Konfiguration ihrer N-terminalen Cystein-Residuen in C-, CC-, CXC-, and CX₃C-Chemokine unterteilt werden. Darüber hinaus lassen sich Chemokine nach funktionellen Gesichtspunkten in homöostatische und inflammatorische Chemokine einteilen. Als Interaktionspartner für Chemokine dienen G-Protein-gekoppelte, Peptid-bindende Rezeptoren (143, 184).

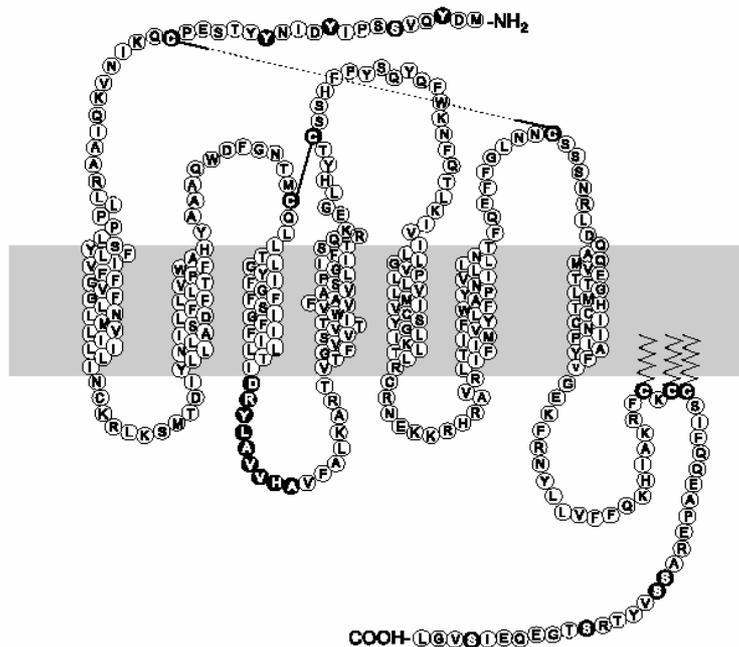


Abb. I/7: Molekularstruktur eines Chemokinrezeptors am Beispiel des Chemokinrezeptors Ccr5 mit einem extrazellulären, N-terminalen Ende, sieben Transmembran-Domänen und einem C-terminalen, zytoplasmatischen Ende [nach (130)].

Gegenwärtig herrscht die Vorstellung, dass leukozytäre Chemokinrezeptoren bei der Extravasation von Leukozyten mit Chemokinen interagieren, welche auf dem Gefäßendothel oder der extrazellulären Matrix an Glykosaminoglycane gebunden präsentiert werden.

Tab. I/2: CXC, C, CX3C Chemokine/Rezeptoren [nach (167)].

Systematische Nomenklatur	Alternative Nomenklatur	Funktion	Rezeptor(en)
CXC Chemokine			
CXCL1	GRO α , KC, MIP-2	I	CXCR2
CXCL2	Gro- β , CINC-2 α	I	CXCR2
CXCL3	Gro- γ , CINC-2 β	I	CXCR2
CXCL4	PF4	I	?
CXCL5	ENA-78	I	CXCR2
CXCL6	GCP-2	I	CXCR1
CXCL7	NAP-2	I	CXCR2
CXCL8	IL-8	I	CXCR1, CXCR2
CXCL9	MIG	I	CXCR3
CXCL10	IP-10	I	CXCR3
CXCL11	I-TAC	I	CXCR3
CXCL12	SDF-1	H	CXCR4
CXCL13	BCA-1	H	CXCR5
CXCL14	Bolekine, BRAK	I	?
CXCL15	Lungkine	H	?
CXCL16	SR-PSOX	?	CXCR6
C Chemokine			
XCL1	Lymphotactin	I	XCR1
XCL2	SCM-1 β	I	XCR1
CX3C Chemokine			
CX3CL1	Fractalkine	I	CX3CR1

Tab. I/2 (Fortsetzung): CC Chemokine/Rezeptoren [nach (167)].

Systematische Nomenklatur	Alternative Nomenklatur	Funktion	Rezeptor(en)
CCL1	I-309, TCA-3	I	CCR8
CCL2	MCP-1	I	CCR2
CCL3	MIP-1 α	I	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 β	i	CCR5
CCL5	RANTES	i	CCR1, CCR3, CCR5
CCL6	?	?	?
CCL7	MCP-3	i	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	i	CCR2, CCR3
CCL9	?	?	?
CCL10	?	?	?
CCL11	Eotaxin	i	CCR3
CCL12	?	?	CCR2
CCL13	MCP-4	I	CCR1, CCR2, CCR3
CCL14	HCC-1, HCC-3	I	CCR1, CCR3
CCL15	HCC-2	I	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4	I	CCR1
CCL17	TARC	h	CCR4
CCL18	DC-CK1	h	?
CCL19	ELC	h	CCR7, CCR11
CCL20	MIP-3 α , LARC	h	CCR6
CCL21	SLC	h	CCR7, CCR11
CCL22	MDC	h	CCR4
CCL23	MIP-3, MPIF-1	i	CCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxin-2	i	CCR3
CCL25	TECK	h	CCR9, CCR11
CCL26	MIP-4 α , Eotaxin-3	?	CCR3
CCL27	CTACK/ESkine	h	CCR10
CCL28	MEC	h	CCR10

Diese Interaktionen setzen wiederum Mechanismen in Gang, welche letztendlich zu fester Adhärenz, Transmigration und Chemotaxis von Leukozyten führen (18, 91, 171). Darüber hinaus wird Chemokinen auch Bedeutung bei der Embryogenese, Hämatopoese und Angiogenese zugesprochen (143).

Bisher konnte gezeigt werden, dass Chemokine und deren Rezeptoren unter den verschiedensten inflammatorischen Bedingungen wie z.B. bei Rheumatoider Arthritis, Asthma oder Glomerulonephritis in verstärkter Masse exprimiert werden (82, 153, 178). Die pharmakologische Inhibition von Chemokinen bzw. Blockade von Chemokinrezeptoren hat sich in verschiedenen Tiermodellen entzündlicher Erkrankungen als viel versprechend erwiesen und befindet sich teilweise bereits in der klinischen Erprobung (23).

In diesem Zusammenhang scheint besonders die Untergruppe der CC Chemokine eine herausragende Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass die Antagonisierung der CC Chemokine *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES), *macrophage inflammatory protein-1 α* (MIP-1 α) und *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) eine verminderte Leukozyteninfiltration des jeweils untersuchten inflammatorisch veränderten Gewebes zur Folge haben (27, 73, 164). Auch die Blockade der CC Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 zeigte eine Verringerung der Leukozytenrekrutierung bei den verwendeten Entzündungsmodellen (15, 62, 98).

In verschiedenen *in vitro*-Assays konnte nachgewiesen werden, dass diese Rezeptoren Adhärenz und Transmigration von Leukozyten mediierten (14, 174). Welche Bedeutung Ccr1, Ccr2 und Ccr5 für den leukozytären Rekrutierungsprozess *in vivo* besitzen, ist bislang unzulänglich untersucht.

Es mehren sich die Hinweise, dass CC Chemokine und ihre Rezeptoren auch in die Pathogenese von I/R involviert sind. Neuere Studien belegen, dass I/R die Expression zahlreicher CC Chemokine wie MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 und RANTES induziert (69, 83). Des Weiteren konnten pharmakologische Interventionen gegen CC Chemokine erste Erfolge bei der Prävention von postischämischem Organversagen und -dysfunktion erzielen. Dabei war die Blockade von MIP-1 α , einem der Hauptliganden des Chemokinrezeptors Ccr1, mit einer signifikant verminderten Leukozyteninfiltration des reperfundierten Lungengewebes assoziiert (83). In Maus-Modellen des renalen I/R-Schadens und der fokalen zerebralen Ischämie war die pharmakologische Blockade der Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 mit einer Verringerung der Leukozyteninfiltration des reperfundierten Gewebes sowie einer Abschwächung des damit einhergehenden postischämischen Organschadens verbunden (45, 160).

Neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten repräsentieren jene Leukozyten-Subpopulationen, welche in besonderer Weise das postischämische Gewebe infiltrieren. Bei der Charakterisierung des Expressionsprofils von Chemokinrezeptoren auf unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen konnte nachgewiesen werden, dass sowohl neutrophile Granulozyten wie auch Monozyten und Lymphozyten unter bestimmten Bedingungen Ccr1, Ccr2 und Ccr5 exprimieren können (24, 64, 70, 131, 159). Die funktionelle Relevanz dieser Chemokinrezeptoren für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in reperfundiertes Gewebe wird jedoch in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert (45, 160). Darüber hinaus ist die Rolle der Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 bei den einzelnen Schritten des leukozytären Rekrutierungsprozesses sowie bei der interstitiellen Leukozytenmigration während I/R noch nicht geklärt. Die Bedeutung des Chemokinrezeptors Ccr1 für die Leukozytenrekrutierung bei I/R ist bislang nicht untersucht.

II. ZIELSETZUNG

Ziele der vorliegenden Studie waren

- 1) die Bedeutung des Moleküls JAM-A für die Transmigration von Leukozyten bei verschiedenen Formen der Entzündung zu untersuchen sowie im Besonderen die Rolle des endothelialen JAM-A zu charakterisieren und
- 2) die Bedeutung der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 für die Rekrutierung von Leukozyten bei Chemokin-induzierter Entzündung sowie bei I/R zu analysieren.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. VORBEMERKUNGEN

Die folgenden Untersuchungen wurden in der Zeit von November 2002 bis Dezember 2005 mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (AZ 209.1/11-2531.3-27/02, AZ 55.2-1-54-2531.3-34-05, AZ 55.2-1-54-2531-19-06, AZ 209.1/211-2531-79/03) am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

2. MODELL

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere für die Etablierung eines Modells zur Untersuchung der Leukozytenrekrutierung bei I/R am *M. cremaster* der Maus dienten männliche Wildtyp (WT) C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Für die Untersuchungen zur Bedeutung des Moleküls JAM-A wurden männliche WT C57BL/6 Mäuse sowie JAM-A-defiziente und endotheliale JAM-A-defiziente Tiere (generiert und zur Verfügung gestellt von Prof. Dejana, Mailand, Italien) verwendet. Zur Untersuchung der Bedeutung der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 bei Chemokin-induzierter Entzündung wurden männliche WT- sowie Ccr1-, Ccr2- und Ccr5-defiziente BALB/c Mäuse bzw. bei I/R männliche WT- sowie Ccr1-, Ccr2- und Ccr5-defiziente C57BL/6-Mäuse (generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. Luckow, München, Deutschland) benutzt.

Die Versuchstiere hatten ein Körpergewicht von 25 bis 35g, wurden bei kontrolliertem Tag-/Nachtzyklus in Gruppen von 3 bis 5 Tieren in Makrolon-Käfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser sowie einem Standardfutter (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland).

2.2 Narkose

Die Versuchstiere wurden unter Spontanatmung mit Ketamin und Xylazin narkotisiert. Durch intraabdominelle Injektion eines Gemisches von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) wurde die Narkose eingeleitet und während des gesamten Versuchsablaufs durch wiederholte Injektionen von Ketamin (100 mg/kg) aufrechterhalten. Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde während der chirurgischen Präparation durch Fixierung auf einer Heizplatte bzw. während der intravitalmikroskopischen Analyse mit Hilfe eines Heizstrahlers bei 37° C konstant gehalten.

Für die intraskrotale Applikation von Zytokinen bzw. Chemokinen erhielten die Versuchstiere eine einminütige Kurznarkose. Die Tiere wurden unter Spontanatmung mit einem Gemisch

aus Isofluran (Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und N₂O bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0,35 narkotisiert. Die Narkose wurde durch Inhalation von 5,0 Vol.% Isofluran eingeleitet und während der intraskrotalen Injektion mit 1,0 – 2,0 Vol.% Isofluran aufrechterhalten.

2.3 Chirurgische Technik

2.3.1 Chirurgische Präparation des *M. cremaster*

Die chirurgische Präparation des *M. cremaster* erfolgte unter Verwendung eines Operationsmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland, 5 – 42-fache Vergrößerung) mit kleineren Modifikationen nach der Erstbeschreibung von Baez (8). Nach Induktion der Narkose (vgl. Kapitel III/2.2) und retrograder Kanülierung der linken *A. femoralis* mit einem Polypropylenkatheter (Innendurchmesser 0,28 mm, Portex, Lythe, Großbritannien), wurde der rechte Hoden durch eine ventrale Inzision des Skrotums freigelegt. Daraufhin wurde der *M. cremaster* mit Hilfe eines Elektrokauters vorsichtig in einer relativ gefäßfreien Zone von ventral eröffnet und anschließend über dem transparenten Podest einer spezialgefertigten Bühne aufgespannt. Nebenhoden und Hoden wurden schließlich vom *M. cremaster* separiert und in die Bauchhöhle zurückgeschoben. Während der chirurgischen Präparation sowie im gesamten Versuchsverlauf wurde der Muskel mit warmer, gepufferter Salzlösung superfundiert.

2.3.2 Makrohämodynamik

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) wurde bei der Etablierung des Modells zur Analyse der Leukozytenrekrutierung während I/R sowie in Vorversuchen im Modell der intraskrotalen Injektion bzw. Superfusion von Chemokinen/Zytokinen über den Katheter in der linken *A. femoralis* gemessen. Dabei wurde der MAP mit Hilfe eines Druckaufnehmers (Statham Transducer Typ P 23 ID, Statham Instruments Inc., Oxnard, USA) und eines Elektromanometers (Press. Ampl. 863E154E, Siemens Medizinische Technik, München, Deutschland) in [mmHg] bestimmt. Aufgrund der in diesen Versuchen nachgewiesenen makrohämodynamischen Stabilität des jeweiligen Modells konnte in weiteren Versuchen auf eine regelmäßige Bestimmung des MAP verzichtet werden.

2.3.3 Reversible, globale Ischämie und Reperfusion

Zur Induktion einer reversiblen, globalen Ischämie des rechten *M. cremaster* wurden alle Gefäße an der Basis des Muskels mit Hilfe einer Gefäßklemme (Martin, Tuttlingen,

Germany) abgeklemmt. Das Sistieren des Blutflusses wurde intravitalmikroskopisch verifiziert. Nach Ablauf der Ischämiezeit wurde die Gefäßklemme wieder entfernt und der Muskel für einen Zeitraum von 130 min reperfundiert. Kontrolltiere (sham-operierte Tiere) wurden nach identischem Protokoll, d.h. nach Gefäßkanülierung und Präparation des rechten *M. cremaster*, operiert und nach kurzfristigem Abklemmen (etwa 3 s) für den jeweiligen Zeitraum der Ischämie sowie für weitere 130 min beobachtet.

2.3.4 Intraskrotale Injektion

Nach Induktion der Kurznarkose (vgl. Kapitel III/2.2) wurden die Versuchstiere in Rückenlage auf einer Heizplatte fixiert. Anschließend erfolgte entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll die intraskrotale Injektion der zu applizierenden Substanz. Die Tiere wurden nach dem Wiedererwachen in Einzelkäfigen gehalten und hatten bis zur chirurgischen Präparation freien Zugang zu Wasser sowie einem Standardfutter (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland).

2.3.5 Superfusion

Zur Induktion einer Entzündung bietet das Kremastermodell neben I/R und intraskrotaler Injektion von Zytokinen bzw. Chemokinen auch die Möglichkeit einer kontinuierlichen Superfusion mit Entzündungsmediatoren. Nach der chirurgischen Präparation erfolgte dabei zunächst eine Analyse der leukozytären Migrationsparameter unter Baseline-Bedingungen. Anschließend wurde durch Zugabe des jeweiligen Entzündungsmediators zum Superfusat die Entzündung induziert.

2.4 RLOT Intravitalmikroskopie

2.4.1 Technischer Aufbau

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Olympus BX 50 Aufrecht-Mikroskop (Olympus Mikroskopie, Hamburg, Germany) durchgeführt, welches für stroboskopische Fluoreszenz-Epiilluminationmikroskopie ausgestattet ist. Licht aus einer 75-W Xenonquelle wurde mit Hilfe eines galvanometrischen Scanners (Polychrome II, TILL Photonics, Gräfelfing, Germany) einem monochromatischen Strahl der Wellenlänge 700 nm angenähert und durch einen Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) Filterblock, welcher mit dichroischen Filtern sowie Emissionsfiltern (DCLP 500, LP515, Olympus Mikroskopie) ausgestattet war, auf das Untersuchungsobjekt gerichtet. Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden mit Hilfe von Wasserimmersionslinsen [Olympus Mikroskopie, 20x/Numerische

Apertur (NA) 0.5 und 40x/NA 0.8], einer analogen schwarz/weiß Videokamera (Cohu 4920, Cohu, San Diego, CA) und einem analogen Videorekorder (AG-7350-E, Panasonic, Tokyo, Japan) aufgenommen. Schräge Illumination des Untersuchungsobjekts wurde dadurch erreicht, dass eine spiegelnde Oberfläche (Reflektor) direkt unterhalb des Untersuchungsobjekts platziert wurde und der Reflexionswinkel des Reflektors relativ zur Horizontalebene gedreht wurde (vgl. Abb. V/2). Der Reflektor bestand aus einem runden Deckglas (Dicke 0,19 – 0,22 mm, Durchmesser 11,8 mm), welches mit einer Aluminiumschicht überzogen war (Freichel, Kaufbeuren, Germany).

Zur Messung der Blutflussgeschwindigkeit wurden grün-fluoreszierende Mikrosphären (0,96 µm Durchmesser, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) über den Katheter in die linke *A. femoralis* injiziert. Die Passage der Mikrosphären durch die zu untersuchenden Gefäßsegmente wurde mit Hilfe eines FITC Filterblocks unter stroboskopischer Illumination (Expositionszeit 1 ms, Zykluszeit 10 ms, Wellenlänge = 488 nm) aufgenommen. Dieses Verfahren ermöglichte es, mehrere Videobilder einer Mikrosphäre mit ausreichendem zeitlichem Abstand (> 80 ms) auf einem Videoframe aufzunehmen. Mikrosphären, welche frei in der Mittellinie eines Gefäßes flossen, wurden zur Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeit benutzt.

2.4.2 Quantifizierung der Leukozytenkinetik

Die off-line Analyse der einzelnen Schritte des leukozytären Extravasationsprozesses erfolgte mit Hilfe der Cap-Image Bildanalysesoftware (Dr. Zeintl, Heidelberg, Germany). Rollende Leukozyten wurden dabei als diejenigen bezeichnet, welche aufgrund von Margination und Endothelzellkontakt im Vergleich zum umgebenden Blutfluss eine langsamere Geschwindigkeit aufwiesen; sie wurden in einem Zeitraum von 30 s quantifiziert.

Als fest adhärenente Zellen wurden Leukozyten bezeichnet, welche länger als 30 s ohne Positionsänderung dem Endothel anhafteten; sie sind auf die Endothelzelloberfläche pro 100 µm Gefäßlänge bezogen angegeben. Die Endothelzelloberfläche wurde aus Gefäßdurchmesser und Länge des untersuchten Segments errechnet, wobei eine zylindrische Geometrie des entsprechenden Gefäßabschnittes angenommen wurde.

Transmigrierte Zellen wurden auf beiden Seiten des Gefäßes in sog. *Regions of Interest* (ROIs) quantifiziert, welche jeweils die Fläche einer Gefäßlänge von 100 µm auf 75 µm bedeckten, und als [$n \times 10^4 \mu\text{m}^2$] angegeben.

Zur Analyse der interstitiellen Leukozytenmigration wurden die jeweiligen ROIs in ein proximales Untersegment direkt am Gefäß mit einer Fläche von 25 x 100 µm und ein

Untersegment distal zum untersuchten Gefäß mit einer Fläche von 50 x 100 µm unterteilt (vgl. Abb. III/1). Die transmigrierten Leukozyten wurden in jedem Untersegment quantifiziert und als Anteil der transmigrierten Leukozyten in der gesamten ROI angegeben. Alle Daten wurden unmittelbar nach der quantitativen Auswertung in die Eingabemasken einer programmierten Datenbank (Excel, Microsoft, Washington, USA) eingegeben, welche die weiteren Berechnungen einschließlich der formatierten Übergabe an die Statistik-Software ermöglichte.

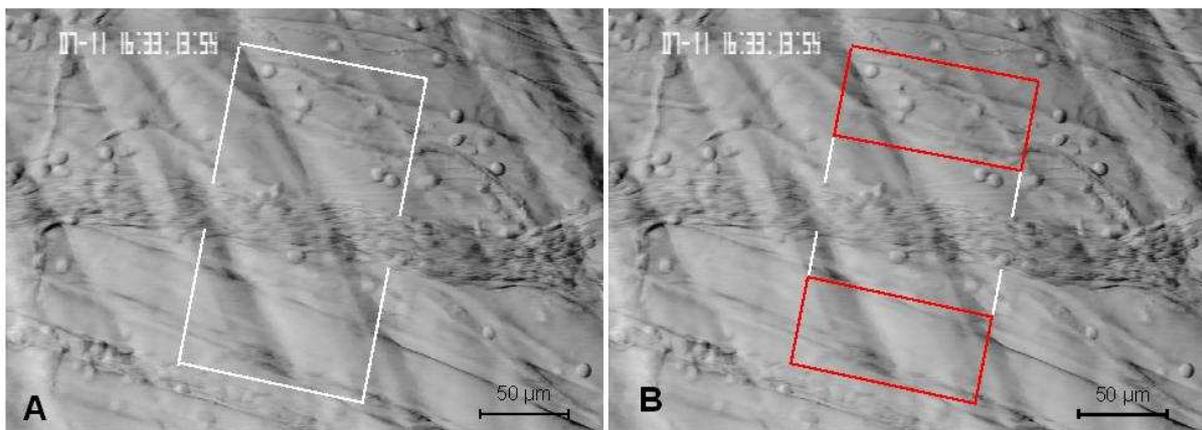


Abb. III/1: RLOT-intravitalmikroskopische Aufnahme einer postkapillären Venole im *M. cremaster* der Maus mit eingezeichneten ROIs: Quantifizierung der Transmigration (A) bzw. interstitiellen Migration (B) von Leukozyten [nach (139)].

2.4.3 Mikrohämodynamische Parameter

Die Blutfließgeschwindigkeit wurde durch die Messung des Abstandes einer Mikrosphäre bestimmt, welche unter stroboskopischer Illumination auf mehreren Bildern aufgenommen wurde. Des weiteren erfolgte in jedem Experiment die Bestimmung des Gefäßinnendurchmessers und zusammen mit der Blutfließgeschwindigkeit wurde unter Annahme einer parabolischen Flussgeschwindigkeitsverteilung über dem Gefäßdurchschnitt die Scherrate errechnet (157).

2.5 Systemische Leukozytenzahl

Um festzustellen, ob die jeweilige Entzündung die Anzahl zirkulierender Leukozyten beeinflusst, wurde am Versuchsende bei allen Tieren die Anzahl der Leukozyten in [$n \times 10^6$

µl] im Vollblut mit Hilfe eines Coulter-Counters (Coulter® AC-T-Serie; Coulter Corporation) bestimmt.

2.6 Immunhistochemische und histochemische Färbungen

Gewebeproben des rechten *M. cremaster* wurden in 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Hilfe eines Mikrotoms geschnitten. Die histologischen Serienschnitte (Schnittdicke ~ 6 µm) wurden anschließend nach unterschiedlichen Protokollen immunhistochemisch bzw. histochemisch gefärbt.

2.6.1 CD45-, Ly-6G- und F4/80-Färbung

Zur Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten, wurde das CD45-Antigen (pan-leukozytär), das Ly-6G-Antigen (Neutrophile Granulozyten) und das F4/80-Antigen (Monozyten/Makrophagen) in Paraffinschnitten immunhistochemisch angefärbt. Die Schnitte wurden entweder mit einem primären Ratte-anti-Maus anti-Ly-6G-, mit einem anti-CD45- (BD Biosciences, San Jose, CA) oder mit einem anti-F4/80- (Serotec, Oxford, UK) Immunglobulin G (IgG)-Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einem kommerziell erhältlichen Immunhistochemie-Kit (Ly-6G und CD45: Super Sensitive Link-Label IHC detection system, BioGenex, San Ramon, CA; F4/80: Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) gefärbt und es wurde eine leicht zu detektierende rötliche bzw. bräunliche Färbung erzielt. In einem letzten Arbeitsschritt wurden die Schnitte mit Mayer's Hämalaun gegen gefärbt (vgl. Abb. V/4). Die Anzahl extravaskulär lokalisierter Ly-6G-, CD45- oder F4/80-positiver Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung auf 10 Gesichtsfeldern pro Schnitt jeweils verblindet quantifiziert. Die Anzahl transmigrierter Ly-6G⁺ Zellen (Neutrophile Granulozyten) und F4/80⁺ Zellen (Monozyten/Makrophagen) ist jeweils als Anteil an allen CD45⁺ Zellen angegeben.

2.6.2 Toluidinblau-Färbung

Zur Analyse der Mastzellichte im *M. cremaster* wurden Paraffinschnitte für 10 min mit 1 % Toluidinblau (Merck, Darmstadt, Germany) inkubiert. Mastzellen konnten daraufhin leicht durch die metachromatische Färbung ihrer Granula identifiziert werden. Die Anzahl Toluidinblau-positiver Mastzellen wurde in 10 Gesichtsfeldern (= 0,09766 mm² bei 400-facher Mikroskopvergrößerung) pro Schnitt verblindet quantifiziert und als Zellen/mm² angegeben.

2.7 Durchflusszytometrische Analyse

Um die Expression der Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 auf nativen neutrophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut der Maus zu untersuchen, wurden monoklonale Antikörper aus der Ratte benutzt. Antikoagulierte Vollblutproben wurden mit 5 µg/ml des Antikörpers MC-21, welcher spezifisch an murines Ccr2 bindet, oder MC-68, welcher spezifisch an murines Ccr5 bindet, für 60 min auf Eis inkubiert (100). Zur Isotyp-Kontrolle wurden Proben mit dem IgG2b (BD PharMingen, San Jose, CA) Antikörper aus der Ratte gefärbt. Zur Identifikation von neutrophilen Granulozyten wurden die Proben auch mit einem Phycoerythrin-markierten CD11b (BD PharMingen) Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen, wurden die Zellen für 60 min mit einem FITC-markierten polyklonalen anti-Ratte Antikörper (Dianova, Hamburg, Germany) auf Eis inkubiert. Nach Lyse der Erythrozyten, wurden die gefärbten Zellen in einem Durchflusszytometer (FACSort, Becton Dickinson, San Jose, CA) analysiert. Neutrophile Granulozyten wurden durch light-scatter Eigenschaften sowie durch die Expression von CD11b identifiziert. Der Trennwert zur Definition Chemokinrezeptor-positiver Zellen wurde entsprechend der Färbung mit dem Isotyp-Kontroll-Antikörper gesetzt. In jeder Analyse wurden ungefähr 20 000 „gegatete“ Ereignisse gesammelt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM angegeben.

3. VERSUCHSPROTOKOLLE

Entsprechend den unter Kapitel II genannten Zielen wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Versuchsprotokolle verwendet.

3.1 Etablierung eines Modells zur Untersuchung der Rekrutierung von Leukozyten bei I/R

3.1.1 Versuchsgruppen

Zur Etablierung eines Modells zur Untersuchung der Leukozytenrekrutierung bei I/R am *M. cremaster* der Maus wurden insgesamt 4 Versuchsgruppen untersucht. Dabei wurden Rolling, Adhärenz und transendotheliale Migration von Leukozyten in schein-operierten WT-Tieren sowie in Versuchsgruppen mit 30, 60 und 90 Minuten Ischämie sowie einer jeweils 120-minütigen Reperfusionphase systematisch analysiert. Da sich in Vorversuchen mit $n = 3$ gezeigt hatte, dass Ischämiezeiten von 60 und 90 min im Vergleich zu 30 min Ischämie keinen weiteren Einfluss auf die Leukozytenrekrutierung haben, wurde darauf verzichtet, alle

Versuchsgruppen in einer Gruppenstärke von n = 6 zu untersuchen. Anschließend wurden in den Versuchsgruppen 1 und 2 Experimente bis n = 6 durchgeführt.

Tab. III/1: Versuchsgruppen zur systematischen Analyse der Leukozytenrekrutierung in Abhängigkeit von Ischämiedauer und Reperfusionzeit.

Gruppe Nr.	Ischämiedauer [min]	Reperfusionsdauer [min]	Tiere
1	sham	150	6
2	30	120	6
3	60	120	3
4	90	120	3

3.1.2 Versuchsablauf

Nach 30-minütiger Operation wurden 3 unabhängige postkapillären Venolen des *M. cremaster* ausgewählt und jeweils zu Baseline-Bedingungen vor Ischämie sowie nach 5, 30, 60, 90 und 120 min Reperfusion die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses analysiert. Im Anschluss daran wurde in den untersuchten Gefäßen die Blutfließgeschwindigkeit bestimmt sowie Gewebe- und Blutproben entnommen. Danach wurden die Tiere durch Injektion von Pentobarbital getötet.

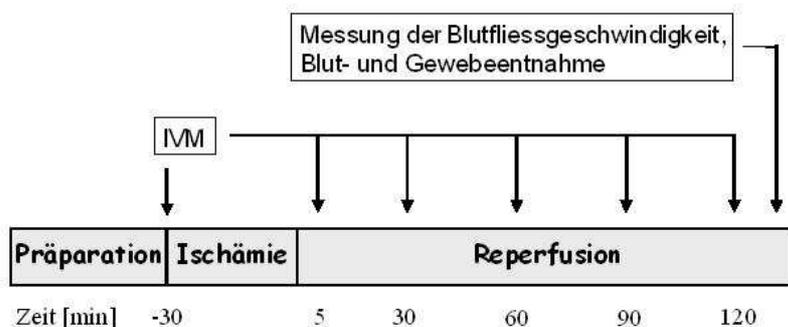


Abb. III/2: Experimentelles Protokoll zur Untersuchung des leukozytären Rekrutierungsprozess in Abhängigkeit von Ischämiedauer und Reperfusionzeit.

3.2 Bedeutung von JAM-A für die Leukozytenrekrutierung

Die Bedeutung des Moleküls JAM-A für die Transmigration von Leukozyten wird aufgrund inkonsistenter Daten in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert (vgl. Tab. I/1). Ziel des zweiten Abschnitts dieser Arbeit war es daher zunächst die Rolle von JAM-A bei der Transmigration von Leukozyten systematisch unter verschiedenen inflammatorischen Bedingungen zu analysieren. Anschließend wurden weitere Untersuchungen angestellt, welche die Funktion des endothelialen JAM-A näher charakterisieren sollten.

3.2.1 Versuchsgruppen

In einer ersten Versuchsreihe wurden die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses am *M. cremaster* von schein-operierten Mäusen sowie von WT-, JAM-A-defizienten und eJAM-A-defizienten Tieren nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion untersucht (n = 6). In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Migrationsparameter sowohl 4 h als auch 24 h nach intraskrotaler Injektion von IL-1 β in WT-, JAM-A-defizienten und eJAM-A-defizienten Tieren analysiert. Gruppen mit intraskrotaler Injektion von *phosphate-buffered saline* (PBS) dienten als Kontrolle (n = 6). Abschließend wurde die Leukozytenmigration in postkapillären Venolen des *M. cremaster* von WT- und JAM-A-defizienten Mäusen während einer 60-minütigen Superfusion von LTB₄ untersucht (n = 6).

Tab. III/2: Versuchsgruppen zu den Untersuchungen zur Bedeutung von JAM-A für die Leukozytenrekrutierung.

Gruppe Nr.	Stimulus	Stimulationsdauer [min]	Intervention	Tiere [n]
1	I/R	30/120	sham	6
2	I/R	30/120	WT	6
3	I/R	30/120	JAM-A-/-	6
4	I/R	30/120	eJAM-A-/-	6
5	NaCl	240	sham	6
6	IL-1 β	240	WT	6
7	IL-1 β	240	JAM-A-/-	6
8	IL-1 β	240	eJAM-A-/-	6
9	NaCl	24 h	sham	6
10	IL-1 β	24 h	WT	6
11	IL-1 β	24 h	JAM-A-/-	6
12	IL-1 β	24 h	eJAM-A-/-	6
13	NaCl	60	WT	6
14	LTB ₄	60	WT	6
15	LTB ₄	60	JAM-A-/-	6

3.2.2 Versuchsablauf

Zur Untersuchung der Bedeutung von JAM-A für die Leukozytentransmigration bei I/R wurden nach der chirurgischen Präparation 3 unabhängige postkapilläre Venolen des *M. cremaster* ausgewählt und jeweils zu Baseline-Bedingungen vor 30-minütiger Ischämie sowie nach 5, 30, 60, 90 und 120 min Reperfusion alle Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses analysiert. Anschließend erfolgte in den zuvor untersuchten Gefäßen die Bestimmung der Blutfließgeschwindigkeit.

In einer weiteren Versuchsreihe erhielten die Tiere eine intraskrotale Injektion von IL-1 β . Nach 4-stündiger (Versuchsgruppen 5 – 8) bzw. 24-stündiger (Versuchsgruppen 9 – 12) Stimulation mit IL-1 β wurden in 5 zufällig ausgewählten und voneinander unabhängigen

postkapillären Venolen des *M. cremaster* die leukozytären Migrationsparameter sowie die Blutfließgeschwindigkeit bestimmt.

In einer letzten Versuchsreihe wurde die Bedeutung von JAM-A bei LTB₄-induzierter Entzündung untersucht. Zu Versuchsbeginn wurde eine postkapilläre Venole ausgewählt und zu den Zeitpunkten -10 und -5 min Baseline-Messungen der Migrationsparameter durchgeführt. Anschließend wurde die physiologische Lösung entfernt und der *M. cremaster* fortan mit einer LTB₄-Lösung superfundiert. Weitere intravitalmikroskopische Messungen erfolgten zu den Zeitpunkten 1, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min nach Induktion der Entzündung. Abschließend wurde die Blutfließgeschwindigkeit bestimmt.

In allen Versuchen wurden nach Messung der Blutfließgeschwindigkeit Gewebe- und Blutproben entnommen. Danach wurden die Tiere durch Injektion von Pentobarbital getötet.

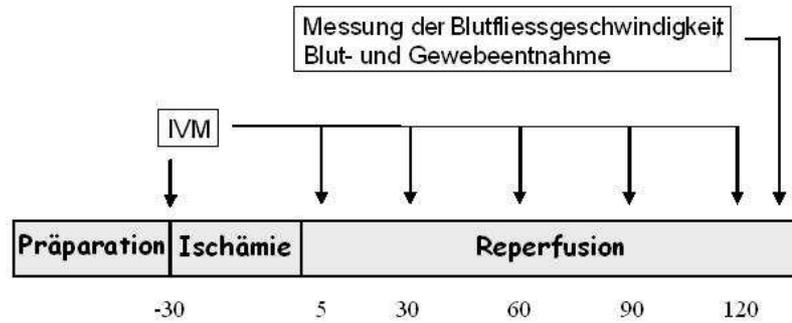
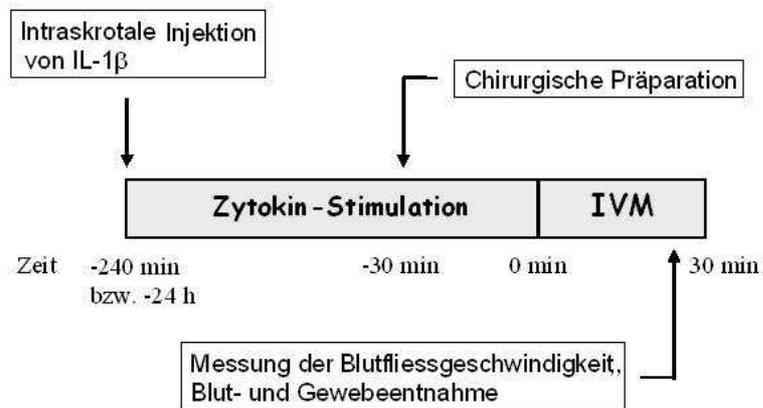
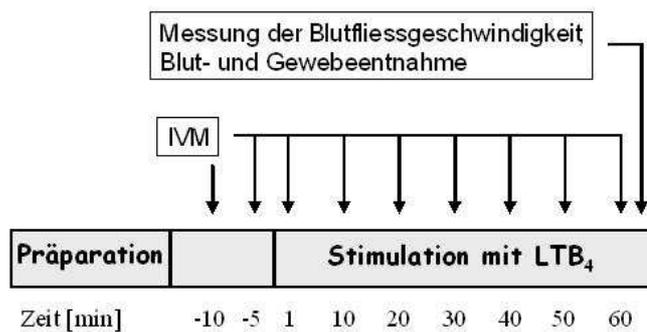
A**B****C**

Abb. III/3: Experimentelles Protokoll zur Untersuchung der Bedeutung von JAM-A für den leukozytären Rekrutierungsprozess bei I/R (A) sowie IL-1 β - (B) und LTB₄- (C) induzierter Entzündung.

3.3 Bedeutung der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 für die Leukozytenrekrutierung

Aus *in vitro* Studien ist bekannt, dass die Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 Adhärenz und transendotheliale Migration von Leukozyten vermitteln. Welche Bedeutung diese Rezeptoren für die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses bei Entzündung und I/R *in vivo* besitzen, war bisher unzulänglich geklärt. Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wurde daher die Bedeutung der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 für die Leukozytenrekrutierung bei Chemokin-induzierter Entzündung und I/R *in vivo* untersucht.

3.3.1 Versuchsgruppen

Insgesamt wurden vier unterschiedliche Versuchsreihen durchgeführt. Im *M. cremaster* von WT- und Ccr2-defizienten Mäusen wurden die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses 3 h nach intraskrotaler Injektion von MCP-1 untersucht. WT-Tiere mit einer intraskrotalen Injektion von physiologischer Natriumchloridlösung (NaCl) dienten als Kontrolltiere (n = 7). Weitere Untersuchungen erfolgten in WT- und Ccr1-defizienten Mäusen sowie in WT-Tieren nach subkutaner Applikation des Ccr1-Antagonisten BX471 (25 mg/kg Körpergewicht) jeweils 3 h nach intraskrotaler Injektion von MIP-1 α (n = 7). Des Weiteren wurden auch Untersuchungen in WT- und Ccr5-defizienten Tieren nach 3-stündiger intraskrotaler Stimulation mit MIP-1 α durchgeführt. WT-Tiere mit einer intraskrotalen Injektion von PBS dienten jeweils als Kontrolle (n = 7). In einer letzten Versuchsreihe wurden die Migrationsparameter im *M. cremaster* von schein-operierten WT-Tieren sowie in WT-, Ccr1-, Ccr2- und Ccr5-defizienten Mäusen nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion analysiert (n = 7).

Tab. III/3: Versuchsgruppen zu den Untersuchungen zur Bedeutung der Chemokinrezeptoren *Ccr1*, *Ccr2* und *Ccr5* für die Leukozytenrekrutierung bei Entzündung und I/R.

Gruppe Nr.	Stimulus	Stimulationsdauer [min]	Tiere [Typ]	Tiere [n]
1	NaCl	180	WT	7
2	MCP-1	180	WT	7
3	MCP-1	180	<i>Ccr2</i> ^{-/-}	7
4	PBS	180	WT	7
5	MIP-1 α	180	WT	7
6	MIP-1 α	180	<i>Ccr1</i> ^{-/-}	7
7	MIP-1 α	180	WT + BX471	7
8	PBS	180	WT	7
9	MIP-1 α	180	WT	7
10	MIP-1 α	180	<i>Ccr5</i> ^{-/-}	7
11	sham	30/120	WT	7
12	I/R	30/120	WT	7
13	I/R	30/120	<i>Ccr1</i> ^{-/-}	7
14	I/R	30/120	<i>Ccr2</i> ^{-/-}	7
15	I/R	30/120	<i>Ccr5</i> ^{-/-}	7

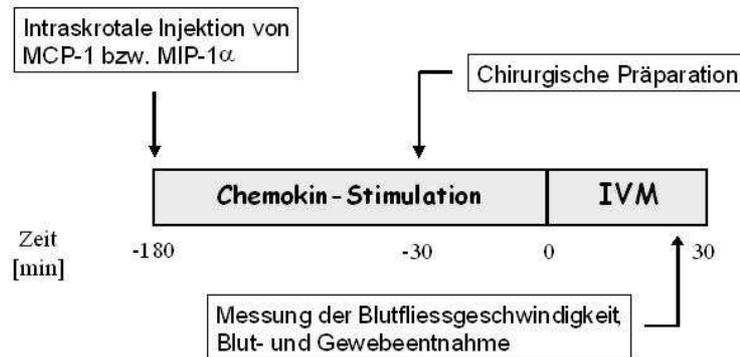
3.3.2 Versuchsablauf

Zur Induktion der Chemokin-induzierten Entzündung erhielten die Versuchstiere eine intraskrotale Injektion von MCP-1 (Versuchsgruppen 2 – 3) bzw. MIP-1 α (Versuchsgruppen 5 – 7, 9 und 10) bzw. entsprechenden Trägerlösungen (Versuchsgruppen 1 und 4). Drei Stunden nach Induktion der Entzündung wurden in 5 zufällig ausgewählten und voneinander unabhängigen postkapillären Venolen des *M. cremaster* die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses analysiert sowie die Blutfließgeschwindigkeit bestimmt. Die Applikation des *Ccr1*-Antagonisten BX471 erfolgte 60 Minuten vor Induktion der Entzündung sowie kurz vor Beginn der chirurgischen Präparation.

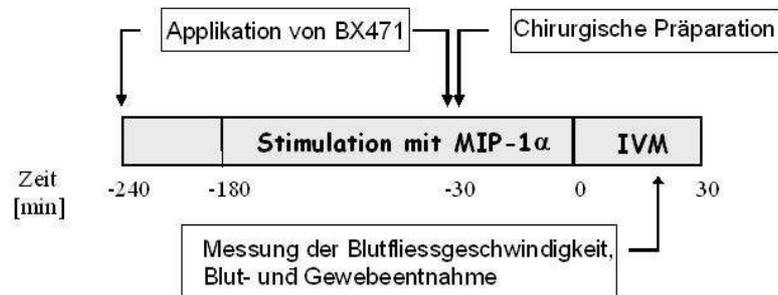
In einer weiteren Versuchsreihe wurden 3 unabhängige postkapilläre Venolen ausgewählt und zu Baseline-Bedingungen vor einer 30-minütigen Ischämiephase sowie nach 5, 30, 60, 90 und 120 min Reperfusion die leukozytären Migrationsparameter untersucht. Danach erfolgte die Bestimmung der Blutfließgeschwindigkeit.

In allen Versuchen wurden nach Messung der Blutfließgeschwindigkeit Gewebe- und Blutproben entnommen. Anschließend wurden die Tiere durch Ausbluten getötet.

A



B



C

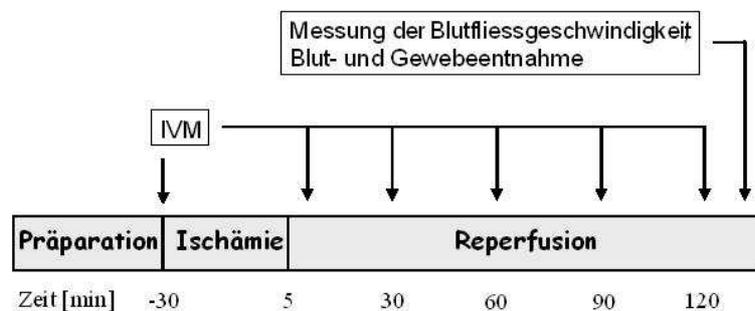


Abb. III/4: Experimentelles Protokoll zur Untersuchung der Auswirkungen von Ccr1-, Ccr2- und Ccr5-Defizienz auf den leukozytären Rekrutierungsprozess (A) bei MCP-1- bzw. MIP-1 α -induzierter Entzündung und (C) I/R, sowie der Effekte des Ccr1-Antagonisten BX471 (B) auf den leukozytären Rekrutierungsprozess bei MIP-1 α -induzierter Entzündung.

3.4 STATISTIK

Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Sämtliche statistischen Analysen wurden unter Verwendung des Software Pakets Sigma Stat TM (Jandel Corporation, St. Rafael, CA, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Rank-Sum-Tests (bei 2 Versuchsgruppen) bzw. dem ANOVA-on-Ranks-Test gefolgt von dem Student-Newman-Keuls-Test (Anzahl der Versuchsgruppen > 2) auf statistische Unterschiede hin überprüft. Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

IV. ERGEBNISSE

1. WEITERENTWICKLUNG DES KREMASTERMODELLS ZUR UNTERSUCHUNG DER REKRUTIERUNG VON LEUKOZYTEN BEI I/R

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollen die Ergebnisse der systematischen Analyse des leukozytären Rekrutierungsprozesses bei I/R in Abhängigkeit von der Ischämie- und Reperusionszeit dargestellt werden.

1.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Bei den schein-operierten Kontrolltieren waren über den gesamten Versuchsverlauf keine signifikanten Änderungen des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) zu beobachten. In allen Versuchsgruppen mit I/R blieb der MAP über den gesamten Beobachtungszeitraum stabil ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Tab. IV/1: Mittlerer arterieller Blutdruck in [mmHg].

Gruppe	sham	30 min Ischämie	60 min Ischämie	90 min Ischämie
Baseline	63,0 ± 2,7	61,3 ± 3,0	67,0 ± 4,5	64,7 ± 4,1
5 min	62,7 ± 2,7	58,7 ± 1,9	62,3 ± 3,8	64,3 ± 5,0
30 min	64,3 ± 3,8	59,3 ± 2,2	63,3 ± 3,5	60,0 ± 1,2
60 min	66,0 ± 5,3	61,7 ± 2,9	63,0 ± 4,7	60,1 ± 2,5
90 min	65,3 ± 2,3	59,0 ± 2,5	59,3 ± 1,2	59,3 ± 2,1
120 min	62,7 ± 2,7	59,0 ± 3,8	57,3 ± 2,3	60,3 ± 1,9

1.2 Mikrohämodynamik und systemische Leukozytenzahl

Da Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen von der Blutfließgeschwindigkeit beeinflusst werden und vom Innendurchmesser des untersuchten Gefäßes abhängig sind, wurden diese mikrohämodynamischen Parameter in jedem Experiment gemessen und daraus die entsprechenden Scherraten errechnet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den I/R-Gruppen gefunden.

Des Weiteren kann auch die systemische Leukozytenzahl Auswirkungen auf einzelne Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozess haben. Deshalb wurde nach jedem Experiment die systemische Leukozytenzahl aus dem Vollblut der Tiere bestimmt. Die Ergebnisse lassen keine signifikanten Unterschiede zwischen schein-operierten Kontrolltieren und Tieren nach I/R erkennen.

Tab. IV/2: Mikrohämodynamische Parameter.

Gruppe	sham	30 min Ischämie	60 min Ischämie	90 min Ischämie
Blutfließ- geschwindigkeit [mm/s]	2,2 ± 0,2	2,4 ± 0,3	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Gefäßinnen- durchmesser [µm]	28,8 ± 1,9	29,5 ± 3,2	32,0 ± 1,1	33,5 ± 1,0
Scherrate [s⁻¹]	633,3 ± 60,0	412,8 ± 84,5	485,2 ± 5,9	425,7 ± 15,6

Tab. IV/3: Systemische Leukozytenzahl in [10⁶ µl].

Gruppe	sham	30 min Ischämie	60 min Ischämie	90 min Ischämie
	2,4 ± 0,5	2,5 ± 0,3	2,1 ± 0,1	3,5 ± 0,6

1.3 Intravitalmikroskopische Befunde

1.3.1 Einfluss unterschiedlicher Ischämie- und Reperfusionzeiten auf die Leukozytenrekrutierung

Zunächst wurde der Einfluss unterschiedlicher Ischämie- und Reperfusionzeiten auf die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozess systematisch mit Hilfe der RLOT-Intravitalmikroskopie untersucht.

Leukozytäres Rolling

Die chirurgische Präparation induzierte in den postkapillären Venolen des Kremastermuskels ein leichtes Leukozytenrollen. Nach einer 30-minütigen Ischämiephase und 60 min bzw. 120 min Reperfusion wurden ähnliche Werte für die Anzahl rollender Leukozyten bestimmt. Eine Verlängerung der Ischämiezeit auf 60 min bzw. 90 min hatte gegenüber 30 min Ischämie zu den entsprechenden Messzeitpunkten keine signifikanten Veränderungen des leukozytären Rolling zur Folge.

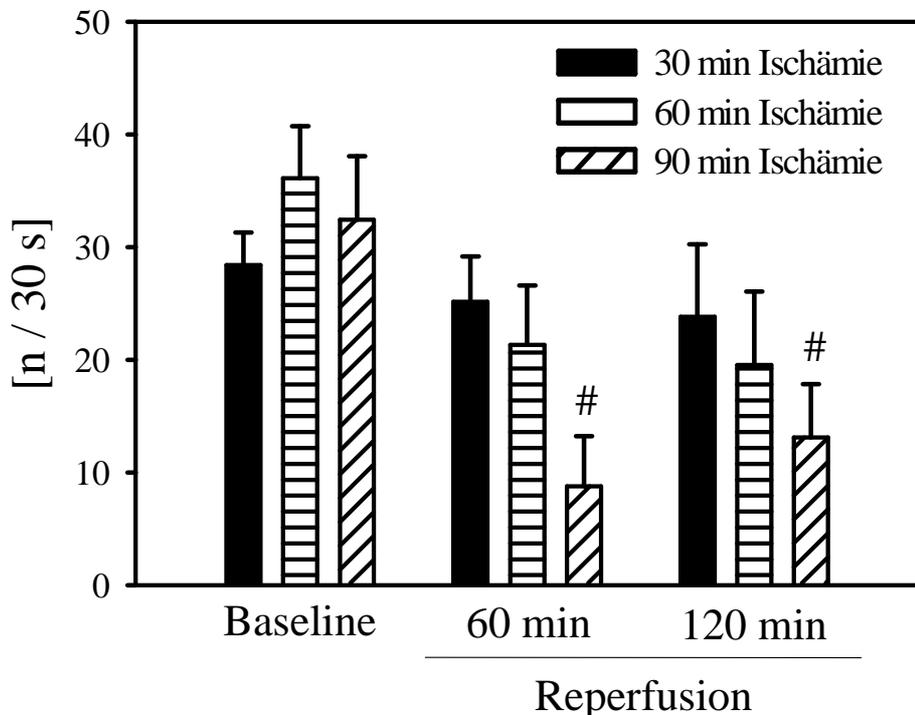


Abb. IV/1: Anzahl rollender Leukozyten unter Baseline-Bedingungen sowie nach 60 und 120 min Reperfusion in Tieren mit 30, 60 und 90 min Ischämie des *M. cremaster* ($n = 3$). $MW \pm SEM$, # $p < 0,05$ vs. entsprechende Baseline-Messung.

Leukozytäre Adhärenz

Nach der chirurgischen Präparation fanden sich nur wenige adhärenente Leukozyten in den postkapillären Venolen des *M. cremaster*. Nach einer Ischämiephase von 30 min sowie 60 min bzw. 120 min Reperfusion hingegen war gegenüber den Ausgangswerten ein signifikanter Anstieg der Leukozytenadhärenz zu beobachten. Längere Ischämiezeiten von 60 min bzw. 90 min brachten im Vergleich zu 30-minütiger Ischämie zu den jeweiligen Messzeitpunkten keine signifikanten Veränderungen der leukozytären Adhärenz mit sich.

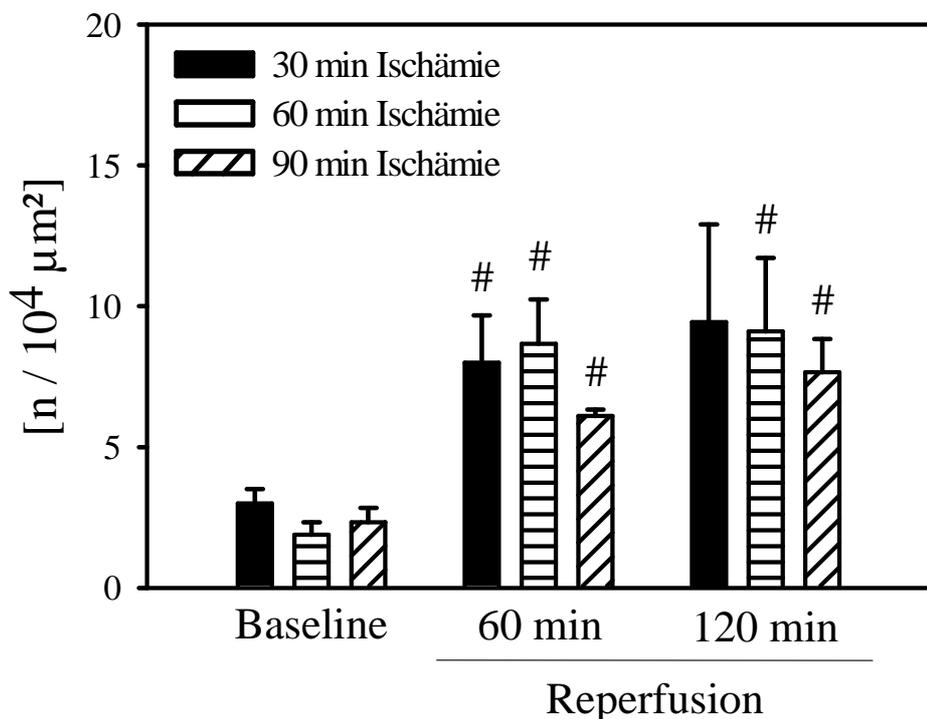


Abb. IV/2: Anzahl adhärenente Leukozyten unter Baseline-Bedingungen sowie nach 60 und 120 min Reperfusion in Tieren mit 30, 60 und 90 min Ischämie des *M. cremaster* ($n = 3$). MW \pm SEM, # $p < 0,05$ vs. entsprechende Baseline-Messung.

Leukozytäre Transmigration

Zur Baseline-Messung wurden nur einige wenige Leukozyten im perivaskulären Gewebe postkapillärer Venolen des *M. cremaster* detektiert. Allerdings kam es nach 30 min Ischämie und 60 min bzw. 120 min Reperfusion zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl transmigrierter Leukozyten. Die Verlängerung der Ischämiezeit auf 60 min bzw. 90 min war im Vergleich zu einer Ischämiezeit von 30 min nach 60 min bzw. 120 min Reperfusion mit keinen signifikanten Veränderungen der Leukozytentransmigration verbunden.

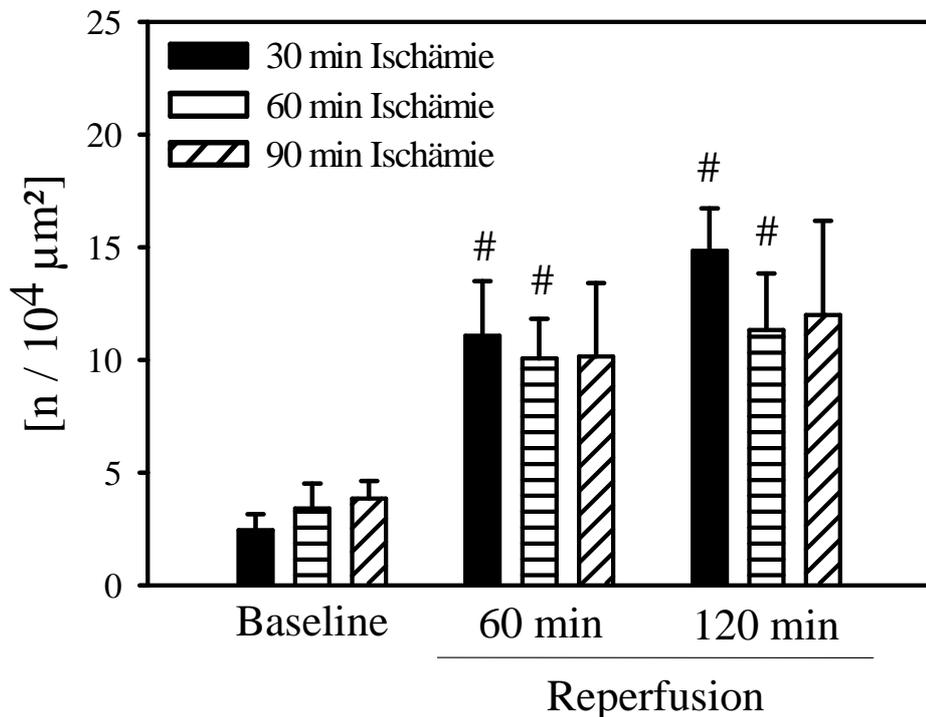


Abb. IV/3: Anzahl transmigrierter Leukozyten unter Baseline-Bedingungen sowie nach 60 und 120 min Reperfusion in Tieren mit 30, 60 und 90 min Ischämie des *M. cremaster* ($n = 3$). $MW \pm SEM$, # $p < 0,05$ vs. entsprechende Baseline-Messung.

1.3.2 Leukozytenrekrutierung nach I/R im zeitlichen Verlauf

Im folgenden Abschnitt soll die quantitative Analyse der einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion im Vergleich zu schein-operierten Tieren dargestellt werden.

Leukozytäres Rolling

Unter Baseline-Bedingungen wurde in schein-operierten Tieren sowie in Tieren mit 30-minütiger Ischämie und 120 min Reperfusion des *M. cremaster* ein leichtes, durch die chirurgische Präparation bedingtes Leukozytenrolling beobachtet. In schein-operierten Kontrolltieren blieb die Anzahl rollender Leukozyten über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg unverändert. Ähnliche Verläufe wurden in der Ischämiegruppe beobachtet.

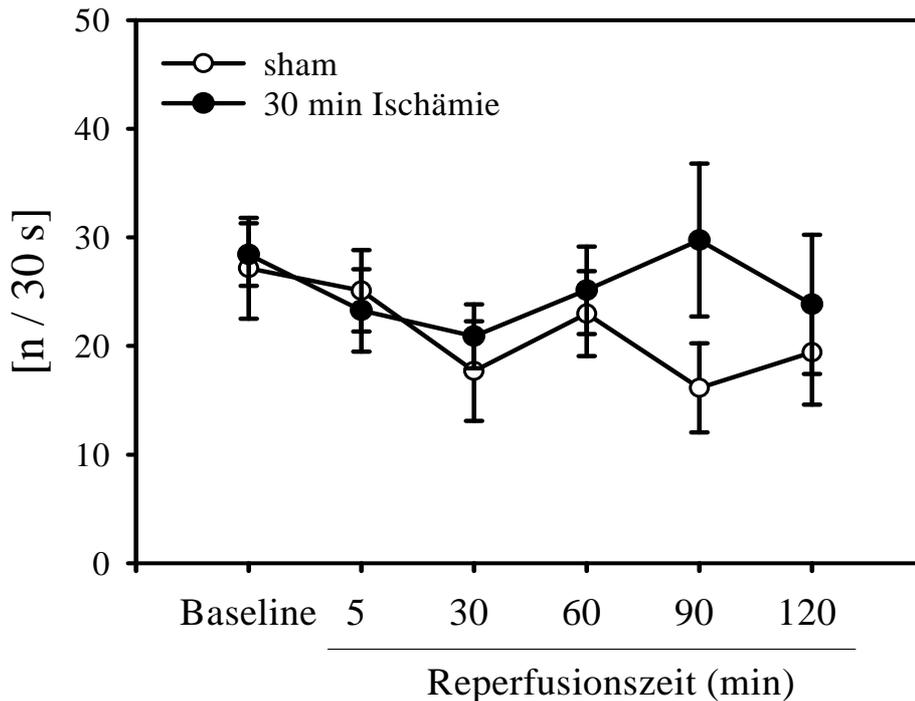


Abb. IV/4: Anzahl rollender Leukozyten unter Baseline-Bedingungen sowie nach 5, 30, 60, 90 und 120 min Reperfusion in schein-operierten Kontrolltieren und Tieren mit 30 min Ischämie des *M. cremaster* ($n = 6$). $MW \pm SEM$.

Leukozytäre Adhärenz

Nach der chirurgischen Präparation waren in den postkapillären Venolen des *M. cremaster* in beiden Versuchsgruppen einige wenige am Gefäßendothel adhärenente Leukozyten zu finden. In den schein-operierten Kontrolltieren war die Anzahl adhärenenter Leukozyten während des gesamten Experiments auf vergleichbarem Niveau. Bereits nach 30 min Ischämie und 5 min Reperfusion war aber im Vergleich zu den Kontrolltieren ein signifikanter Anstieg der Leukozytenadhärenz zu erkennen, welcher im weiteren Versuchsverlauf bei ähnlichen Werten persistierte.

Leukozytäre Transmigration

Transmigrierte Leukozyten wurde in ROIs auf beiden Seiten der untersuchten Gefäßsegmente quantifiziert. Zur Baseline Messung fanden sich in beiden Versuchsgruppen nur wenige Leukozyten im perivaskulären Gewebe. In den Kontrolltieren konnten auch im weiteren Versuchsverlauf keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Leukozyten-transmigration festgestellt werden. Allerdings kam es bereits nach 30 min Ischämie und 30 min Reperfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl transmigrierter Leukozyten.

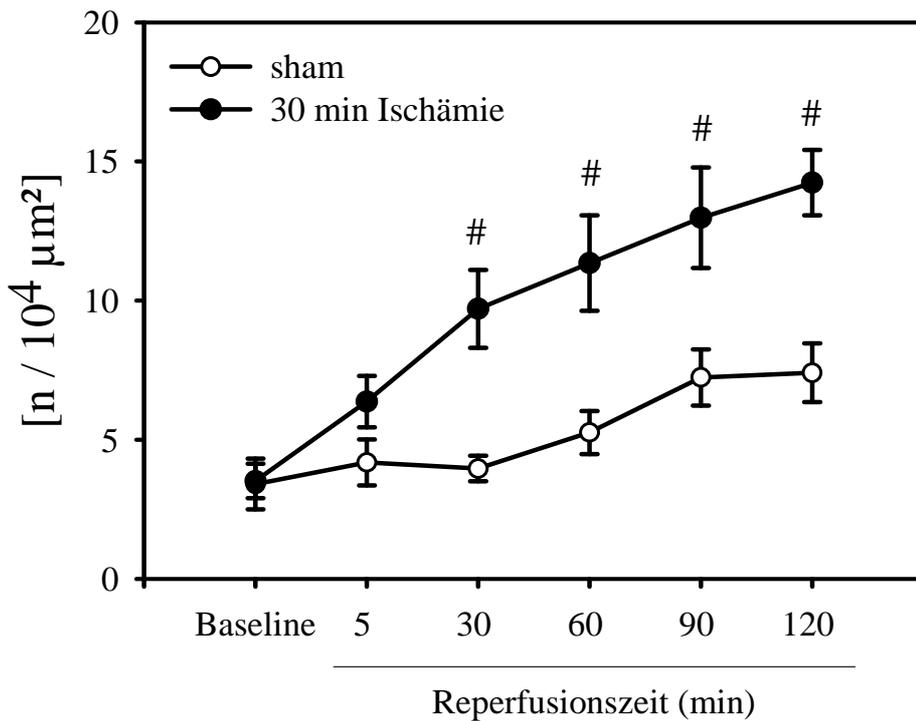
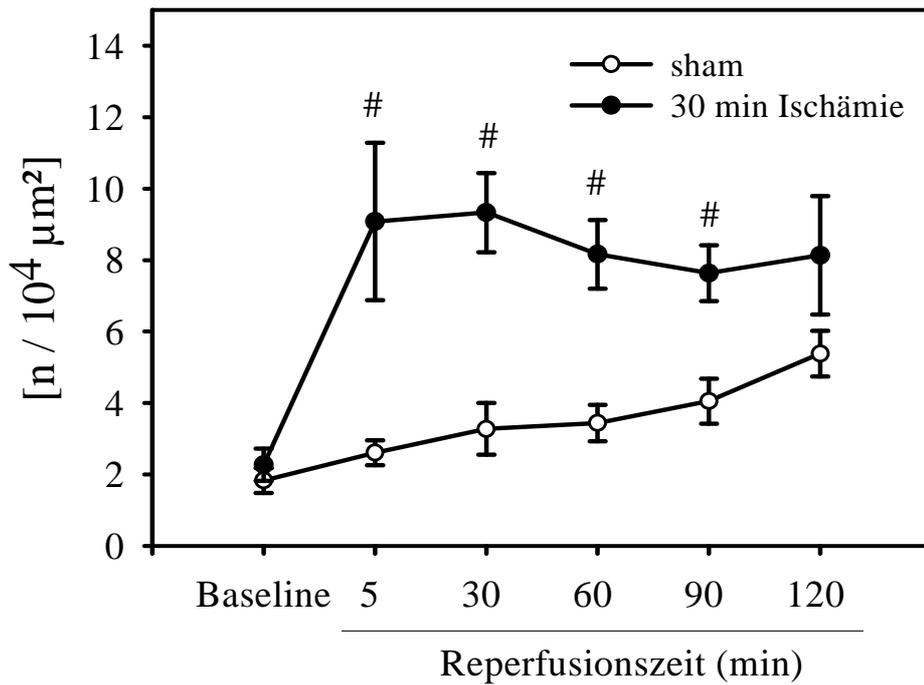


Abb. IV/5: Anzahl adherenter (A) und transmigrierter (B) Leukozyten unter Baseline-Bedingungen sowie nach 5, 30, 60, 90 und 120 min Reperfusion in schein-operierten Kontrolltieren und Tieren mit 30 min Ischämie des *M. cremaster* ($n = 6$). $MW \pm SEM$, # $p < 0,05$ vs. sham.

Interstitielle Leukozytenmigration

Zum Abschluss wurde die interstitielle Verteilung der transmigrierten Leukozyten bestimmt. Hierfür wurden die zur Quantifizierung der Leukozytentransmigration verwendeten ROIs in zwei Subareale unterteilt, eines gefäßnah und eines gefäßfern (vgl. Abb. III/1). Nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion wurden $56,9 \pm 4,2$ % der transmigrierten Leukozyten im gefäßfernen, 25 μm vom Gefäß entfernten Subareal registriert.

1.3.3 Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten

Da die RLOT-Intravitalmikroskopie keine Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten zulässt, wurde eine immunhistochemische Färbung von Gewebeproben des *M. cremaster* vorgenommen. Für neutrophile Granulozyten wurde dabei das Ly-6G-Antigen und für Monozyten/Makrophagen das F4/80-Antigen verwendet. CD45 diente als pan-leukozytärer Marker. Die Ergebnisse zeigen, dass nach 30 min Ischämie und 130 min Reperfusion über 80 % der transmigrierten CD45^+ Leukozyten Ly-6G^+ neutrophile Granulozyten und etwa 10 % F4/80^+ Monozyten/Makrophagen waren.

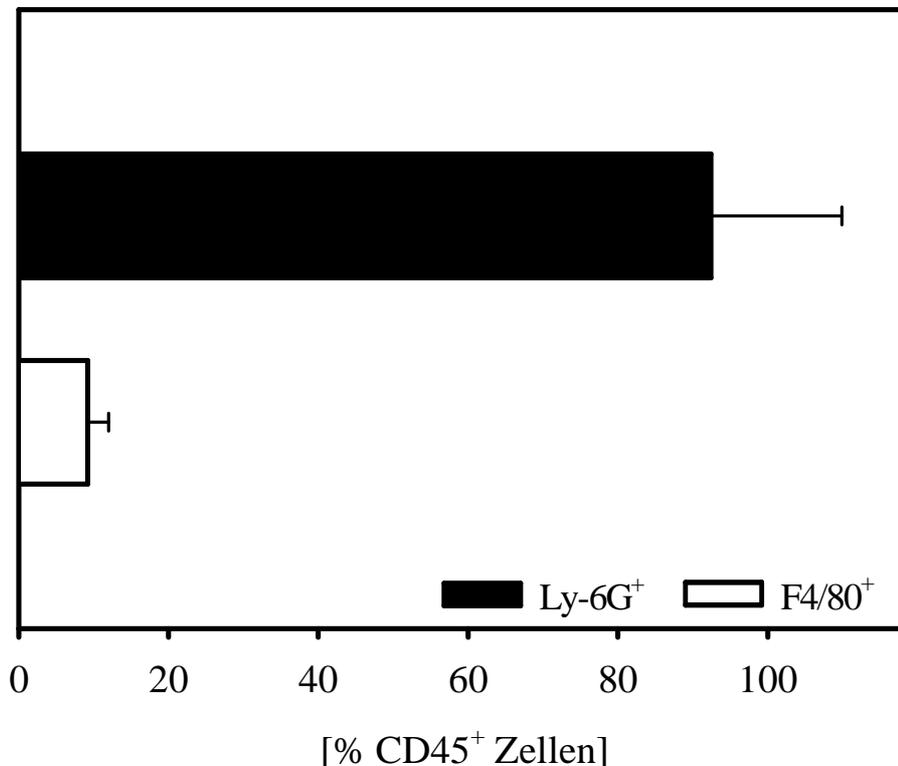


Abb. IV/6: Anteil Ly-6G^+ bzw. F4/80^+ an CD45^+ Zellen nach 30 min Ischämie und 130 min Reperfusion ($n = 3$), $MW \pm SEM$.

2. BEDEUTUNG VON JAM-A FÜR DIE REKRUTIERUNG VON LEUKOZYTEN

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Moleküls JAM-A für die Rekrutierung von Leukozyten systematisch unter unterschiedlichen inflammatorischen Bedingungen untersucht sowie die differentielle Bedeutung des endothelialen JAM-A analysiert.

2.1 Ischämie-Reperfusion

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Bedeutung von JAM-A für die Leukozytenrekrutierung während I/R untersucht.

2.1.1 Mikrohämodynamik und systemische Leukozytenzahl

Um Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsgruppen zu gewährleisten, wurden in den untersuchten Gefäßsegmenten Blutfließgeschwindigkeit und Innendurchmesser bestimmt und daraus die Scherrate berechnet. Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Ferner wurde die systemische Leukozytenzahl im Vollblut der Tiere gemessen. Die Werte sind in allen Versuchsgruppen auf einem vergleichbaren Niveau.

Tab. IV/4: Mikrohämodynamische Parameter.

Gruppe	sham	WT	JAM-A-/-	eJAM-A-/-
Blutfließgeschwindigkeit [mm/s]	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Gefäßinnendurchmesser [µm]	24,8 ± 1,3	25,9 ± 0,5	25,4 ± 0,9	24,4 ± 0,6
Scherrate [s⁻¹]	456,6 ± 55,3	520,0 ± 26,2	529,3 ± 34,2	443,8 ± 26,9

Tab. IV/5: Systemische Leukozytenzahl in [$10^6 \mu\text{l}$].

Gruppe	sham	WT	JAM-A-/-	eJAM-A-/-
	$3,7 \pm 0,5$	$4,9 \pm 0,4$	$4,3 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,8$

2.1.2 Intravitalmikroskopische Befunde

Leukozytäres Rolling

Zu Versuchsbeginn wurde in schein-operierten Tieren ein leichtes Baseline-Rolling registriert, welches sich im weiteren Versuchsverlauf langsam verringerte. Ähnliche Verläufe wurden in WT-, JAM-A-defizienten sowie eJAM-A-defizienten Tieren beobachtet und es konnten zu den gewählten Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden.

Tab. IV/6: Leukozytäres Rolling nach I/R in [$n / 30 \text{ s}$].

Gruppe	sham	WT	JAM-A-/-	eJAM-A-/-
Baseline	$24,8 \pm 2,2$	$27,0 \pm 2,1$	$24,8 \pm 2,4$	$23,4 \pm 2,4$
120 min Reperfusion	$11,5 \pm 2,5$	$20,7 \pm 6,5$	$27,7 \pm 3,1$	$17,7 \pm 4,5$

Leukozytäre Adhärenz

Bei der Baseline-Messung waren in den einzelnen Versuchsgruppen wieder nur wenige adhärenente Leukozyten am Endothel der untersuchten Gefäßsegmente zu erkennen. Während JAM-A-Defizienz nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion keine Auswirkungen auf die Leukozytenadhärenz hatte, war die Anzahl adhärenenter Leukozyten in eJAM-A-Tieren interessanterweise signifikant höher als in schein-operierten WT-Tieren.

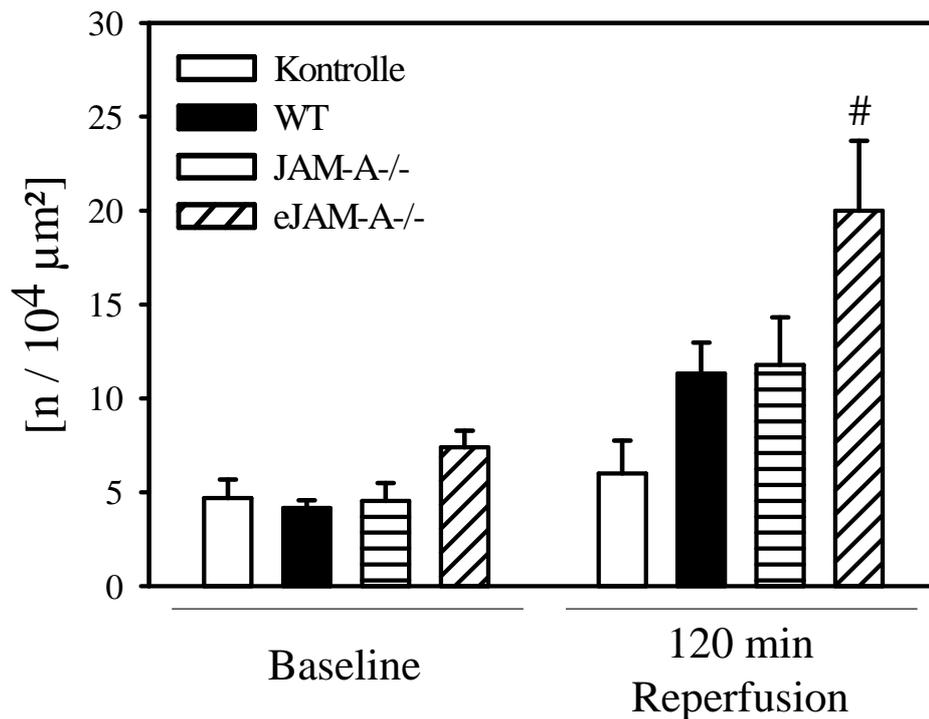


Abb. IV/7: Anzahl adhärenter Leukozyten unter Baseline-Bedingungen sowie nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion ($n = 6$). $MW \pm SEM$, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Leukozytäre Transmigration

Unter Baseline-Bedingungen waren in allen Versuchsgruppen nur vereinzelt Leukozyten im perivaskulären Gewebe der untersuchten postkapillären Venolen zu beobachten. Nach 30-minütiger Ischämie und 120 min Reperfusion hingegen war die Anzahl transmigrierter Leukozyten im Vergleich zu schein-operierten Tieren signifikant erhöht. Dieser Anstieg der leukozytären Transmigration war jedoch sowohl in JAM-A-defizienten Tieren wie auch in eJAM-A-defizienten Tieren signifikant verringert.

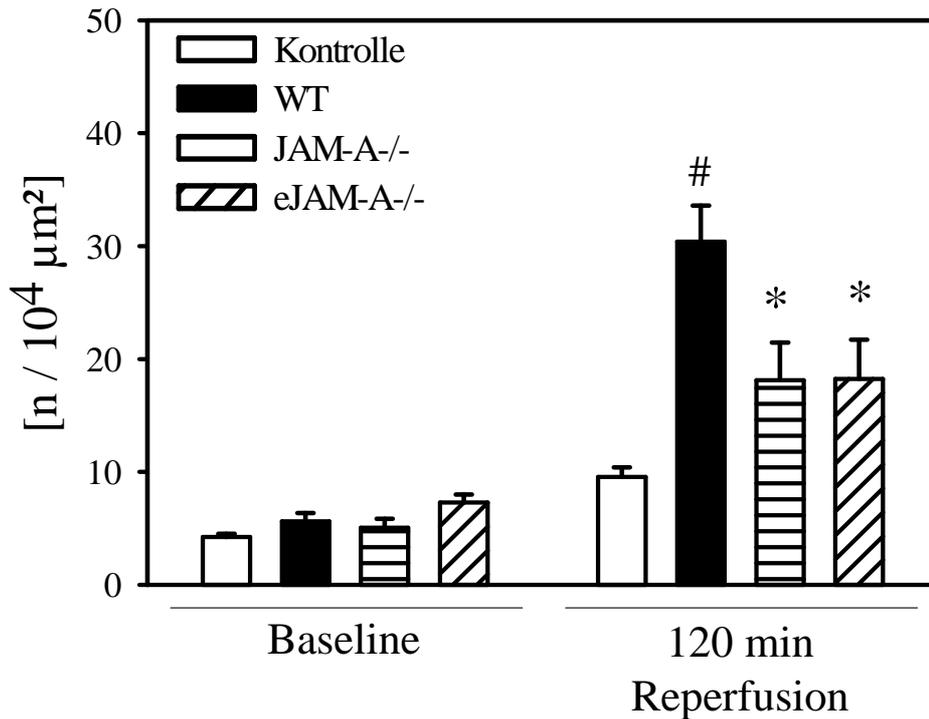


Abb. IV/8: Anzahl transmigrierter Leukozyten unter Baseline-Bedingungen sowie nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion ($n = 6$). $MW \pm SEM$, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. WT.

Interstitielle Leukozytenmigration

Abschließend wurde das interstitielle Migrationsverhalten in bereits beschriebener Weise analysiert. Nach einer Ischämiedauer von 30 min und einer 120-minütigen Reperusionsphase waren in WT-Tieren ca. 60 % der transmigrierten Leukozyten weiter als 25 μm migriert. Ähnliche Werte waren in JAM-A- und eJAM-A-defizienten Tieren zu finden und es konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen detektiert werden.

Tab. IV/7: Interstitielle Verteilung transmigrierter Leukozyten nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion [% transmigrierte Leukozyten $> 25 \mu\text{m}$].

Gruppe	WT	JAM-A-/-	eJAM-A-/-
	$63,2 \pm 3,6$	$68,8 \pm 4,6$	$60,0 \pm 3,0$

2.1.3 Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten

Zur Bestimmung des Phänotyps transmigrierter Leukozyten wurde eine immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten des *M. cremaster* durchgeführt. Nach 30 min Ischämie und 130 min Reperfusion waren etwa 80 % der transmigrierten Leukozyten Ly-6G⁺ neutrophile Granulozyten und etwa 20 % F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen. Es lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen vor.

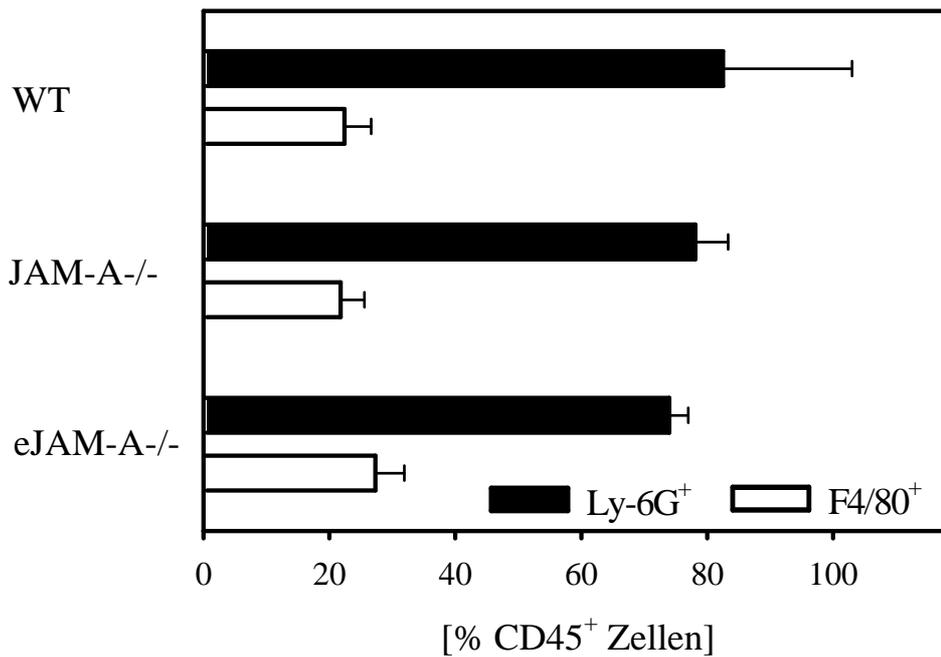


Abb. IV/9: Anteil Ly-6G⁺ bzw. F4/80⁺ an CD45⁺ Zellen nach 30 min Ischämie und 130 min Reperfusion in WT, JAM-A^{-/-} und eJAM-A^{-/-} Tieren (n = 3), MW ± SEM.

2.2 IL-1 β -induzierte Entzündung

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Bedeutung von JAM-A für die Leukozytenrekrutierung sowohl nach 4-stündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation mit IL-1 β untersucht.

2.2.1 Mikrohämodynamik und systemische Leukozytenzahl

Wiederum wurden in den untersuchten Gefäßen die mikrohämodynamischen Parameter bestimmt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Auch die systemische Leukozytenzahl war in allen Versuchsgruppen vergleichbar.

Tab. IV/8: Mikrohämodynamische Parameter.

Gruppe	sham (4 h)	WT (4 h)	JAM-A-/- (4 h)	eJAM-A-/- (4 h)
Blutfließ- geschwindigkeit [mm/s]	1,7 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1
Gefäßinnen- durchmesser [μ m]	23,5 \pm 1,0	25,0 \pm 0,7	24,5 \pm 0,5	25,0 \pm 1,3
Scherrate [s ⁻¹]	570,3 \pm 19,2	483,9 \pm 52,4	373,8 \pm 66,5	406,4 \pm 33,8
Gruppe	sham (24 h)	WT (24 h)	JAM-A-/- (24 h)	eJAM-A-/- (24 h)
Blutfließ- geschwindigkeit [mm/s]	1,3 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1
Gefäßinnen- durchmesser [μ m]	24,5 \pm 0,9	26,1 \pm 0,6	23,9 \pm 0,8	24,3 \pm 0,6
Scherrate [s ⁻¹]	427,3 \pm 51,1	338,6 \pm 26,1	432,4 \pm 32,9	408,6 \pm 47,0

Tab. IV/9: Systemische Leukozytenzahl in [$10^6 \mu\text{l}$].

Gruppe	sham	WT	JAM-A-/-	eJAM-A-/-
4 h	4,1 ± 1,3	3,6 ± 0,4	6,8 ± 0,6	5,7 ± 0,8
24 h	7,1 ± 0,9	9,0 ± 1,0	10,4 ± 1,1	7,6 ± 1,5

2.2.2 Intravitalmikroskopische Befunde

Leukozytäres Rolling

Mit Hilfe der RLOT-Intravitalmikroskopie wurde das leukozytäre Rolling in den postkapillären Venolen des *M. cremaster* zunächst 4 h nach intraskrotaler Injektion von IL-1 β analysiert. In Kontrolltieren war ein leichtes, durch die chirurgische Präparation des *M. cremaster* bedingtes Leukozytenrolling zu beobachten. Auch nach 4-stündiger Stimulation mit IL-1 β war die Anzahl rollender Leukozyten in WT-, JAM-A-/- und eJAM-A-/- Tieren gegenüber der Kontrollgruppe auf vergleichbarem Niveau und es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Darüber hinaus wurde das Leukozytenrolling in weiteren Versuchsgruppen zum Zeitpunkt 24 h nach intraskrotaler Injektion von IL-1 β untersucht. Es konnten hierbei ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolltieren sowie WT-, JAM-A-defizienten und eJAM-A-defizienten Tieren gefunden werden.

Tab. IV/10: Leukozytäres Rolling nach Stimulation mit IL-1 β in [$n / 30 \text{ s}$].

Gruppe	Kontrolle	WT	JAM-A-/-	eJAM-A-/-
4 h	16,4 ± 1,0	9,3 ± 3,8	12,5 ± 3,5	10,0 ± 2,8
24 h	18,3 ± 2,3	24,0 ± 2,3	26,7 ± 2,3	25,9 ± 2,4

Leukozytäre Adhärenz

Am Endothel postkapillärer Venolen wurden in Kontrolltieren nur wenige, permanent adhärenente Leukozyten detektiert. Im Vergleich dazu war die Anzahl adhärenenter Leukozyten nach 4-stündiger Stimulation mit IL-1 β in WT-, JAM-A-defizienten und eJAM-A-defizienten Tieren signifikant erhöht. Nach 24-stündiger Stimulation mit IL-1 β hingegen waren keine Unterschiede mehr zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu erkennen.

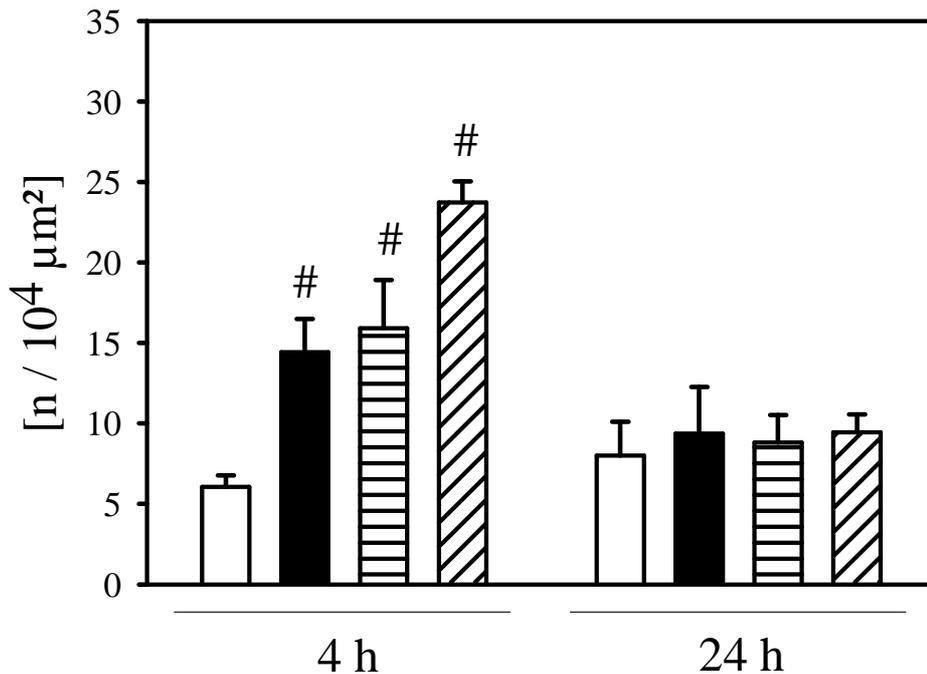


Abb. IV/10: Anzahl adhärenenter Leukozyten unter Kontrollbedingungen sowie nach 4- bzw. 24-stündiger intraskrotaler Stimulation mit IL-1 β . MW \pm SEM, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Leukozytäre Transmigration

Wie bei der Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen wurde die leukozytäre Transmigration zunächst 4 h nach intraskrotaler Injektion von IL-1 β untersucht. Die Anzahl transmigrierter Leukozyten war in WT-Tieren signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu war jedoch die Leukozytentransmigration in JAM-A-defizienten Tieren statistisch signifikant vermindert. Auch in eJAM-A-defizienten Mäusen war die Anzahl transmigrierter Leukozyten im Vergleich zu WT-Tieren signifikant geringer. In weiteren Versuchen wurde die Transmigration von Leukozyten nach 24-stündiger Stimulation mit IL-1 β bestimmt. Auch hier war die Anzahl transmigrierter Leukozyten in WT-Tieren gegenüber

der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Während dieser Anstieg in JAM-A-defizienten Mäusen erneut signifikant vermindert war, konnten zu diesem Beobachtungszeitpunkt zwischen WT- und eJAM-A-defizienten Tieren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl transmigrierter Leukozyten festgestellt werden.

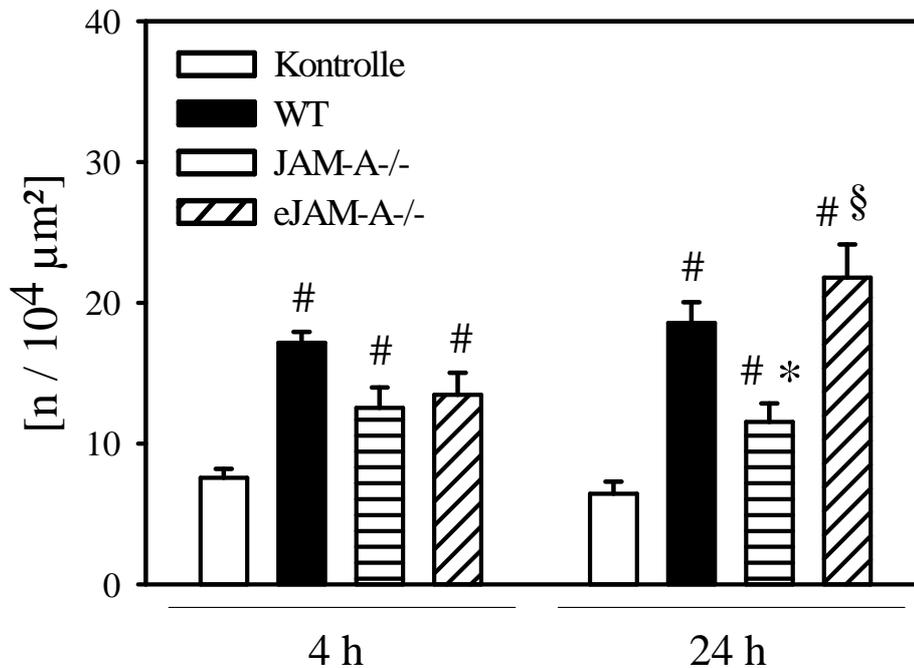


Abb. IV/11: Anzahl transmigrierter Leukozyten unter Kontrollbedingungen sowie nach 4- bzw. 24-stündiger intraskrotaler Stimulation mit IL-1 β . MW \pm SEM, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. WT, § $p < 0,05$ vs. JAM-A-/-.

Interstitielle Leukozytenmigration

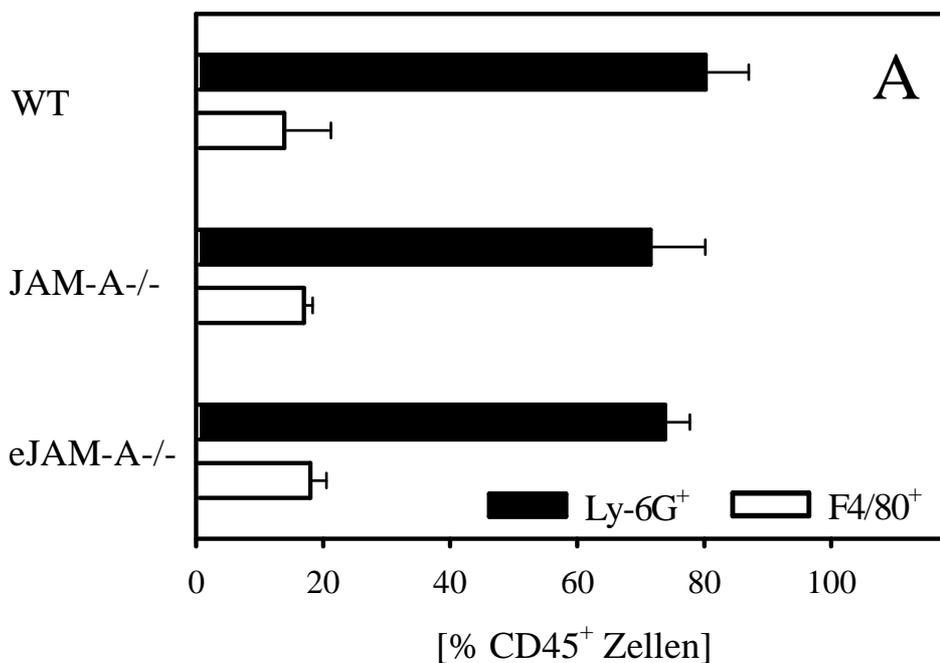
Zur Analyse des interstitiellen Migrationsverhaltens transmigrierter Leukozyten wurde deren Gewebeverteilung sowohl 4 h als auch 24 h nach intraskrotaler Injektion von IL-1 β untersucht. Nach 4-stündiger Stimulation mit IL-1 β waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu erkennen. Nach 24-stündiger Stimulation hingegen waren in JAM-A-defizienten Tieren signifikant weniger Leukozyten im gefäßfernen Areal (> 25 μ m Abstand vom Gefäß) zu beobachten als in WT- und eJAM-A-defizienten Tieren.

Tab. IV/11: Interstitielle Verteilung transmigrierter Leukozyten nach Stimulation mit IL-1 β in [% transmigrierte Leukozyten > 25 μ m]. MW \pm SEM, # $p < 0,05$ vs. WT, * $p < 0,05$ vs. eJAM-A-/-.

Gruppe	WT	JAM-A-/-	eJAM-A-/-
4 h	65,0 \pm 1,4	66,3 \pm 1,9	61,5 \pm 2,1
24 h	65,5 \pm 1,1	56,0 \pm 2,0 ^{#*}	66,2 \pm 1,7

2.2.3 Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten

Die immunhistochemische Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten ergab, dass in WT-Tieren nach 4-stündiger bzw. nach 24-stündiger Stimulation mit IL-1 β ca. 70 – 80 % der transmigrierten Leukozyten Ly-6G⁺ neutrophile Granulozyten und etwa 20 % F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen waren. Ähnliche Werte wurden jeweils in JAM-A-/- sowie eJAM-A-/- Mäusen bestimmt.



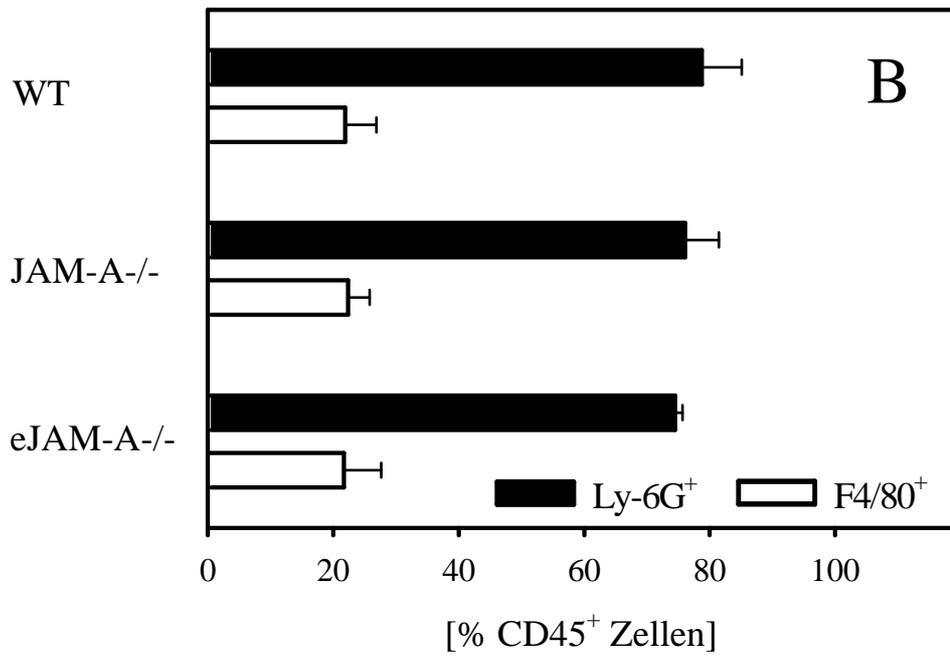


Abb. IV/12: Anteil Ly-6G⁺ bzw. F4/80⁺ an CD45⁺ Zellen nach 4- (A) bzw. 24-stündiger (B) Stimulation mit IL-1 β in WT, JAM-A^{-/-} und eJAM-A^{-/-} Tieren (n = 3), MW \pm SEM.

2.3 LTB₄-induzierte Entzündung

In einer letzten Versuchsreihe wurde die Bedeutung von JAM-A für die Leukozytenrekrutierung bei LTB₄-induzierter Entzündung untersucht.

2.3.1 Mikrohämodynamik und systemische Leukozytenzahl

Bei der Bestimmung von Blutfließgeschwindigkeit, Gefäßinnendurchmesser und Scherrate lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen vor. Die systemische Leukozytenzahl war in WT-Tieren und JAM-A-defizienten Tieren vergleichbar.

Tab. IV/12: Mikrohämodynamische Parameter.

Gruppe	sham	WT	JAM-A-/-
Blutfließgeschwindigkeit [mm/s]	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Gefäßinnendurchmesser [µm]	24,8 ± 0,8	27,7 ± 2,0	28,6 ± 1,7
Scherrate [s ⁻¹]	472,9 ± 44,3	365,0 ± 22,8	347,7 ± 35,3

Tab. IV/13: Systemische Leukozytenzahl in [10⁶ µl].

Gruppe	sham	WT	JAM-A-/-
	3,4 ± 0,6	3,9 ± 0,8	4,1 ± 0,9

2.3.2 Intravitalmikroskopische Befunde

Leukozytäres Rolling

In allen Versuchsgruppen war zu den Baseline-Messungen 5 min vor Induktion der Entzündung mit LTB₄ ein leichtes Leukozytenrolling in den postkapillären Venolen des *M. cremaster* zu erkennen. Sowohl in WT-Tieren als auch in JAM-A^{-/-} Tieren fiel die Anzahl rollender Leukozyten nach Induktion der Entzündung stetig ab. Im gesamten Beobachtungszeitraum konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden.

Tab. IV/14: Leukozytäres Rolling nach Stimulation mit LTB₄ in [n / 30 s].

Gruppe	sham	WT	JAM-A ^{-/-}
Baseline	24,5 ± 4,8	26,3 ± 1,8	24,5 ± 3,0
60 min	9,5 ± 1,8	6,5 ± 2,9	10,0 ± 3,4

Leukozytäre Adhärenz

Nach der chirurgischen Präparation waren wiederum nur wenige adhärenente Leukozyten am Gefäßendothel zu erkennen. Die Superfusion von LTB₄ induzierte in den postkapillären Venolen von WT-Tieren einen steilen Anstieg der Anzahl adhärenenter Leukozyten. Auch in JAM-A^{-/-} Tieren kam es im Versuchsverlauf zu einer Erhöhung der Leukozytenadhärenz, welche nach 60-minütiger Stimulation mit LTB₄ sogar signifikant stärker war als jene in WT-Tieren.

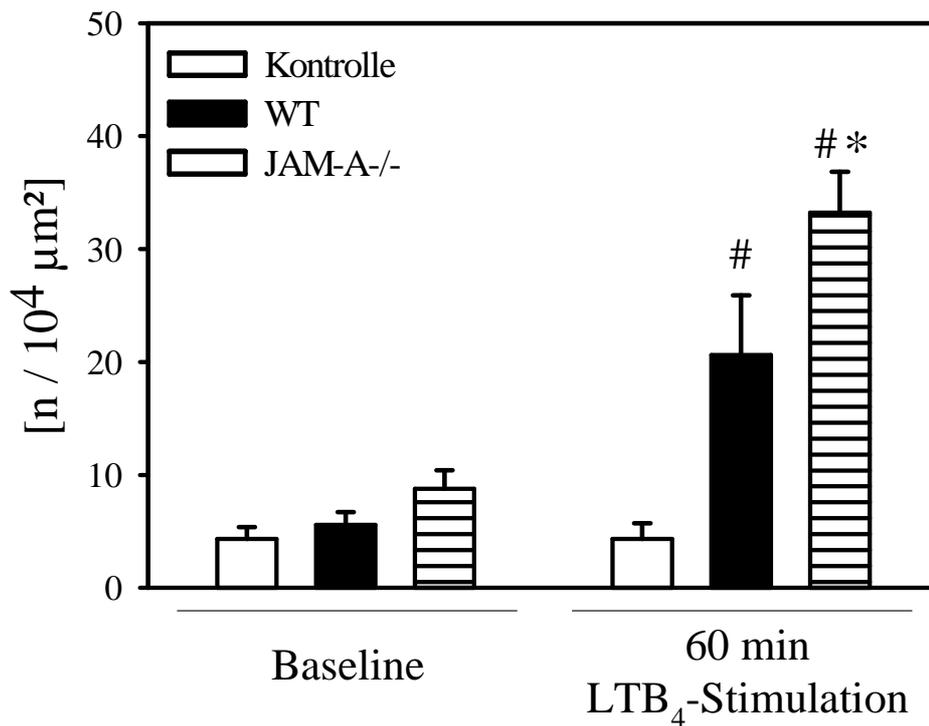


Abb. IV/13: Anzahl in postkapillären Venolen adhärenter Leukozyten unter Baseline-Bedingungen sowie nach 60-minütiger Stimulation mit LTB₄. MW ± SEM, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. WT.

Leukozytäre Transmigration

Zur Baseline-Messung wurden in allen Versuchsgruppen nur einige wenige Leukozyten im interstitiellen Gewebe registriert. In WT-Tieren hatte die Induktion der Entzündung mit LTB₄ einen stetigen Anstieg der Anzahl transmigrierter Leukozyten zur Folge und erreichte nach 60 min mehr als das 5-fache des Ausgangswertes. In JAM-A-defizienten Tieren wurden ähnliche Verläufe beobachtet, ohne dabei signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festzustellen.

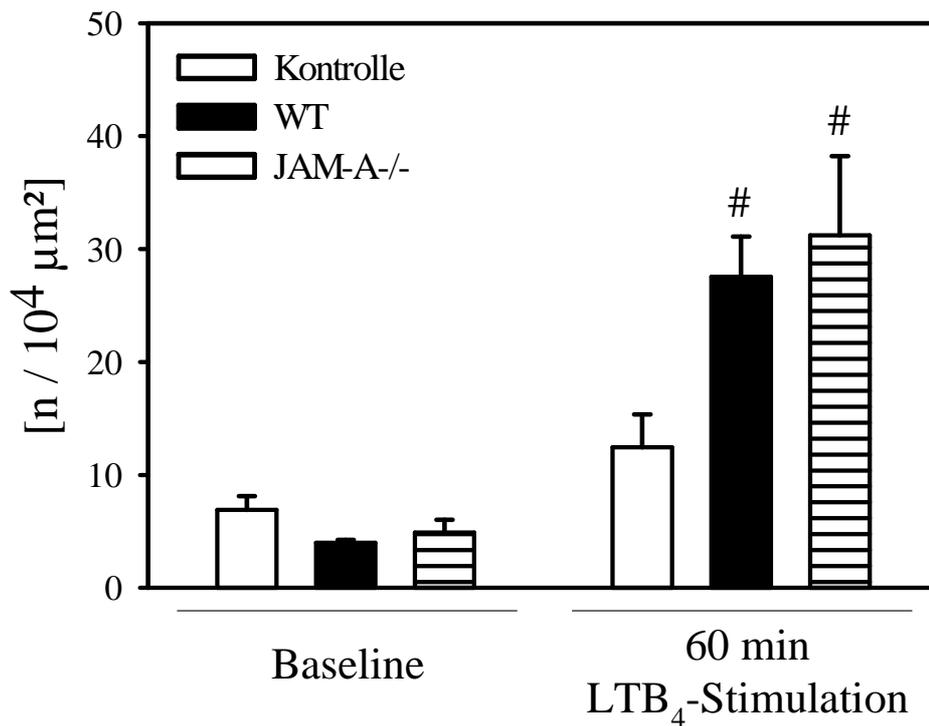


Abb. IV/14: Anzahl transmigrierter Leukozyten unter Baseline-Bedingungen sowie nach 60-minütiger Stimulation mit LTB₄. MW ± SEM, # *p* < 0,05 vs. Kontrolle.

Interstitielle Leukozytenmigration

Um die Auswirkungen einer JAM-A-Defizienz auf die Migration von Leukozyten im interstitiellen Gewebe bei LTB₄-induzierter Entzündung untersuchen zu können, wurde die Gewebeverteilung transmigrierter Leukozyten analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass in JAM-A-/- Mäusen signifikant weniger transmigrierte Leukozyten im gefäßfernen Areal (> 25 μm Abstand vom Gefäß) aufzufinden waren als in WT-Tieren.

Tab. IV/15: Interstitielle Verteilung transmigrierter Leukozyten nach 60-minütiger Stimulation mit LTB₄ [% transmigrierte Leukozyten > 25 μm]. MW ± SEM, * *p* < 0,05 vs. WT.

Gruppe	WT	JAM-A-/-
	58,5 ± 3,1	41,9 ± 4,1*

2.3.3 Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten

Bei der immunhistochemischen Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten konnten in WT-Tieren nach 60-minütiger Stimulation mit LTB_4 über 80 % der transmigrierten Leukozyten als $Ly-6G^+$ neutrophile Granulozyten und etwa 20 % als $F4/80^+$ Monozyten/Makrophagen charakterisiert werden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt.

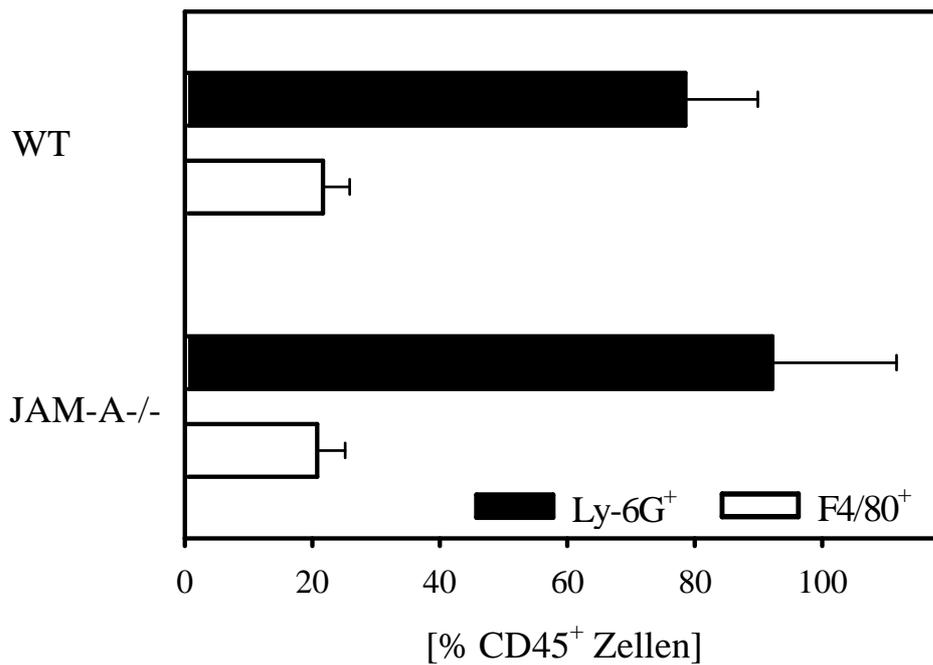


Abb. IV/15: Anteil $Ly-6G^+$ bzw. $F4/80^+$ an $CD45^+$ Zellen nach 60-minütiger Stimulation mit LTB_4 in WT und JAM-A^{-/-} Tieren ($n = 3$), $MW \pm SEM$.

3. BEDEUTUNG DER CHEMOKINREZEPTOREN CCR1, CCR2 UND CCR5 FÜR DIE REKRUTIERUNG VON LEUKOZYTEN

Im dritten und letzten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Chemokinrezeptoren Ccr1-, Ccr2- und Ccr5 für die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses systematisch bei Chemokin-induzierter Entzündung und während I/R untersucht.

3.1 Untersuchungen zur Bedeutung von Ccr2 bei MCP-1-induzierter Entzündung

Zunächst sollten Auswirkungen einer Ccr2-Defizienz auf den leukozytären Extravasationsprozess nach MCP-1-induzierter Entzündung analysiert werden.

3.1.1 Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahl

Um Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu gewährleisten, wurden wiederum in allen untersuchten Gefäßsegmenten Gefäßinnendurchmesser, Blutfließgeschwindigkeit und Scherrate bestimmt. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden. Des Weiteren wurde jeweils am Versuchsende die systemische Leukozytenzahl im Vollblut der Tiere gemessen. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar.

Tab. IV/16: Mikrohämodynamische Parameter.

Gruppe	Kontrolle	WT	Ccr2-/-
Blutfließgeschwindigkeit [mm/s]	2,8 ± 0,3	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,1
Gefäßinnendurchmesser [µm]	21,5 ± 0,7	22,0 ± 1,0	21,5 ± 0,3
Scherrate [s ⁻¹]	645,6 ± 64,1	603,4 ± 41,6	606,0 ± 18,1

Tab. IV/17: Systemische Leukozytenzahl in [$10^6 \mu\text{l}$].

Gruppe	Kontrolle	WT	Ccr2-/-
	3,4 ± 0,6	4,8 ± 0,4	4,3 ± 0,7

3.1.2 Intravitalmikroskopische Befunde

Leukozytäres Rolling

Die intravitalmikroskopische Analyse zeigte, dass die chirurgische Präparation des *M. cremaster* in Kontrolltieren ein leichtes Leukozytenrolling induzierte. Nach intraskrotaler Injektion von MCP-1 hingegen war die Anzahl rollender Leukozyten in postkapillären Venolen von WT- und Ccr2-defizienten Tieren signifikant höher als in Kontrolltieren.

Tab. IV/18: Leukozytäres Rolling nach Stimulation mit MCP-1 in [$n / 30 \text{ s}$], # $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Gruppe	Kontrolle	WT	Ccr2-/-
	17,5 ± 2,7	31,9 ± 2,6 [#]	25,9 ± 4,1 [#]

Leukozytäre Adhärenz

Auch die Anzahl adhärenter Leukozyten war nach 3-stündiger Stimulation mit MCP-1 in Wildtyp-Tieren signifikant höher als in Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu, war dieser Anstieg aber in Ccr2-defizienten Tieren signifikant reduziert.

Leukozytäre Transmigration

Ähnlich verhielt es sich bei der Analyse der leukozytären Transmigration. In WT-Tieren fand sich im Vergleich zu Kontrolltieren eine signifikant erhöhte Anzahl in das interstitielle Gewebe ausgewanderter Leukozyten. Dieser Anstieg war in Ccr2-defizienten Tieren leicht, aber signifikant niedriger.

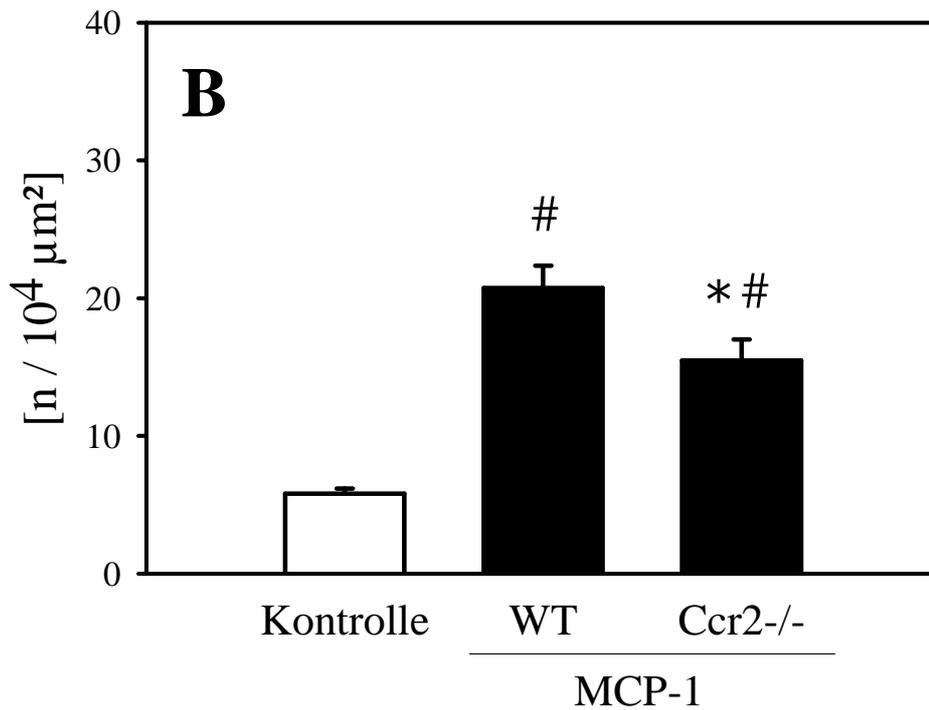
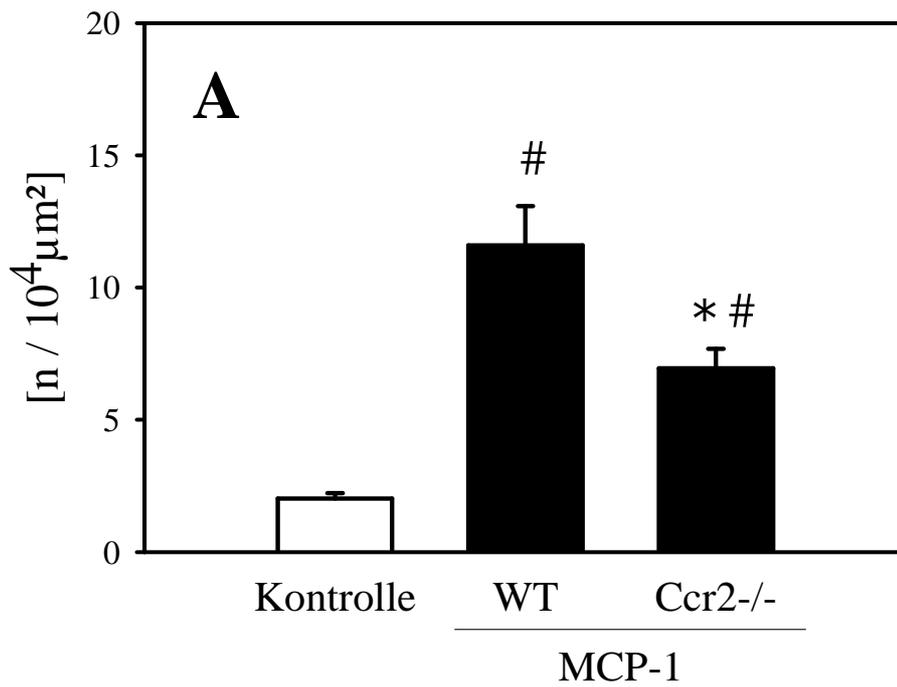


Abb. IV/16: Anzahl adhärenter (A) und transmigrierter (B) Leukozyten unter Kontrollbedingungen sowie nach intraskrotaler Stimulation mit MCP-1. MW ± SEM, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. WT.

Interstitielle Leukozytenmigration: Als Maß für das Migrationsverhalten transmigrierter Leukozyten wurde die Verteilung von Leukozyten im interstitiellen Gewebe bestimmt. Es konnten zwischen Kontrolltieren sowie WT- und Ccr2-defizienten Mäusen keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Tab. IV/19: *Interstitielle Verteilung transmigrierter Leukozyten [% transmigierte Leukozyten > 25 µm]*

Gruppe	WT	Ccr2^{-/-}
	60,6 ± 2,1	60,8 ± 1,1

3.1.3 Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten

Zur Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten führten wir eine immunhistochemische Färbung für Ly-6G, F4/80 sowie CD45 durch. Es zeigte sich, dass nach 3-stündiger Stimulation mit MCP-1 über 80 % der extravasierten Leukozyten Ly-6G⁺ neutrophile Granulozyten und etwa 20 % F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen waren. Zwischen den Versuchsgruppen lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

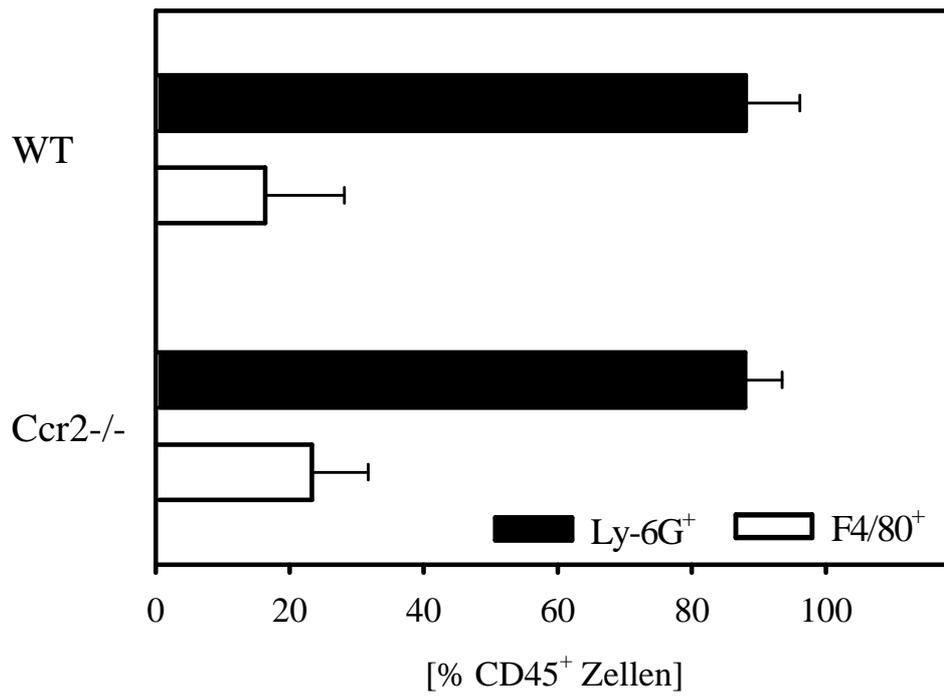


Abb. IV/17: Anteil Ly-6G⁺ bzw. F4/80⁺ an CD45⁺ Zellen nach 180-minütiger Stimulation mit MCP-1 in WT und Ccr2^{-/-} Tieren (n = 3), MW ± SEM.

3.2 Untersuchungen zur Bedeutung von Ccr1 bei MIP-1 α -induzierter Entzündung

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die funktionelle Relevanz des Chemokinrezeptors Ccr1 für die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses bei MIP-1 α -induzierter Entzündung untersucht.

3.2.1 Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahl

Bei der Messung von Gefäßinnendurchmesser, Blutfließgeschwindigkeit und Scherrate wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen registriert. Die systemische Leukozytenzahl lag in allen Gruppen auf einem vergleichbaren Niveau.

Tab. IV/20: Mikrohämodynamische Parameter.

Gruppe	Kontrolle	WT	Ccr1-/-	WT + BX471
Blutfließgeschwindigkeit [mm/s]	2,7 \pm 0,2	2,6 \pm 0,2	2,7 \pm 0,2	2,7 \pm 0,2
Gefäßinnendurchmesser [μm]	24,0 \pm 1,0	23,7 \pm 0,4	25,3 \pm 0,6	22,3 \pm 0,6
Scherrate [s⁻¹]	577,5 \pm 56,5	549,9 \pm 38,7	541,6 \pm 31,7	599,5 \pm 49,7

Tab. IV/21: Systemische Leukozytenzahl in [$10^6 \mu$ l].

Gruppe	Kontrolle	WT	Ccr1-/-	WT + BX471
	3,8 \pm 0,4	4,8 \pm 0,6	4,4 \pm 1,0	3,0 \pm 0,4

3.2.2 Intravitalmikroskopische Befunde

Leukozytäres Rolling

Die Interaktionen von Leukozyten mit dem Endothel postkapillärer Venolen des *M. cremaster* wurden 3 h nach intraskrotaler Injektion von MIP-1 α visualisiert und anschließend quantitativ ausgewertet. Es konnten zwischen Kontrolltieren sowie WT-, Ccr1-defizienten Mäusen und WT-Mäusen, welche mit dem Ccr1-Inhibitor BX471 vorbehandelt wurden, keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl rollender Leukozyten beobachtet werden.

Tab. IV/22: Leukozytäres Rolling in [n / 30 s].

Gruppe	Kontrolle	WT	Ccr1-/-	WT + BX471
	25,5 \pm 3,9	33,3 \pm 2,4	29,8 \pm 2,7	26,5 \pm 3,6

Leukozytäre Adhärenz

Die Anzahl adhärenter Leukozyten hingegen war in WT-Tieren signifikant höher als in Kontrolltieren. In Ccr1-defizienten sowie in BX471 behandelten WT-Tieren war dieser Anstieg auf das Niveau von Kontrolltieren signifikant reduziert.

Leukozytäre Transmigration

Ähnlich wie bei der intravitalmikroskopischen Analyse der Leukozytenadhärenz war die Anzahl transmigrierter Leukozyten in WT-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren 3 Stunden nach intraskrotaler Injektion von MIP-1 α signifikant erhöht. In Ccr1-defizienten Tieren sowie in BX471 behandelten WT-Tieren war dieser Anstieg signifikant geringer.

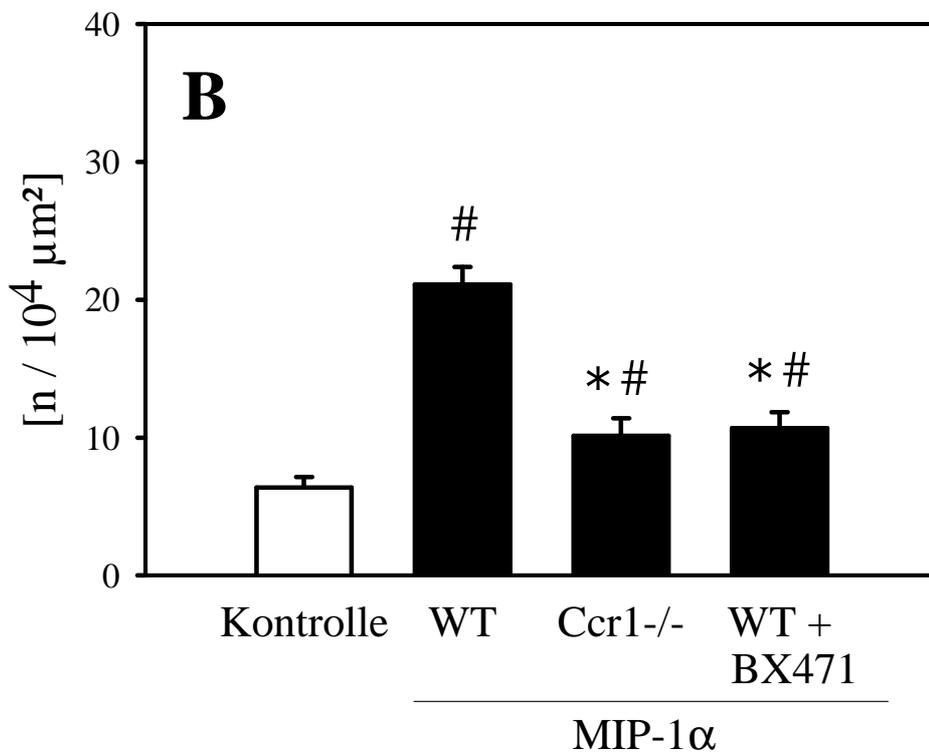
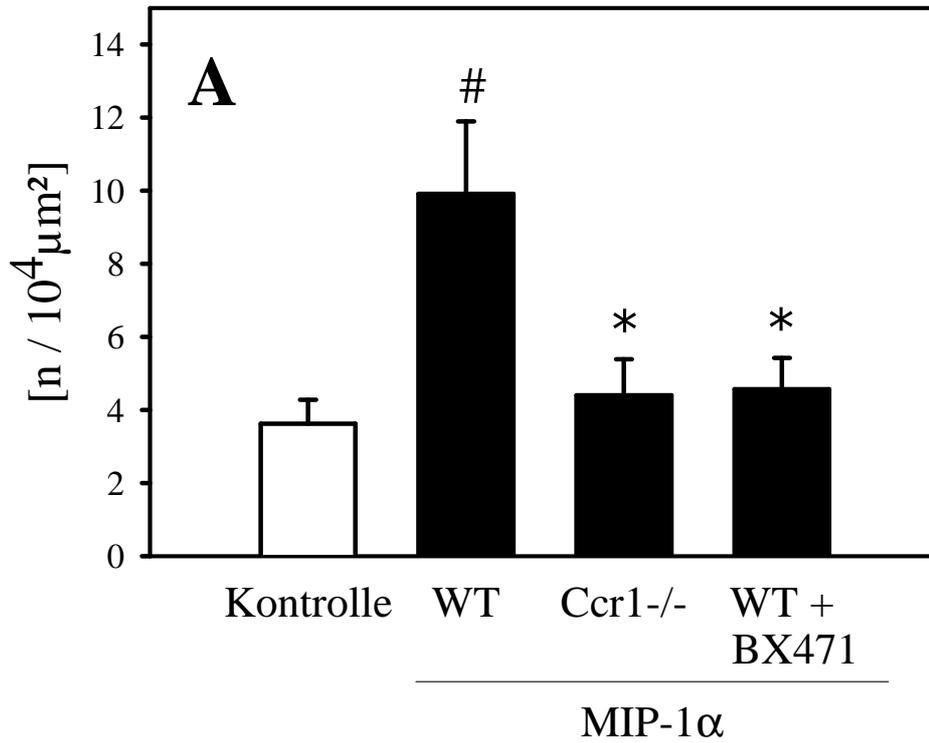


Abb. IV/18: Anzahl adhärenter (A) und transmigrierter (B) Leukozyten unter Kontrollbedingungen sowie nach intraskrotaler Stimulation mit MIP-1 α . MW \pm SEM, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. WT.

Interstitielle Leukozytenmigration

Abschließend wurde die Gewebeverteilung von transmigrierten Leukozyten untersucht. Die quantitative Analyse zeigte, dass 3 h nach intraskrotaler Injektion von MIP-1 α zwischen WT- und Ccr1-defizienten Tieren sowie WT-Tieren, welche BX471 erhalten hatten, keine signifikanten Unterschiede bestanden.

Tab. IV/23: *Interstitielle Verteilung transmigrierter Leukozyten [% transmigrierte Leukozyten > 25 μ m]*

Gruppe	WT	Ccr1-/-	WT + BX471
	57,0 \pm 1,6	54,7 \pm 2,4	62,4 \pm 2,3

3.2.3 Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten

Die Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten erfolgte wiederum mittels immunhistochemischer Färbung von Paraffinschnitten. Nach Stimulation mit MIP-1 α waren in allen experimentellen Gruppen über 70 % der transmigrierten Leukozyten Ly-6G⁺ neutrophile Granulozyten, etwa 20 – 30 % waren F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

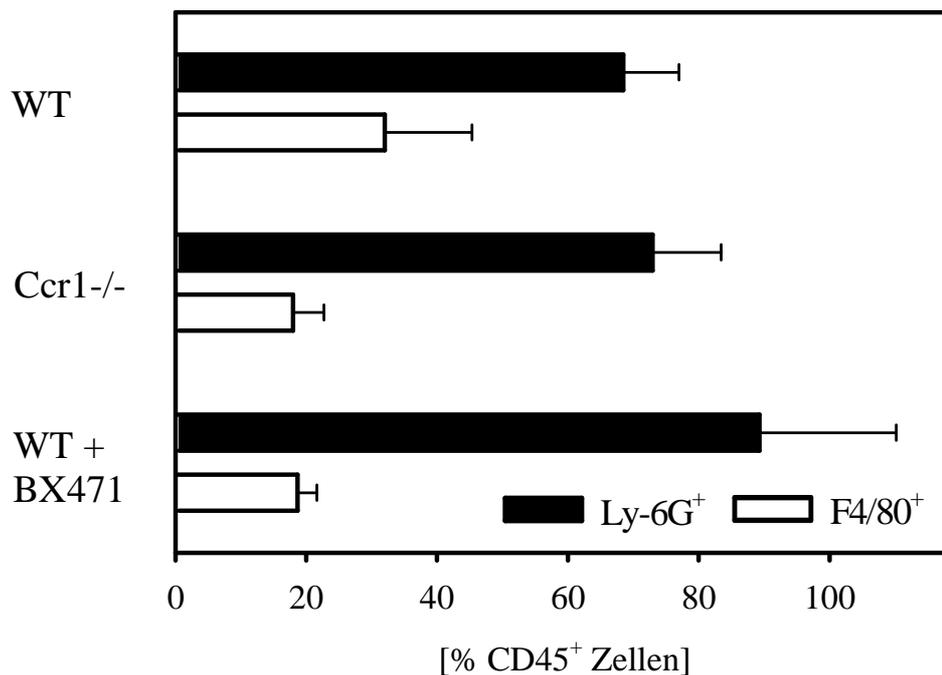


Abb. IV/19: Anteil Ly-6G⁺ bzw. F4/80⁺ an CD45⁺ Zellen nach 180-minütiger Stimulation mit MIP-1 α in WT und Ccr1^{-/-} Tieren sowie WT Tieren nach Applikation von BX471 (n = 3), MW \pm SEM.

3.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG VON CCR5 BEI MIP-1 α -INDUZIERTER ENTZÜNDUNG

3.3.1 Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahl

In allen experimentellen Gruppen waren die Werte für Gefäßinnendurchmesser, Blutfließgeschwindigkeit und Scherrate vergleichbar. Bei der Bestimmung der systemischen Leukozytenzahl lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen vor.

Tab. IV/24: Mikrohämodynamische Parameter.

Gruppe	Kontrolle	WT	Ccr5-/-
Blutfließgeschwindigkeit [mm/s]	1,5 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1
Gefäßinnendurchmesser [μ m]	20,2 \pm 0,5	20,1 \pm 0,5	20,4 \pm 0,5
Scherrate [s ⁻¹]	502,6 \pm 18,9	436,5 \pm 41,3	408,7 \pm 40,3

Tab. IV/25: Systemische Leukozytenzahl in [10⁶ μ l].

Gruppe	Kontrolle	WT	Ccr5-/-
	3,5 \pm 0,4	3,4 \pm 0,5	4,9 \pm 0,7

3.3.2 Intravitalmikroskopische Befunde

Leukozytäres Rolling

Nach intraskrotaler Injektion von MIP-1 α wurden in postkapillären Venolen des *M. cremaster* mit Hilfe der Intravitalmikroskopie zunächst die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen analysiert. Unter Kontrollbedingungen konnte ein leichtes, durch die chirurgische Präparation hervorgerufenes Leukozytenrolling beobachtet werden. Demgegenüber war die Anzahl rollender Leukozyten nach 3-stündiger Stimulation mit MIP-1 α sowohl in WT-Tieren als auch in Ccr5-defizienten Mäusen statistisch signifikant erhöht.

Tab. IV/26: Leukozytäres Rolling nach Stimulation mit MIP-1 α [n / 30 s].

Gruppe	Kontrolle	WT	Ccr5-/-
	15,8 \pm 1,1	22,8 \pm 2,4 [#]	22,6 \pm 1,0 [#]

Leukozytäre Adhärenz

In ähnlicher Weise wurden in Kontrolltieren nur wenige am Gefäßendothel adhärenente Leukozyten beobachtet. Wie schon gezeigt, fand sich nach 3-stündiger Stimulation mit MIP-1 α in WT-Tieren ein signifikanter Anstieg der Anzahl adhärenenter Leukozyten. In Ccr5-defizienten Tieren hingegen konnte eine signifikante Reduktion der Leukozytenadhärenz auf das Niveau von Kontrolltieren festgestellt werden.

Leukozytäre Transmigration

Bei der Analyse der transendothelialen Migration wurden in Kontrolltieren wiederum nur vereinzelt Leukozyten im perivaskulären Gewebe beobachtet. 3 h nach intraskrotaler Injektion von MIP-1 α konnten in WT-Tieren eine deutliche Zunahme der Anzahl transmigrierter Leukozyten registriert werden. Im Gegensatz dazu war dieser Anstieg in Ccr5-defizienten Tieren signifikant geringer ausgeprägt.

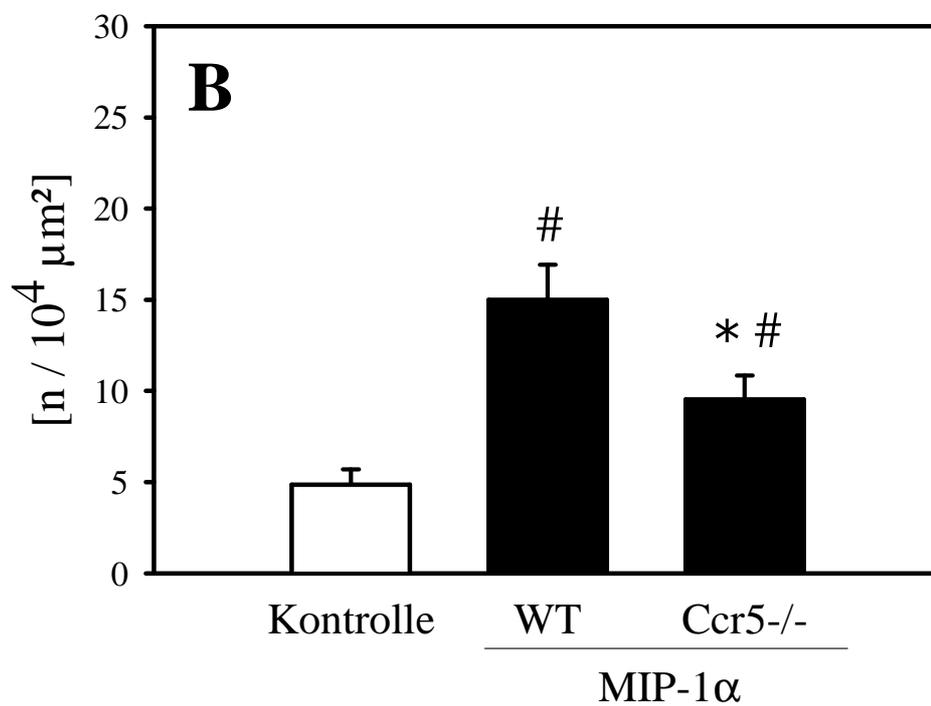
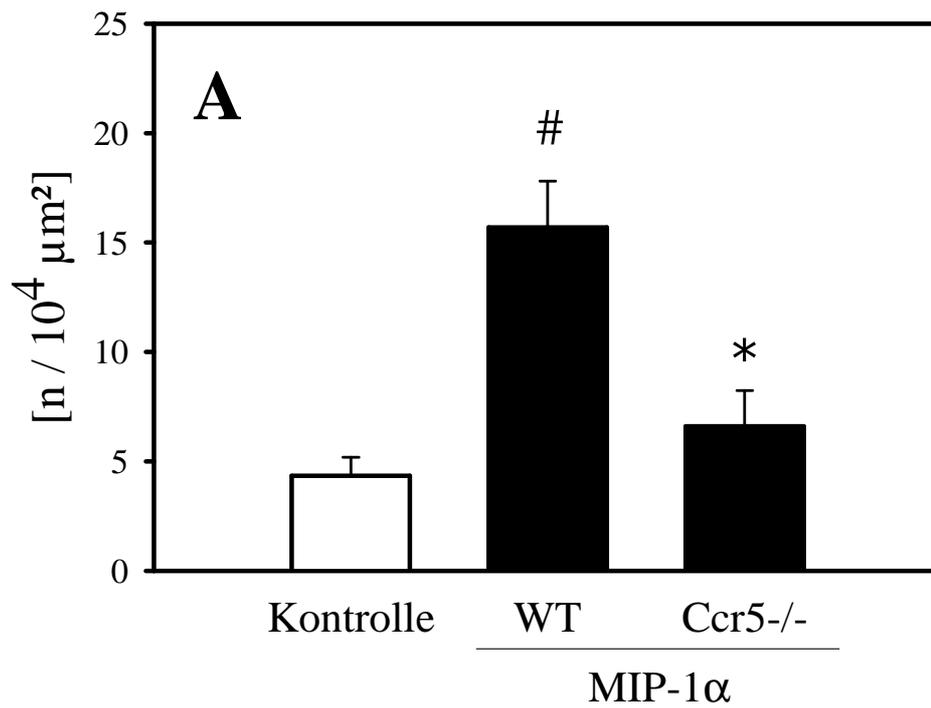


Abb. IV/20: Anzahl adhärenter (A) und transmigrierter (B) Leukozyten unter Kontrollbedingungen sowie nach intraskrotaler Stimulation mit MIP-1α. MW ± SEM, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. WT.

Interstitielle Leukozytenmigration

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens transmigrierter Leukozyten wurde die interstitielle Verteilung von Leukozyten bestimmt. Es konnten zwischen WT- und Ccr5-defizienten Tieren keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Tab. IV/27: *Interstitielle Verteilung transmigrierter Leukozyten [% transmigrierte Leukozyten > 25 µm].*

Gruppe	WT	Ccr5-/-
	62,5 ± 3,1	61,2 ± 3,6

3.3.3 Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten

Zur Bestimmung des Phänotyps der ins Gewebe ausgewanderten Leukozyten wurde wieder eine immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten des *M. cremaster* durchgeführt. Nach 3-stündiger Stimulation mit MIP-1 α waren sowohl in WT-Tieren wie auch in Ccr5-/- Tieren über 70 % der ausgewanderten Leukozyten Ly-6G⁺ neutrophile Granulozyten und etwa 20 % F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden.

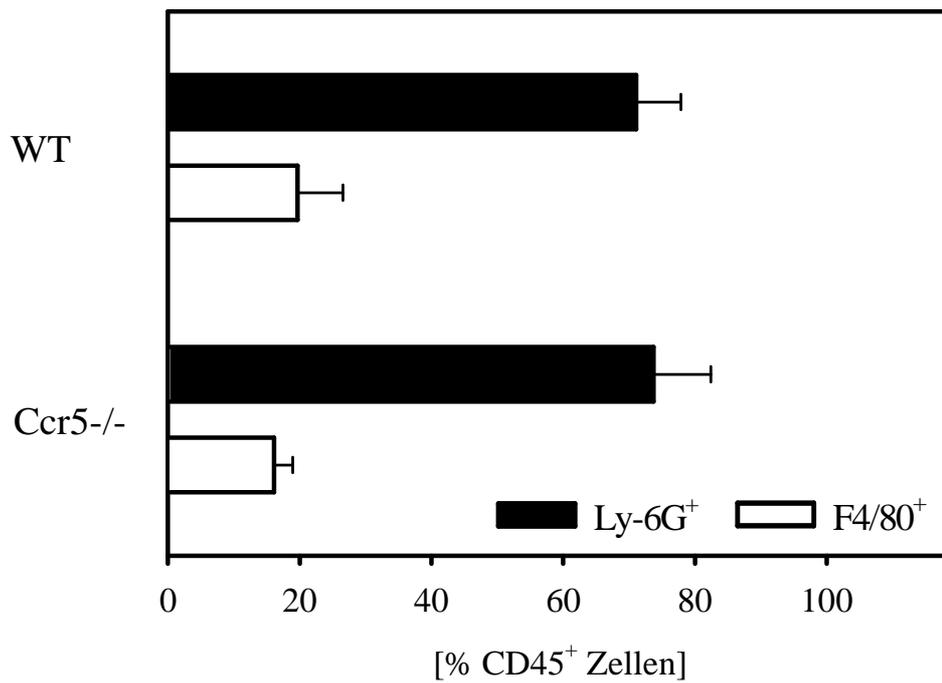


Abb. IV/21: Anteil Ly-6G⁺ bzw. F4/80⁺ an CD45⁺ Zellen nach 180-minütiger Stimulation mit MIP-1 α in WT und Ccr5^{-/-} Tieren ($n = 3$), MW \pm SEM.

3.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG VON CCR1, CCR2 UND CCR5 BEI I/R

3.4.1 Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahl

Bei der Bestimmung von Gefäßinnendurchmesser, Blutfließgeschwindigkeit und Scherrate konnten zwischen den Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Darüber hinaus war die systemische Leukozytenzahl in allen experimentellen Gruppen vergleichbar.

Tab. IV/28: Mikrohämodynamische Parameter.

Gruppe	sham	WT	Ccr1-/-	Ccr2-/-	Ccr5-/-
Blutfließgeschwindigkeit [mm/s]	2,7 ± 0,3	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,5	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1
Gefäßinnendurchmesser [µm]	24,7 ± 1,2	23,2 ± 0,6	24,0 ± 0,7	24,0 ± 0,6	24,7 ± 0,8
Scherrate [s ⁻¹]	536,2 ± 53,4	553,9 ± 39,2	566,0 ± 103,5	493,8 ± 26,0	472,1 ± 25,9

Tab. IV/29: Systemische Leukozytenzahl in [10⁶ µl].

Gruppe	sham	WT	Ccr1-/-	Ccr2-/-	Ccr5-/-
	3,8 ± 1,1	3,6 ± 0,6	2,2 ± 0,6	4,0 ± 0,8	4,4 ± 0,6

3.4.2 Intravitalmikroskopische Befunde

Leukozytäres Rolling

Die chirurgische Präparation induzierte in den postkapillären Venolen des *M. cremaster* ein leichtes Leukozytenrolling. Zu Baseline-Bedingungen konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Fünf Minuten nach Einsetzen der Reperfusion hingegen war die Anzahl rollender Leukozyten in WT-Mäusen im Vergleich zu scheinoperierten Tieren auf mehr als das doppelte erhöht. Im zeitlichen Verlauf fiel diese Erhöhung jedoch wieder auf Baseline-Niveau ab und erreichte nach 120-minütiger Reperfusion schließlich ein Plateau. Ähnliche Verläufe wurden in *Ccr1*^{-/-}, *Ccr2*^{-/-}, und *Ccr5*^{-/-} defizienten Mäusen beobachtet und es konnten im Vergleich zu WT-Tieren keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

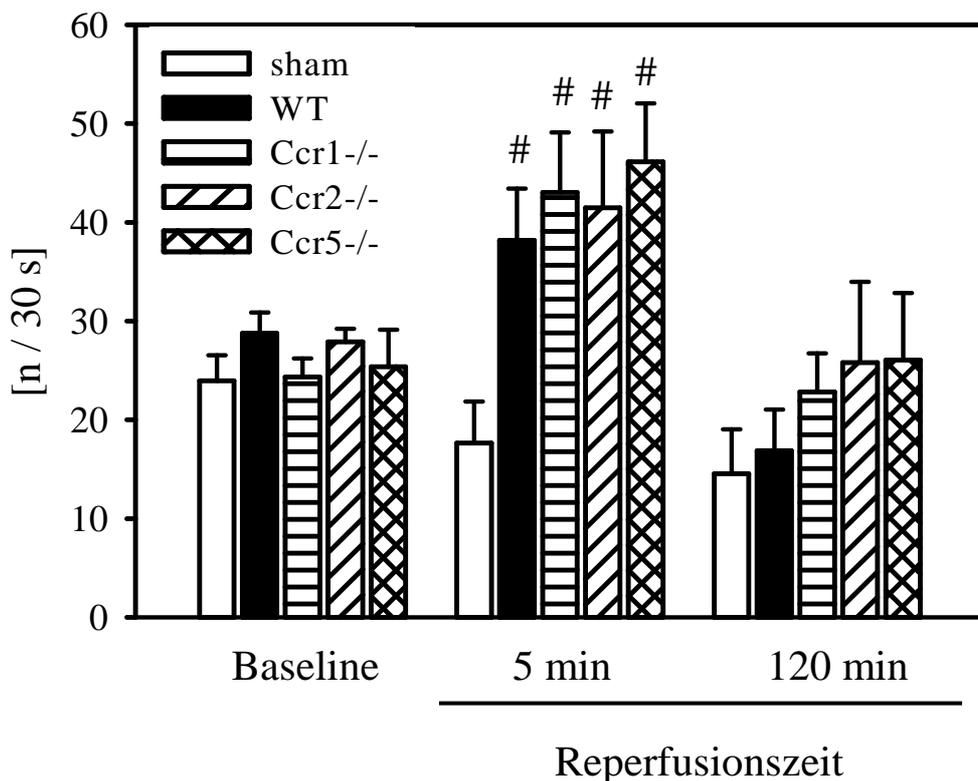


Abb. IV/22: Anzahl rollender Leukozyten unter Baseline-Bedingungen sowie nach 30 min Ischämie und 5 min bzw. 120 min Reperfusion. MW ± SEM, # $p < 0,05$ vs. sham, * $p < 0,05$ vs. WT.

Leukozytäre Adhärenz

Vor Induktion der Ischämie waren in allen Versuchsgruppen nur einige wenige Leukozyten an der Gefäßinnenwand postkapillärer Venolen adhären. Nach 5-minütiger Reperfusion konnte ein deutlicher Anstieg der Anzahl fest adhärenter Leukozyten in WT-Mäusen im Vergleich zu schein-operierten Tieren beobachtet werden. Dieser Anstieg persistierte während des gesamten Versuchverlaufes. Im Gegensatz dazu adhären in Ccr1- und Ccr5-defizienten Mäusen signifikant weniger Leukozyten als in WT-Tieren. In Ccr2-defizienten Mäusen konnte nach 5-minütiger Reperfusion jedoch keine signifikante Reduktion der Leukozytenadhärenz festgestellt werden. Allerdings war die Anzahl adhärenter Leukozyten nach 120 min Reperfusion in Ccr2-defizienten Mäusen verglichen mit WT-Tieren signifikant geringer.

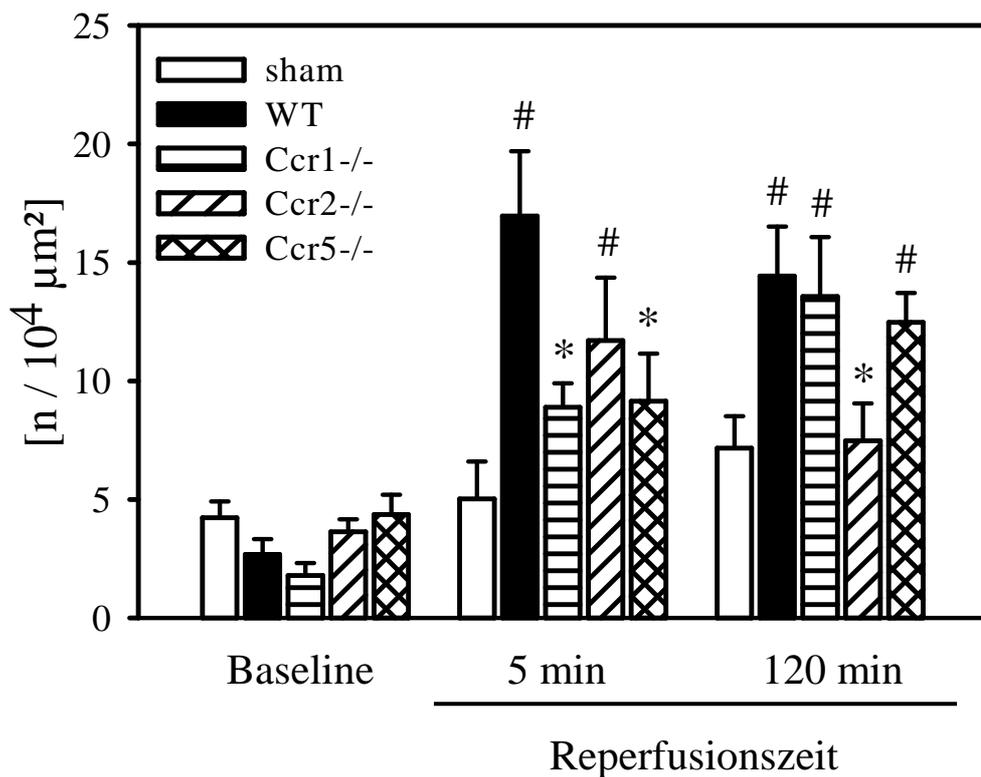


Abb. IV/23: Anzahl adhärenter Leukozyten unter Baseline-Bedingungen sowie nach 30 min Ischämie und 5 min bzw. 120 min Reperfusion. MW ± SEM, # $p < 0,05$ vs. sham, * $p < 0,05$ vs. WT.

Leukozytäre Transmigration

Unter Baseline-Bedingungen, war die Anzahl transmigrierter Leukozyten gering und differierte nicht zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Allerdings kam es nach dem Einsetzen der Reperfusion in WT-Mäusen im Vergleich zu schein-operierten Tieren zu einem stetigen Anstieg der Anzahl transmigrierter Leukozyten. Nach 120-minütiger Reperfusion war dieser Anstieg in Ccr1-, Ccr2- und Ccr5-defizienten Mäusen signifikant geringer als in WT-Tieren, woraus eine durchschnittliche Reduktion der Leukozytentransmigration von 53,1 %, 63,7 %, und 48,5 % resultierte.

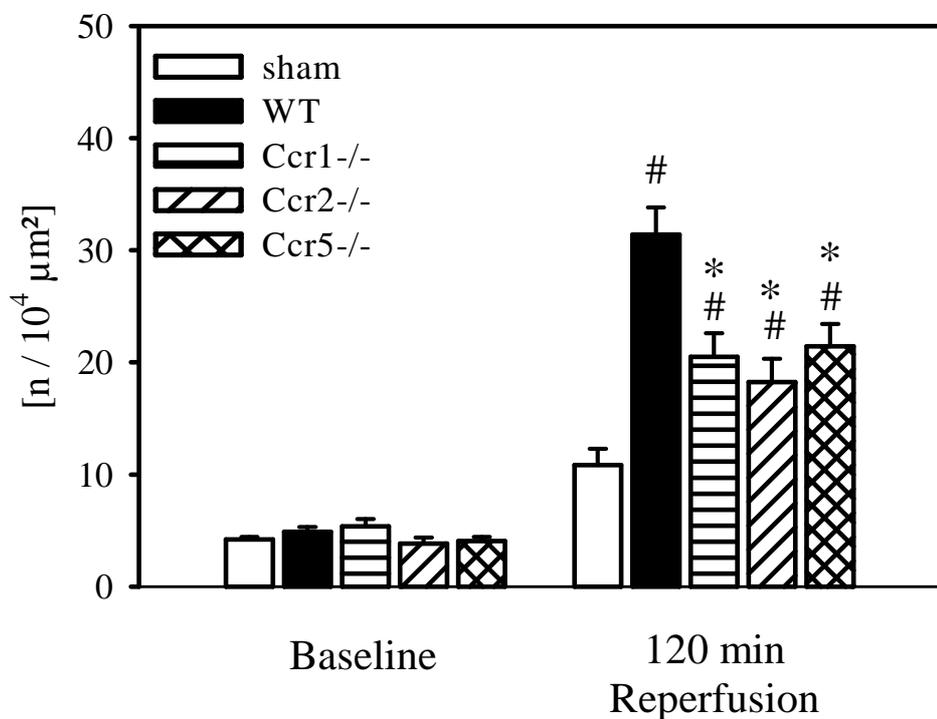


Abb. IV/24: Anzahl transmigrierter Leukozyten unter Baseline-Bedingungen sowie nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion. MW \pm SEM, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. WT.

Interstitielle Leukozytenmigration

Als Maß für das interstitielle Migrationsverhalten von Leukozyten wurde wiederum die Verteilung transmigrierter Leukozyten im extravaskulären Gewebe analysiert. Nach 120-minütiger Reperfusion hatten in WT-Tieren über 60 % der transmigrierten Leukozyten eine Strecke von mehr als 25 μm zurückgelegt. Ccr1-, Ccr2- und Ccr5-Defizienz war nicht mit Veränderungen der interstitiellen Verteilung transmigrierter Leukozyten assoziiert. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die anderen Beobachtungszeitpunkte erhalten.

Tab. IV/30: Interstitielle Verteilung transmigrierter Leukozyten nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion [% transmigrierte Leukozyten > 25 μm].

Gruppe	WT	Ccr1-/-	Ccr2-/-	Ccr5-/-
	60,2 \pm 0,1	61,0 \pm 0,2	58,3 \pm 0,2	59,4 \pm 0,01

3.4.3 Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten

Zur Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten erfolgte eine immunhistochemische Färbung für CD45, Ly-6G und F4/80. In allen Versuchsgruppen nach I/R waren 80 – 90 % der transmigrierten Leukozyten Ly-6G⁺ neutrophile Granulozyten und 5 – 10 % F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden.

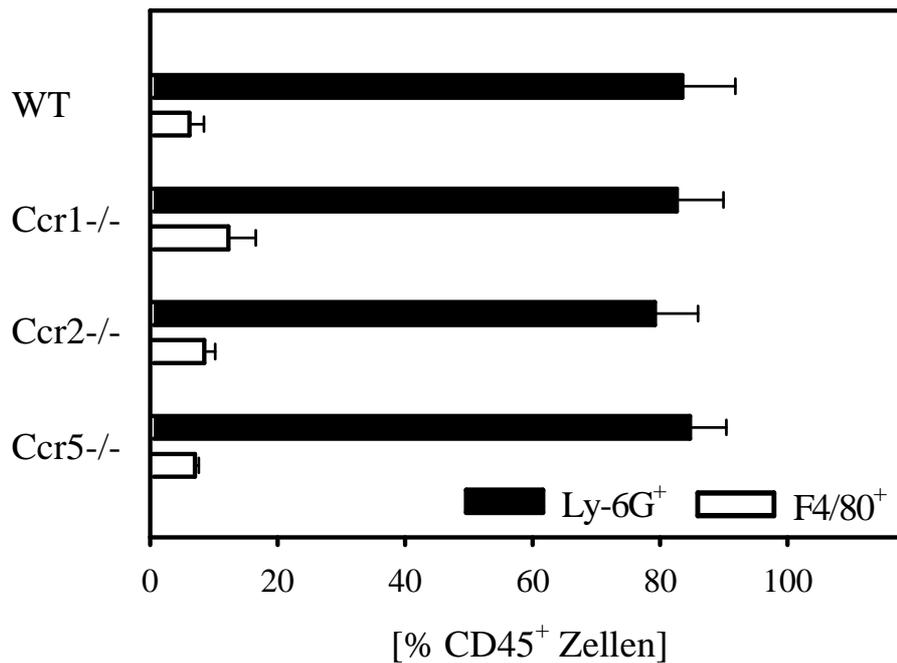


Abb. IV/25: Anteil Ly-6G⁺ bzw. F4/80⁺ an CD45⁺ transmigrierter Leukozyten nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion (n = 3), MW ± SEM.

3.4.4 Analyse der Mastzellichte im *M. cremaster*

Zur Analyse der Mastzellichte im *M. cremaster* von WT- und Chemokinrezeptor-defizienten Tieren, wurden Paraffinschnitte histochemisch mit Toluidinblau gefärbt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl von Mastzellen zwischen WT- sowie Ccr1-, Ccr2- und Ccr5-defizienten Mäusen festgestellt werden.

Tab. IV/31: Mastzellichte im *M. cremaster* [n / mm²].

Gruppe	WT	Ccr1 ^{-/-}	Ccr2 ^{-/-}	Ccr5 ^{-/-}
	5,7 ± 1,1	7,8 ± 1,1	5,9 ± 1,1	6,7 ± 1,4

3.4.5 Chemokinrezeptor-Expression auf neutrophilen Granulozyten

Um die Expression der Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 auf neutrophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut von WT-Mäusen zu untersuchen, wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Der Chemokinrezeptor Ccr2 konnte auf $97,3 \pm 0,9 \%$ der neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Ccr5 wurde auf $94,5 \pm 2,4 \%$ der neutrophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut exprimiert ($n = 3$).

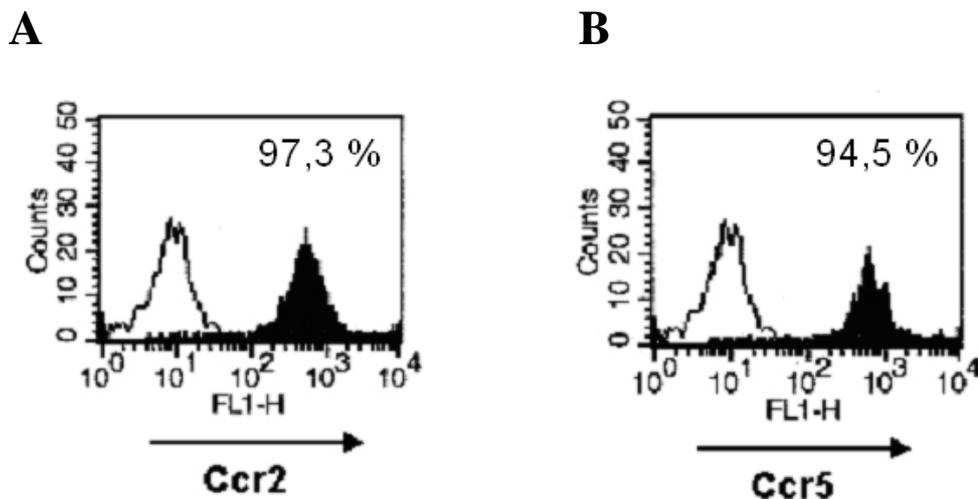


Abb. IV/26: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Ccr2 (A) und Ccr5 (B) auf murinen neutrophilen Granulozyten, welche aus dem peripheren Blut isoliert wurden. Es werden repräsentative Ergebnisse für die Verschiebungen der mittleren Fluoreszenzintensität von Ccr2 und Ccr5 auf neutrophilen Granulozyten (schwarze Histogramme) im Vergleich zu einem Isotyp-gematchten Kontroll-IgG (offene Histogramme) gezeigt. Die Werte geben die mittlere Expressionsrate des jeweiligen Chemokinrezeptors wieder.

V. DISKUSSION

1. MODELL

1.1 Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des Moleküls JAM-A sowie die Rolle der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 für den leukozytären Extravasationsprozess während Entzündung und I/R *in vivo* analysiert.

Die Rekrutierung von Leukozyten unterliegt einem hochkomplexen Zusammenspiel unterschiedlichster Systeme und Mechanismen. Da diese von einem Gesamtorganismus abhängig sind, können einzelnen Faktoren des leukozytären Extravasationsprozesses idealer Weise mit Hilfe eines Tiermodells charakterisiert werden.

Bei der Wahl des Versuchstiers haben wir uns für die Maus entschieden, da diese Spezies immunologisch sehr gut charakterisiert ist. Es liegt sowohl ein breites Spektrum an unterschiedlichen Antikörpern wie auch eine Vielzahl gezielt genetisch veränderter Tiere vor, welche Untersuchungen zur biologischen Relevanz einzelner molekularer Mechanismen für die Rekrutierung von Leukozyten erlauben.

In unseren Experimenten wurden C57BL/6 und BALB/c Stämme verwendet, welche jeweils eine hohe Konstanz der untersuchten anatomischen Strukturen aufweisen. Darüber hinaus lassen die Konstanz der erhobenen intravitalmikroskopischen Daten unter Kontrollbedingungen sowie die Übereinstimmung mit den Daten von Kooperationspartnern bzw. mit Daten aus der Literatur auf eine hohe Reproduzierbarkeit der in diesen Tierstämmen erhobenen Befunde schließen.

Neben WT Tieren wurden in unseren Untersuchungen zur Bedeutung des Adhäsionsmoleküls JAM-A auch JAM-A-defiziente sowie Tie-2-Cre-JAM-A C57BL/6 Mäuse, welche spezifisch für endotheliales JAM-A defizient sind, (21) bzw. zur Bedeutung der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 entsprechend Ccr1-, Ccr2- und Ccr5-defiziente Mäuse mit einem C57BL/6 (32, 46, 99) oder einem BALB/c Hintergrund verwendet. Alle genetisch veränderten Tiere waren unter pathogenfreier Haltung phänotypisch normal und ließen sich somit äußerlich nicht von WT-Tieren unterscheiden. Unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen sind bei den verwendeten genetisch veränderten Tieren allerdings Defekte der angeborenen und adaptiven Immunabwehr beschrieben (21, 32, 46, 99).

1.2 Versuchsmodell und chirurgische Präparation

Das Kremaster-Modell ist ein in der internationalen Fachliteratur bestens etabliertes Modell zur Untersuchung der Mikrozirkulation. Aus anatomischer Sicht stellt der *M. cremaster* eine in die *Fascia cremasterica* eingebettete und den Hoden umgebende Abzweigung des unteren Muskelrandes des *M. obliquus internus abdominis* sowie des *M. transversus abdominis* dar. Er ist somit ein quergestreifter, aus zwei Schichten bestehender Muskel. Für unsere Untersuchungen wurde die mikrochirurgische Präparation des *M. cremaster* nach der Erstbeschreibung von Baez mit kleineren Modifikationen, wie unter *Material und Methoden* bereits beschrieben, durchgeführt (8). Dies war nach einer kurzen Anlernphase technisch komplikationsfrei durchzuführen.

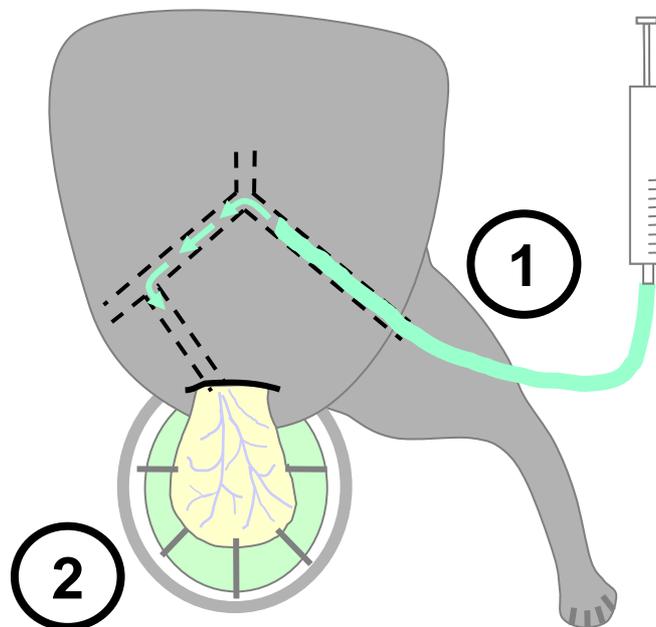


Abb. V/1: Vereinfachte Schemadarstellung der Präparation des *M. cremaster* an der Maus. (1) Kanülierte *A. femoralis*, links; (2) Im Superfusat aufgespannter *M. cremaster*, rechts.

Die Vorteile des Modells liegen in der charakteristischen Morphologie des *M. cremaster*. Seine annähernd zwei-dimensionale Gefäßarchitektur, die geringe Tiefenausdehnung sowie die hohe Gefäßdichte erlauben mit Hilfe moderner intravitalmikroskopischer Techniken eine überlappungsfreie Darstellung anatomischer Strukturen bis hin zur Migration einzelner Zellen. Durch systemische Applikation, intraskrotale Injektion, Superfusion, oder Mikroinjektion inflammatorischer Substanzen wird die Untersuchung der Mikrozirkulation bei unterschiedlichsten Entzündungsformen möglich. Darüber hinaus wurde das Modell im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der einzelnen Schritte des leukozytären

Rekrutierungsprozesses bei I/R weiterentwickelt (vgl. Kapitel V/2.2). Kritisch anzumerken ist, dass die chirurgische Präparation des *M. cremaster* ein leichtes Leukozytenrolling induziert und dem Kremastermodell somit gewisse Einschränkungen bei der Beurteilung dieses Parameters unterliegen. Dies muss als systemimmanenter Nachteil des Modells akzeptiert werden. Für die in der vorliegenden Arbeit relevanten Parameter der permanenten Leukozytenadhärenz sowie der transendothelialen und interstitiellen Migration von Leukozyten scheint der Einfluss der durch die chirurgische Präparation hervorgerufenen, unumgänglichen Affektion des *M. cremaster* allerdings zu vernachlässigen zu sein.

Zusammenfassend ist das in der vorliegenden Studie verwendete Modell zur Untersuchung der Leukozytenrekrutierung am *M. cremaster* der Maus ein in der Literatur vielfach beschriebenes Tiermodell, welches die Untersuchung des leukozytären Rekrutierungsprozesses unter unterschiedlichen inflammatorischen Bedingungen erlaubt, und deshalb hervorragend dazu geeignet ist, die eingangs formulierten Fragestellungen zu bearbeiten.

1.3 Experimentelles Protokoll

Zur Etablierung eines Versuchsmodells, welches alle Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses bei I/R zu analysieren erlaubt, wurden am *M. cremaster* der Maus zunächst systematische Untersuchungen zum Einfluss von Ischämie- und Reperusionszeit durchgeführt. Dabei wurden Ischämiezeiten von 30, 60 und 90 min sowie Reperusionszeiten von 5, 30, 60, 90 und 120 min verwendet. Die Auswahl der jeweiligen Zeitintervalle orientierte sich an bisher publizierten Untersuchungen zur postischämischen Leukozytenrekrutierung am *M. cremaster* (75, 134). Wie die Ergebnisse unserer Experimente zeigen, konnte eine Verlängerung der Ischämiezeit auf 60 min bzw. 90 min im Vergleich zu 30 min Ischämie keine zusätzliche Erhöhung der Leukozytenrekrutierung induzieren. Deshalb entschieden wir, in unseren Versuchen fortan mit einer Ischämiezeit von 30 min zu arbeiten. Die einzelnen Ergebnisse dieser Untersuchungen sind unter Kapitel IV/1 zu finden und werden in Kapitel V/2.2 näher erläutert.

Darüber hinaus wurde der leukozytäre Rekrutierungsprozess am *M. cremaster* der Maus in entsprechenden Experimenten während einstündiger Stimulation mit LTB₄, nach dreistündiger Stimulation mit MIP-1 α bzw. MCP-1 sowie nach vierstündiger Stimulation mit IL-1 β analysiert. Die Auswahl der eingesetzten Chemokin- bzw. Zytokinkonzentrationen sowie der entsprechenden Zeitintervalle und Applikationstechniken erfolgte aufgrund bisher publizierter Studien (30, 112, 169). Unsere Ergebnisse zeigten gegenüber der jeweiligen

Kontrollgruppe eine signifikante Induktion der Leukozytenrekrutierung und stimmen mit den in der Literatur publizierten Daten überein. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass mit Hilfe der gewählten Versuchsansätze Antworten auf die eingangs formulierten Fragestellungen zu erhalten sind.

1.4 Verfahren zur Untersuchung der Leukozytentransmigration

Zur Untersuchung der Leukozytentransmigration steht ein breites Spektrum unterschiedlicher technischer Verfahren zur Verfügung.

Die Analyse histochemisch bzw. immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitte ist dabei die am weitesten verbreitete Methode. Sie stellt ein relativ einfach anzuwendendes Verfahren dar, welches in allen Geweben durchgeführt werden kann und zudem eine Phänotypisierung der einzelnen Leukozyten erlaubt. Allerdings gestattet diese Methode nur eine Momentaufnahme des leukozytären Rekrutierungsprozesses, welche ausschließlich zwischen intra- und extravaskulär lokalisierten Leukozyten differenzieren lässt.

Ein weiteres, häufig verwendetes Verfahren zur Analyse der Leukozytentransmigration ist die Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität (MPO-Aktivität) in Gewebeproben. Myeloperoxidase wird in den azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten gespeichert und dient dem Nachweis von transmigrierten neutrophilen Granulozyten. Kritisch anzumerken ist, dass trotz sorgfältiger Perfusion des auf MPO-Aktivität zu untersuchenden Organs intravasale Leukozytenkonglomerate zurückbleiben können und die Aussage des Messergebnisses dadurch leicht verfälscht werden kann.

Eine selektive Untersuchung der Leukozytentransmigration erlauben indes Versuchsmodelle, in welchen die Infiltration einer präformierte bzw. artifiziell geschaffenen Körperhöhle durch die Instillation inflammatorischer Stimuli induziert wird. Hierbei sind vor allem Peritonitis- und Pneumoniemodelle zu nennen. Durch Lavage der entsprechenden Körperhöhlen lassen sich Zellsuspensionen zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der Leukozytentransmigration gewinnen.

Eine dynamische Analyse der einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses wurde erst durch die Einführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie möglich. Dabei können vor allem die initialen Schritte des leukozytären Extravasationsprozesses, Rolling und Adhärenz, hervorragend untersucht werden. Die Analyse der transendothelialen und interstitiellen Migration von Leukozyten ist jedoch erschwert, da fluoreszenzmarkierte, extravasierte Leukozyten ausbleichen und einer erneuten Anfärbung nicht mehr zugänglich sind.

Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie ist eine Weiterentwicklung der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie, welche durch die Verwendung spezieller Filtertechniken eine verbesserte Bildqualität liefert und darüber hinaus die Untersuchung von Objekten vergleichsweise hoher Tiefenausdehnung erlaubt. Hierdurch wird es möglich, virtuelle optische Schnitte durch den Untersuchungsgegenstand zu generieren, aus welchen sogar dreidimensionale Rekonstruktionen angefertigt werden können (156). Kritischer Faktor ist hierbei neben dem hohen Anschaffungspreis die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche auch bei der „klassischen“ Fluoreszenzmikroskopie als problematisch betrachtet wird. In verschiedenen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. *Acridin orange* oder *Rhodamin 6G* zusammen mit dem Einsatz von energiereichem Licht strukturelle Veränderungen der Zelle bis hin zum Zelltod induzieren können - ein Phänomen, welches als *phototoxischer Effekt* bezeichnet wird (129, 180, 181). Der phototoxische Effekt ist von der Wellenlänge des verwendeten Lichts, der Expositionszeit sowie von der Konzentration des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes abhängig und kann auch Einfluss auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen nehmen (148).

Die Multiphotonenmikroskopie kombiniert konfokale Mikroskopie mit dem Einsatz von langwelligerem, niederenergetischerem Licht und ermöglicht somit eine noch hochauflösendere Visualisierung des Untersuchungsobjekts bei gleichzeitiger Reduzierung der Phototoxizität (36).

1.4.1 RLOT-Intravitalmikroskopie

Erste Untersuchungen der Mikrozirkulation an Mensch und Tier wurden bereits in der Mitte des 17. Jahrhunderts beschrieben. Durch die Möglichkeit, Blutbestandteile mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen selektiv zu visualisieren, revolutionierte die intravitale Fluoreszenzmikroskopie das Verständnis von den dynamischen Wechselwirkungen lebender Zellen in der Mikrozirkulation. In diesem Zusammenhang hat dieses Verfahren wie kein anderes dazu beigetragen, die molekularen Grundlagen der initialen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses *in vivo* aufzudecken. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist in der Fachliteratur als Routineverfahren zur Untersuchung physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge in den verschiedensten Organen wie Myokard (86), Lunge (84), Leber (81), Darm (103), Pankreas (61) und Gehirn (10) etabliert.

Intravitalmikroskopische Untersuchungen zu Extravasation und interstitieller Migration von Leukozyten wurden zwar in unterschiedlichen Versuchsmodellen wie dem Kaninchenohr (26), der Hamsterbackentasche (138) oder dem Mesenterium bzw. Kremastermuskel von

Ratte und Maus (57, 110, 176) bereits beschrieben, allerdings war die Differenzierung zwischen sich im Interstitium befindlichen Leukozyten und den morphologischen Eigenheiten des entsprechenden Gewebes mit Hilfe klassischer intravitalmikroskopischer Methoden aufgrund des schwachen Bildkontrastes stark eingeschränkt.

Durch die Visualisierung von Phasengradienten in ungefärbtem Gewebe eröffneten sich mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie (183), der differentiellen Interferenzkontrastmikroskopie (125) oder der Modulationskontrastmikroskopie (60) Möglichkeiten, die zelluläre Dynamik *in vitro* zu untersuchen. Thorsten Mempel und Mitarbeiter etablierten in unserer Arbeitsgruppe ein Verfahren, welches diese, den zuvor genannten Methoden zugrunde liegenden optischen Prinzipien mit der herkömmlichen Intravitalmikroskopie kombiniert (112).

Bei der sog. *near-infrared reflected light oblique transillumination-* (RLOT) Intravitalmikroskopie durchdringt nah-infrarotes Licht ein Objektiv, daraufhin das Untersuchungspräparat und wird sodann an einer darunter liegenden, schrägen, spiegelnden Oberfläche reflektiert. Das Licht durchdringt das Präparat anschließend zum erneuten Male und wird im Gewebe in unterschiedliche Phasengradienten gebrochen.

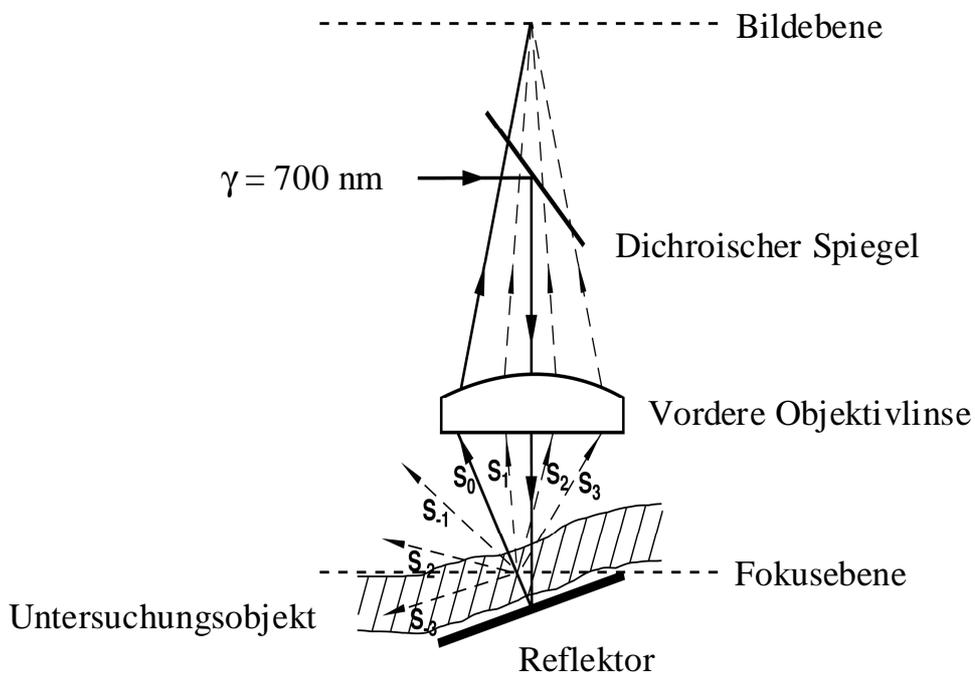


Abb. V/2: Vereinfachte Schemadarstellung des Lichtverlaufs bei RLOT-Intravitalmikroskopie [nach (112)].

Aus dieser Methode ergeben sich im Vergleich zu den konventionellen fluoreszenzmikroskopischen *in vivo* Verfahren diverse Vorteile. Die Reduktion der Hämoglobin- und Myoglobinentinktion durch den Einsatz von nah-infrarotem Licht ermöglicht eine kontrastreichere Visualisierung der Leukozyten im Gewebe. Weiterhin erlaubt die geringe Energieübertragung auf das Untersuchungspräparat durch die Verwendung von Licht im langwelligen Bereich längere Beobachtungszeiten bei gleichzeitiger Minimierung der Phototoxizität. Ferner liefert die Aufspaltung in unterschiedliche Phasengradienten sowie die höhere Eindringtiefe des nah-infraroten Lichts eine deutlich verbesserte Bildqualität, welche den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen überflüssig werden lässt und neben der dynamischen Analyse von transendothelialer und interstitieller Leukozytenmigration hierbei auch die Morphologie des Leukozyten zu studieren ermöglicht.

Die intravitale RLOT-Mikroskopie setzt allerdings voraus, dass sich das Untersuchungsobjekt, wie der *M. cremaster*, transilluminieren lässt. Des Weiteren ist anzumerken, dass das Auflösungsvermögen dieses intravitalmikroskopischen Verfahrens nicht dazu ausreicht, zwischen einzelnen Leukozytensubpopulationen zu differenzieren. Aus diesem Grund wurden histologische Schnitte des *M. cremaster* zur Phänotypisierung von transmigrierten Leukozyten immunhistochemisch gefärbt.

Die Blutfließgeschwindigkeit wurde, wie bereits unter *Material und Methoden* beschrieben, in postkapillären Venolen des *M. cremaster* mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Mikrosphären bestimmt. Um Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu erreichen, wurden ferner die Gefäßinnendurchmesser der untersuchten Gefäße gemessen und die Scherraten errechnet.

Um die Beobachtungszeit während der Versuche auf ein Minimum zu reduzieren, erfolgte die Auswertung sämtlicher, intravitalmikroskopisch erhobener Parameter *off-line*. Mit Hilfe einer computergestützten Bildanalyseeinheit, dem *Computer assisted microcirculation analysis system* CAMAS, wurden analoge Aufnahmen der Versuche quantitativ ausgewertet. Dieses Verfahren gilt in der internationalen Fachliteratur als anerkannt.

1.4.2 Histochemische und immunhistochemische Färbungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neben der intravitalmikroskopischen Analyse des leukozytären Rekrutierungsprozesses auch weiterführende histologische Untersuchungen an Gewebeproben des *M. cremaster* vorgenommen.

Unmittelbar nach der Entnahme sind Gewebeproben den Zersetzungsprozessen von Autolyse bzw. Fäulnis ausgesetzt und müssen daher konserviert werden. Hierfür stehen Fixationsmittel wie Formaldehyd oder Glutardialdehyd zur Verfügung, welche das Gewebe durch Proteinvernetzung vor diesen Abbauvorgängen schützen. Zur Verbesserung der Schneidbarkeit wird fixiertes Gewebe in Paraffin oder Kunststoff eingebettet. Mit einem Mikrotom lassen sich daraus histologische Schnitte erstellen, welche unter Verwendung histochemischer bzw. immunhistochemischer Techniken gefärbt werden können. Alternativ eignen sich dazu auch mit Hilfe von Kältetechniken erstellte Gefrierschnitte.

In den letzten Jahrhunderten wurde eine Vielzahl verschiedener histochemischer Färbeverfahren entwickelt, welche dazu dienen, unterschiedliche chemische Eigenschaften eines Gewebes sichtbar zu machen. Hierdurch ist es möglich, bestimmte Zellen bzw. zelluläre Komponenten in einem Gewebe zu identifizieren. Die gebräuchlichste Färbung zur Beurteilung krankhaften Gewebes ist heutzutage die auf dem Prinzip der Elektroadsorption beruhende Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), welche Zellkerne blau und das Zytoplasma rot erscheinen lässt. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde eine histochemische Färbung mit Toluidinblau zum Nachweis von Mastzellen durchgeführt.

In jüngster Zeit hat insbesondere die immunhistochemische Färbung von histologischen und zytologischen Präparaten an Bedeutung gewonnen. Dieses Verfahren erlaubt die spezifische Identifizierung immunologisch reaktiver Strukturen auf Zellen bzw. in subzellulären Kompartimenten. Grundlage der Immunhistochemie ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Zur Identifikation definierter Strukturen wird das zu untersuchende Präparat mit sog. primären Antikörpern, welche spezifisch an die entsprechenden antigenen Epitope binden, inkubiert. In weiteren Schritten werden Komponenten eines Detektionssystems zugeführt und damit die Anwesenheit des primären Antikörpers im Untersuchungspräparat, in der Regel durch eine Farbreaktion, nachgewiesen.

Im klinischen Gebrauch dient die Immunhistochemie vor allem der Identifizierung und Klassifizierung von Tumorzellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die immunhistochemische Färbung von in Formalin fixierten Gewebeschnitten zur Phänotypisierung transmigrierter Leukozyten verwendet.

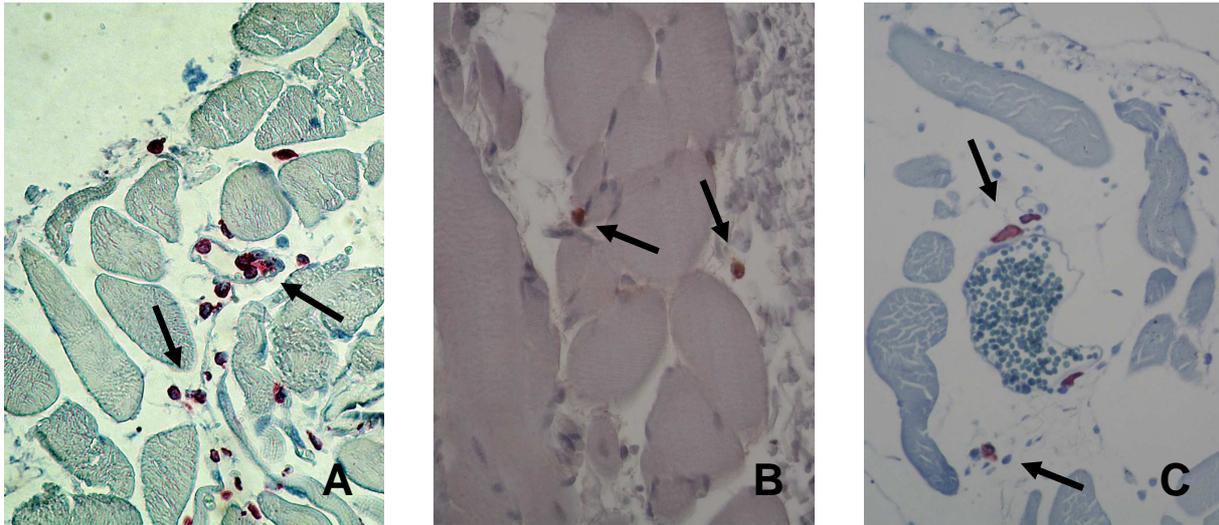


Abb. V/3: Gewebeschnitte des *M. cremaster* der Maus (40-fache Objektivvergrößerung). Ly-6G⁺ neutrophile Granulozyten (A; Pfeile), F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen (B; Pfeile) und Mastzellen in der histochemischen Toluidinblau-Färbung (C; Pfeile)

1.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Quantifizierung und Differenzierung von Zellen bzw. Zellbestandteilen. Hierbei werden Zellen, welche sich in einer Suspension befinden, in eine Kapillare gesaugt und anschließend einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Das Licht des Laserstrahls wird dabei abhängig von der Zellgröße, der Struktur der Zellmembran und des intrazellulären Aufbaus absorbiert, reflektiert oder gestreut. Hierdurch können die Zellen quantifiziert und mit Hilfe zweier Parameter in unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt werden: Das Vorwärtstreulicht (*Forward Scatter*) dient dabei als Maß für die Zellgröße und wird durch die Beugung des Laserstrahls an der Zelle erzeugt. Das Seitwärtstreulicht (*Sideward Scatter*) dient als Maß für die Granularität der Zelle und wird durch die Brechung des Lichts hervorgerufen. Zusätzlich erlaubt der Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper die Markierung definierter Oberflächenstrukturen. Hierdurch wird eine noch spezifischere Auftrennung und Charakterisierung der einzelnen Zellen ermöglicht.

Die Durchflusszytometrie ist ein in der Grundlagenforschung anerkanntes Verfahren zur morphologischen und molekularen Phänotypisierung von Einzelzellen. In der Klinik ist diese Methode mittlerweile als diagnostisches Routineverfahren in Immunologie, Infektiologie und Hämatologie etabliert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Analyse der Expression von Chemokinrezeptoren auf murinen Leukozyten eingesetzt.

2. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

2.1 Regulation der Rekrutierung von Leukozyten in das Gewebe

Unter physiologischen, nicht-inflammatorischen Bedingungen kommt es nur zu vereinzelt Interaktionen zwischen Leukozyten und der Gefäßwand postkapillärer Venolen (124). In der Mikrozirkulation von entzündetem Gewebe hingegen konnten intravitalmikroskopische Untersuchungen eine massive Akkumulation von Leukozyten nachweisen. Dabei sind Leukozyten zu beobachten, welche am Gefäßendothel entlang rollen, solche, die an der Gefäßwand fest adhären und andere, welche das Gefäß bereits verlassen haben und im interstitiellen Gewebe migrieren.

Gegenwärtig herrscht die Vorstellung, dass exogene bzw. endogene inflammatorische Stimuli Mechanismen in Gang setzen, welche die Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen induzieren. Die Folge dieser initialen Aktivierung sind zugleich reversible und transiente Interaktionen zwischen Leukozyten und dem Gefäßendothel, dem leukozytären *Rolling*. Nach weiterer Aktivierung kommt es zur *festen Adhärenz* des Leukozyten an der Gefäßwand und schließlich zur *Transmigration* über die Endothelzellbarriere hinweg in das Gewebe (17).

Dieser fein abgestimmte und kaskadenartig verlaufenden Prozess wird auf molekularer Ebene durch die Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle reguliert (117, 133, 171). Diese Adhäsionsmoleküle können nach strukturellen Gesichtspunkten in drei Hauptgruppen eingeteilt werden: *Selektine*, *Integrine* und *Immunglobulin-ähnliche Proteine*.

2.1.1 Selektine

Selektine sind Glykoproteine, welche mit Hilfe einer extrazellulären lektinähnlichen Bindungsdomäne niedrig-affine Bindungen mit fukosylierten Kohlenhydratstrukturen, mit phosphorylierten Mono- und Polysacchariden sowie mit sulfatierten Polysacchariden und Lipiden eingehen können. Es werden dabei leukozytäres L-Selektin (CD62L), endotheliales E-Selektin (CD62E) und endotheliales bzw. thrombozytäres P-Selektin (CD62P) unterschieden (158).

L-Selektin wird konstitutiv von der überwiegenden Mehrzahl der zirkulierenden Leukozyten exprimiert und an den Spitzen der leukozytären Mikrovilli präsentiert (168). Als Interaktionspartner fungieren neben den o.g. Strukturen auch Kollagen Typ IV, das Sialomucin *mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1* (MAdCAM-1) sowie die Mitglieder der sog. *peripheral node adressins* (PNAd) *glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1* (GlyCAM-1), CD34, Podocalyxin, und Endomucin (158). Nach Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bzw. Monozyten wird L-Selektin innerhalb von

Minuten proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten („shedding“) (72). In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass L-Selektin das leukozytäre Rolling sowohl unter physiologischen wie auch unter inflammatorischen Bedingungen mediiert (158).

P-Selektin wird in den α -Granula von Thrombozyten bzw. Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen gespeichert. Innerhalb weniger Minuten nach Stimulation dieser Zellen mit z.B. Sauerstoffradikalen, Histamin oder Thrombin kommt es zur Translokation von P-Selektin auf die Zelloberfläche (158). Leukozytärer *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) dient neben den o.g. niedrig-affinen Molekülen als hoch-affiner Interaktionspartner von P-Selektin (126). Ähnlich wie L-Selektin ist P-Selektin für das Leukozytenrolling während physiologischer und inflammatorischer Bedingungen von entscheidender Bedeutung (158). Zudem vermittelt P-Selektin auch das Rollen von Thrombozyten auf aktiviertem Endothel und wird darüber hinaus für Interaktionen zwischen Leukozyten und Thrombozyten mitverantwortlich gemacht (89, 93).

Tab. V/1: Nomenklatur, Expression, Liganden und Regulation von Selektinen [nach (158)].

Molekül	CD	Expression	Liganden	Regulation
L-Selektin	CD62L	Granulozyten Monozyten Lymphozyten	PSGL-1 CD44 Kollagen Typ IV MAdCAM-1 PNAd	konstitutiv
P-Selektin	CD62P	Thrombozyten Endothelzellen	PSGL-1 Heparin	induzierbar (min)
E-Selektin	CD62E	Endothelzellen	PSGL-1 CD44, CD43 CD62L CD11/CD18	induzierbar (h)

Im Gegensatz zu den beiden vorher genannten Vertretern aus der Familie der Selektine wird E-Selektin, unter Ausnahme der kutanen Mikrogefäße, erst einige Stunden nach Stimulation mit bestimmten Entzündungsmediatoren auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert

(11). Verschiedenste *in vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, dass dieses Molekül in Kooperation mit P-Selektin für das leukozytäre Rolling von wesentlicher Bedeutung ist (94).

2.1.2 Integrine

Integrine sind nicht-kovalent-verbundene Heterodimere, welche aus einer α - und einer β -Kette bestehen. Sie werden als transmembranäre Proteine auf der Oberfläche unterschiedlichster Zellen exprimiert und verbinden das Zytoskelett einer Zelle mit der extrazellulären Matrix bzw. mit dem Zytoskelett einer anderen Zelle. Für die Rekrutierung von Leukozyten sind vor allem das β_1 -Integrin *very late activation antigen-4* (VLA-4) sowie die β_2 -Integrine *leukocyte function-associated antigen-1* (LFA-1), Mac-1 und p150/95 wesentlich (19, 171).

Tab. V/2: Nomenklatur, Expression, Liganden und Regulation von leukozytären Integrinen [nach (55)].

Molekül	CD	Expression	Liganden
VLA-4	CD49d/CD29	Lymphozyten, Monozyten NK-Zellen, Basophile, Eosinophile	VCAM-1 Fibronectin Thrombospondin
LFA-1	CD11a/CD18	Lymphozyten Monozyten Granulozyten	ICAM-1 – ICAM-5 JAM-A
Mac-1	CD11b/CD18	Granulozyten Monozyten Lymphozyten	ICAM-1,-2 iC3b, Fibrinogen, Fibronectin, Heparin
p150/95	CD11c/CD18	Monozyten Makrophagen Granulozyten	iC3b Fibrinogen

Die leukozytären Integrine werden konstitutiv auf unterschiedlichen Subpopulationen exprimiert und befinden sich auf zirkulierenden Leukozyten in einem nicht-aktiven Zustand. Nach Aktivierung des Leukozyten durch Interaktion leukozytärer Chemokinrezeptoren mit auf dem Gefäßendothel präsentierten Chemokinen kommt es über komplexe intrazelluläre

Signaltransduktionswege zu sterischen Konformationsänderungen des Integrins, woraus letztlich die Bindung an entsprechende Liganden ermöglicht wird. Dieser Vorgang wird als „inside-out signaling“ bezeichnet (19, 171). Umgekehrt kann die Bindung des Liganden an das Integrin zur Signaltransduktion in das Zellinnere führen und Proliferation, Differenzierung, Geninduktion, Sekretion von Botenstoffen oder Apoptose der Zelle induzieren. Man spricht hierbei vom „outside-in signaling“ (19, 171). Bei den genannten Signaltransduktionswegen scheinen insbesondere Tyrosinkinasen wie z.B. Syk eine entscheidende Rolle zu spielen (151). Darüber hinaus kann die Expression von Integrinen auf der Oberfläche von Leukozyten unter dem Einfluss bestimmter Entzündungsmediatoren moduliert werden (19, 171).

Das β_1 -Integrin VLA-4 wird von Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen sowie von basophilen und eosinophilen Granulozyten exprimiert, nicht aber von neutrophilen Granulozyten. Als Interaktionspartner von VLA-4 konnten die Matrixproteine Fibronectin und Thrombospondin sowie *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, identifiziert werden (19, 171). VLA-4 vermittelt Rolling und feste Adhärenz von Lymphozyten (2) und ist ferner an der Regulation fester Adhärenz und transendothelialer Migration von Monozyten beteiligt (65, 111).

Alle drei β_2 -Integrine LFA-1, Mac-1 und p150/95 werden auf Granulozyten, Monozyten und NK-Zellen exprimiert. Zirkulierende Lymphozyten hingegen tragen hauptsächlich LFA-1 auf ihrer Zelloberfläche (19). LFA-1 bindet vorwiegend an die Immunglobulin-ähnlichen Proteine *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und ICAM-2 sowie an JAM-A. Es scheint dabei eine wesentliche Rolle für feste Adhärenz und Transmigration von Leukozyten zu spielen (19, 171). Mac-1 bindet nicht an JAM-A, kann aber zusätzlich Interaktionen mit Fibrinogen, Fibronectin und Heparin sowie dem Komplementfaktor iC3b eingehen und vermittelt feste Leukozytenadhärenz (19, 37, 171). Das Molekül p150/95 scheint jedoch nur an Komponenten des Komplementsystems sowie an Fibrinogen zu binden und keine funktionelle Relevanz für die feste Adhärenz von Leukozyten zu besitzen (12, 145).

2.1.3 Immunglobulin-ähnliche Proteine

Die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sind transmembranäre Glykoproteine, welche durch die Anzahl ihrer extrazellulären Immunglobulin-Domänen charakterisiert werden. Die Expression dieser endothelialen Adhäsionsmoleküle erfolgt teilweise konstitutiv, sie kann jedoch auch durch den Einfluss von Entzündungsmediatoren und biomechanischen

Kräften über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- κ B reguliert werden (171).

ICAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül, welches fünf Immunglobulin-Domänen aufweist und auf Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten, Monozyten/Makrophagen sowie glatten Muskelzellen zu finden ist (145, 170). In verschiedensten *in vitro* und *in vivo* Studien konnte nachgewiesen werden, dass ICAM-1 über die Interaktion mit LFA-1 bzw. Mac-1 feste Adhärenz von Leukozyten vermittelt (117, 133, 171).

VCAM-1 verfügt über sechs bzw. sieben Immunglobulin-Domänen und wird einige Stunden nach Stimulation mit z.B. *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *Lipopolysaccharid* (LPS), IL-1, IL-4 oder IL-13 sowie durch Scherkräfte auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert (170). Als Bindungspartner von p150/95 ist VCAM-1 an der Regulation fester Adhärenz von Lymphozyten, Monozyten sowie eosinophilen und basophilen Granulozyten beteiligt (117, 133, 171).

Tab. V/3: Nomenklatur, Expression, Liganden und Regulation von Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie [nach (117)].

Molekül	CD	Expression	Liganden	Regulation
ICAM-1	CD54	Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, glatte Muskelzellen	LFA-1 Mac-1	konstitutiv, induzierbar (h)
ICAM-2	CD102	Endothelzellen, Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, glatte Muskelzellen	LFA-1 Mac-1	konstitutiv
VCAM-1	CD106	Endothelzellen, glatte Muskelzellen	VLA-4	induzierbar
PECAM-1	CD31	Endothelzellen, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten	PECAM-1	konstitutiv

PECAM-1 besitzt sechs extrazelluläre Immunglobulin-Domänen. Es wird auf Endothelzellen sowie auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten, bestimmten T-Lymphozyten-

Subpopulationen und Thrombozyten exprimiert (122). Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen belegen, dass PECAM-1 eine entscheidende Rolle für die transendotheliale Migration von Leukozyten spielt (117, 133, 171). Ferner konnte gezeigt werden, dass PECAM-1 auf Endothelzellen an der Detektion von Scherkräften und der Signaltransduktion in das Zellinnere beteiligt ist (166).

ICAM-2 besitzt lediglich zwei extrazelluläre Immunglobulin-Domänen und wird wie ICAM-1 auf einer Vielzahl von Zelltypen konstitutiv exprimiert (177). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass ICAM-2 die transendotheliale Migration von Leukozyten stimulus-spezifisch und unabhängig von PECAM-1 mediiert (63).

2.1.4 Junctional adhesion molecules und andere an der Leukozytenrekrutierung beteiligten Moleküle

Die JAMs bilden eine Untergruppe der „Immunglobulin-Superfamilie“, welche durch strukturhomologe, extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche loops, Phosphorylierungsstellen innerhalb des zytoplasmatischen Endes und C-terminale PDZ-Bindungsdomänen charakterisiert sind (38). Sie sind auf Endothel- und Epithelzellen im Bereich der „tight junctions“ zu finden und werden auch auf Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten exprimiert. JAM-Proteine scheinen eine wichtige Rolle für die Zusammensetzung von „tight junctions“ zu spielen und sind darüber hinaus an der Transmigration von Leukozyten, der Aktivierung von Thrombozyten, der Angiogenese sowie an der Bindung des Reovirus beteiligt. Bislang sind fünf verschiedene Mitglieder dieser Familie bekannt: JAM-A, JAM-B, JAM-C, JAM-4 und JAM-L (101).

JAM Proteine besitzen die Eigenschaft, neben homophilen Interaktionen auch heterophile Interaktionen einzugehen. JAM-A scheint dabei an das β_2 -Integrin LFA-1, das β_3 -Integrin $\alpha_V\beta_3$ und das Reovirusprotein $\sigma 1$ zu binden (101). Wie eingangs bereits erwähnt, wird die Bedeutung von JAM-A für die Rekrutierung von Leukozyten in der Fachliteratur kontrovers diskutiert (127). Die Ergebnisse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu JAM-A sollen unter Kapitel V/2.3 näher erläutert werden.

Das auf vaskulären und lymphatischen Endothelzellen exprimierte JAM-B interagiert mit JAM-C und dem β_1 -Integrin $\alpha_4\beta_1$ (29). Das Protein JAM-C ist darüber hinaus auch auf Leukozyten zu finden und scheint über Interaktionen mit dem β_2 -Integrin Mac-1 bzw. mit JAM-B an der Transmigration von Leukozyten beteiligt zu sein (6).

Als jüngste Vertreter aus der Familie der JAMs konnte JAM-4 bisher nur auf Epithelzellen nachgewiesen werden (58). JAM-L wurde lediglich auf der Oberfläche von Leukozyten

identifiziert (182). Die funktionelle Relevanz dieser Proteine für die Migration von Leukozyten ist derzeit noch nicht eindeutig geklärt.

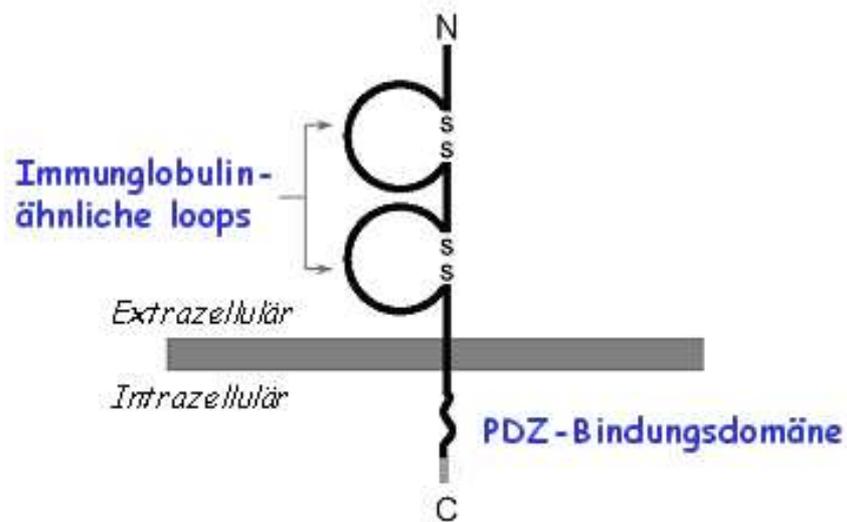


Abb. V/4: Vereinfachte Schemadarstellung der Molekülstruktur von JAMs [nach (101)].

Ein weiteres, erst kürzlich beschriebenes, JAM-verwandtes Protein ist ESAM. Es wird konstitutiv im Bereich der „tight junctions“ von Endothelzellen exprimiert und konnte darüber hinaus auch auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten nachgewiesen werden (59, 120). Jüngste Untersuchungen zeigen, dass ESAM möglicherweise als Signalmolekül die Öffnung interendothelialer Zellkontakte induziert und somit die Transmigration von Leukozyten erleichtert (175).

Tab. V/4: Junctional adhesion molecules [nach (101)].

Molekül	Expression	Liganden
JAM-A	Endothel-/Epithelzellen, Leukozyten, Thrombozyten, Erythrozyten	LFA-1, $\alpha_v\beta_3$, Reovirusprotein $\sigma 1$
JAM-B	Endothelzellen	JAM-C, $\alpha 4\beta 1$
JAM-C	Endothelzellen, Leukozyten	JAM-B, Mac-1
JAM-4	Epithelzellen	MAGI-1
JAM-L	Leukozyten	CAR

Über die Öffnung interendothelialer Zellkontakte scheint auch *vascular endothelial cadherin* (VE-Cadherin) die Rekrutierung von Leukozyten zu regulieren (51). VE-cadherin ist ein Mitglied aus der Familie der Cadherine, welches im Bereich der *adherens junctions* von Endothelzellen exprimiert wird und für die Stabilisierung interendothelialer Zellkontakte verantwortlich ist (90). Die Mechanismen, welche der ESAM- bzw. VE-Cadherin-abhängigen Leukozytenmigration zugrunde liegen, sind bislang nicht vollständig aufgeklärt.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass auch das Molekül CD99 in den Prozess der transendothelialen Migration von unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen involviert ist (97, 150). CD99 ist ein O-glykosiliertes Transmembranprotein, welches keine strukturelle Ähnlichkeit zu einer bisher bekannten Proteinfamilie aufweist. Es wird auf Endothelzellen, den meisten Leukozytensubpopulationen und auf Erythrozyten exprimiert (133). Ob CD99 beim leukozytären Transmigrationsprozess als Adhäsionsmolekül fungiert oder als Signalmolekül z.B. die Öffnung interzellulärer Kontakte vermittelt, ist bislang nicht erforscht. Zusammenfassend sind die an Rolling und fester Adhärenz von Leukozyten beteiligten Adhäsionsmoleküle durch zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien größtenteils identifiziert. Die funktionelle Relevanz der Adhäsions- bzw. Signalmoleküle für die transendotheliale Migration von Leukozyten hingegen ist bislang weitgehend ungeklärt, ebenso die Mechanismen der interstitiellen Migration. Darüber hinaus ist die Regulation der einzelnen

Adhäsions- und Signalmoleküle durch biomechanische Kräfte wie z.B. Scherkräfte sowie durch unterschiedliche humorale Faktoren wie z.B. Zytokine und Chemokine unzureichend verstanden.

Tab. V/5: Weitere am leukozytären Rekrutierungsprozess beteiligte Moleküle [nach (101)].

Molekül	Expression	Liganden
ESAM	Endothelzellen, Thrombozyten	?
VE-Cadherin	Endothelzellen	?
CD99	Endothelzellen, Leukozyten, Erythrozyten	CD99

Die Rekrutierung bestimmter Leukozytenpopulationen in ein bestimmtes Gewebe scheint in diesem Zusammenhang auf einem fein abgestimmten Zusammenspiel aller am leukozytären Extravasationsprozess beteiligten Faktoren (Adhäsionsmoleküle, biomechanische Kräfte und humoralen Faktoren) zu beruhen. Dabei sind jedoch auch der Zeitpunkt im inflammatorischen Geschehen sowie Art und Lokalisation der unterschiedlichen Einflussfaktoren von wesentlicher Bedeutung. So können z.B. gewebespezifische Unterschiede in der Expression von Adhäsionsmolekülen, wie sie z.B. für ICAM-1 und PECAM-1 bekannt sind, zur selektiven Rekrutierung einzelner Leukozytensubpopulationen beitragen (25, 132). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass die Rekrutierung von Leukozyten einer stimulus-spezifischen Regulation unterliegt. So können die Adhäsionsmoleküle PECAM-1 und ICAM-2 abhängig von den entsprechenden inflammatorischen Bedingungen jeweils eine unterschiedliche Rolle beim leukozytären Transmigrationsprozess spielen (63, 163). Schließlich ist bislang nicht abschließend geklärt, welche funktionelle Relevanz die transzelluläre Migration transmigrierender Leukozyten besitzt und welche molekularen Prozesse hierfür wesentlich sind.

Die Herausforderung der Zukunft ist, diejenigen Mechanismen zu identifizieren, welche für die Rekrutierung bestimmter Leukozytensubpopulationen in ein bestimmtes Gewebe unter bestimmten inflammatorischen und nicht-inflammatorischen Bedingungen verantwortlich

sind. Das Ziel ist, pharmakologische Strategien zu entwickeln, welche eine spezifische Kontrolle des leukozytären Extravasationsprozesses erlauben.

2.2 Weiterentwicklung des Kremastermodells zur Untersuchung der Leukozytenrekrutierung bei I/R

Das Kremastermodell bietet die Möglichkeit, unter Verwendung moderner Intravitalmikroskopische Techniken wie der RLOT-Intravitalmikroskopie alle Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses bei den unterschiedlichsten Entzündungsformen zu untersuchen. Bislang wurden dabei proinflammatorische Substanzen systemisch oder intraskrotal appliziert bzw. in einem Superfusat gelöst verabreicht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Versuchsmodell etabliert werden, welches am *M. cremaster* der Maus alle Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses nach I/R zu untersuchen erlaubt. Bisherige Studien konzentrierten sich im postischämischen Kremastermuskel auf die fluoreszenzmikroskopische Analyse von Leukozytenrolling und -adhärenz. Die Visualisierung der transendothelialen Migration von Leukozyten war unter Verwendung herkömmlicher fluoreszenzmikroskopischer Methoden stark eingeschränkt, die interstitielle Leukozytenmigration wurde nach I/R bisher nicht untersucht.

Um ein für unsere Zwecke optimales Versuchsmodell zu etablieren, wurden die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses systematisch in Abhängigkeit von Ischämie- und Reperfusionsdauer analysiert. Hierbei wurden Ischämiezeiten von 30, 60 und 90 min verwendet und die Dauer der Reperfusion jeweils auf 120 min begrenzt. Die Auswahl der entsprechenden Zeitintervalle orientierte sich an bisher publizierten Studien (75, 134). Längere Ischämie- und Reperfusionzeiten sind im verwendeten experimentellen Setting mit Spontanatmung bei Intrapertonealnarkose nicht möglich, da diese die Gesamtversuchsdauer soweit verlängern würden, dass die Ausfallquote deutlich ansteige.

Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass nach 30 min Ischämie und 60 bzw. 120 min Reperfusion gegenüber den Ausgangsbedingungen ein signifikanter Anstieg der Anzahl adhärenter und transmigrierter Leukozyten zu verzeichnen ist. Eine Verlängerung der Ischämiezeit von 30 min auf 60 bzw. 90 min zeigte zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten keine zusätzlichen Effekte im Sinne einer Steigerung von Leukozytenadhärenz und -transmigration. Ähnliche Beobachtungen sind auch bei der Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen Leber beschrieben und könnten darauf hindeuten, dass im *M. cremaster* bereits eine Ischämiedauer von 60 bzw. 90 min zu einer Schädigung des

mikrovaskulären Endothels führt, welche es unmöglich macht, die Bedeutung endothelialer Adhäsionsmoleküle und intrazellulärer Mechanismen zu analysieren (77). Aufgrund dieser Befunde wurde in allen folgenden Experimenten ein Versuchsprotokoll mit 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion verwendet.

In einem nächsten Schritt sollte der leukozytäre Rekrutierungsprozess in Tieren nach 30-minütiger Ischämie des *M. cremaster* im Vergleich zu schein-operierten Tieren untersucht werden.

Die chirurgische Präparation induzierte in den postkapillären Venolen des *M. cremaster* ein leichtes Leukozytenrolling. Untersuchungen von Ley und Mitarbeitern konnten eine Beteiligung von P-Selektin und ICAM-1 nachweisen (85). Im weiteren Versuchverlauf wurden bezüglich des leukozytären Rolling keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Tieren nach I/R und schein-operierten Tieren festgestellt. In anderen Versuchsreihen, welche wie die Untersuchungen zu den Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 zu späteren Zeitpunkten durchgeführt wurden, zeigten sich jedoch unterschiedliche Ergebnisse: Fünf Minuten nach Einsetzen der Reperfusion war dabei die Anzahl rollender Leukozyten in WT-Mäusen im Vergleich zu schein-operierten Tieren auf mehr als das doppelte erhöht. Im zeitlichen Verlauf fiel diese Erhöhung jedoch wieder auf Baseline-Niveau ab und erreichte nach 120-minütiger Reperfusion schließlich ein Plateau. Ähnliche Verläufe des postischämischen Leukozytenrolling im *M. cremaster* sind in der Literatur beschrieben (75). Darüber hinaus ist bekannt, dass bereits die chirurgische Präparation des *M. cremasters* eine Translokation von P-Selektin aus den endothelialen Weibel-Palade-Körperchen auf die Endothelzelloberfläche induziert und somit abhängig von der Traumatisierung des Muskels zu einem Anstieg des Leukozytenrolling führen kann. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der einzelnen Versuchsreihen ist daher am wahrscheinlichsten auf Lerneffekte bei der Präparation des Kremastermuskels zurückzuführen.

Des Weiteren war schon nach 5-minütiger Reperfusion ein deutlicher Anstieg der Anzahl fest adhärenter Leukozyten in WT-Mäusen im Vergleich zu schein-operierten Tieren zu beobachten. Dieser Anstieg persistierte während des gesamten Versuchverlaufes. Daten aus der Literatur belegen, dass das endothelial exprimierte Molekül ICAM-1 und das leukozytäre β_2 -Integrin Mac-1 an der Regulation der Leukozytenadhärenz im postischämischen *M. cremaster* beteiligt sind (42).

Nach dem Einsetzen der Reperfusion kam es in WT-Mäusen im Vergleich zu schein-operierten Tieren zu einem stetigen Anstieg der Leukozytentransmigration. Die Analyse immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitte zeigte, dass über 80 % der transmigrierten

Leukozyten Ly-6G⁺ neutrophile Granulozyten und ca. 10 – 15 % F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen waren. Im Kremastermodell konnte bislang nachgewiesen werden, dass das Adhäsionsmolekül PECAM-1 für die Regulation der Leukozytentransmigration während I/R verantwortlich ist (165).

Schließlich waren nach 120 min Reperfusion etwa 60 % der extravasierten Leukozyten nach ihrer Transmigration mindestens 25 µm in das interstitielle Gewebe hinein migriert. Intravitalmikroskopische Zeitrafferaufnahmen dokumentieren, dass diese Leukozyten dabei ungerichtet im perivaskulären Gewebe migrieren (80). Über die der postischämischen interstitiellen Leukozytenmigration zugrunde liegenden Mechanismen ist *in vivo* nur wenig bekannt. Jüngste Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe deuten auf eine Beteiligung von *Matrix-Metalloproteinasen* (MMPs) hin (80). Ferner konnte gezeigt werden, dass unter anderen inflammatorischen Bedingungen L-Selektin von wesentlicher Bedeutung für die interstitielle Leukozytenmigration ist (57).

Zusammenfassend ist es gelungen, ein Versuchsprotokoll am *M. cremaster* der Maus zu etablieren, welches alle Schritte des leukozytären Extravasationsprozesses während I/R zu untersuchen erlaubt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Rekrutierung von Leukozyten in das postischämische Gewebe von der Dauer der Reperusionszeit abhängig ist. Darüber hinaus deuten die vorliegenden *in vivo* Daten darauf hin, dass Ischämiezeiten von 60 und 90 min zu den von uns gewählten Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zu 30 min Ischämie keine zusätzliche Rekrutierung von Leukozyten induzieren. Aufgrund dieser Befunde wurden die nachfolgenden Experimente anhand eines Versuchsprotokolls mit 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion durchgeführt.

2.3 Bedeutung von JAM-A für die Leukozytenrekrutierung

JAM-A ist ein Typ-I-Transmembranprotein mit zwei extrazellulären, Immunglobulin-ähnlichen Domänen, welches auf Endothel- und Epithelzellen sowie auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Thrombozyten und Erythrozyten exprimiert wird (33, 101). Erste Hinweise auf die Beteiligung von JAM-A bei der Transmigration von Leukozyten gab es bereits vor mehr als acht Jahren (33, 102). Seither wurde eine Reihe inkonsistenter Daten zur funktionellen Relevanz dieses Moleküls publiziert (vgl. Tab. I/1). In der vorliegenden Studie sollte daher die Bedeutung von JAM-A für die Rekrutierung von Leukozyten während unterschiedlicher inflammatorischer Bedingungen untersucht und darüber hinaus die Rolle des endothelial exprimierten JAM-A näher charakterisiert werden.

Der leukozytäre Rekrutierungsprozess wurde am *M. cremaster* von WT- und JAM-A-defizienten Mäusen unter unterschiedlichen inflammatorischen Bedingungen mit Hilfe der RLOT-Intravitalmikroskopie quantitativ analysiert.

Unsere Befunde weisen auf eine entscheidende Rolle von JAM-A für die Transmigration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten nach IL-1 β -induzierter Entzündung und I/R hin. Im Gegensatz dazu, hatte JAM-A keine Bedeutung für die Leukozytentransmigration nach Stimulation mit LTB₄. Ähnliche Ergebnisse wurden in Experimenten mit dem anti-JAM-A-Antikörper BV-11 erzielt, welche zeitgleich und unabhängig von unseren Untersuchungen durch Prof. Dr. Sussan Nourshargh und Mitarbeiter aus dem Imperial College London, London, UK, durchgeführt wurden. Diese Befunde sind somit die ersten Hinweise dafür, dass JAM-A-vermittelte Leukozytentransmigration stimulusabhängig ist.

Die Mechanismen, welche der Eigenschaft von JAM-A, die Transmigration von Leukozyten stimuluspezifisch zu regulieren, zugrunde liegen, sind gegenwärtig nicht bekannt. Interessanterweise finden sich jedoch Parallelen zwischen unseren Befunden und früheren Beobachtungen zur PECAM-1- und ICAM-2-abhängigen Leukozytentransmigration. So konnte gezeigt werden, dass IL-1 β -induzierte Transmigration von Leukozyten sowohl von PECAM-1- wie auch von ICAM-2 abhängig ist, wohingegen die durch TNF- α hervorgerufene Leukozytentransmigration unabhängig von diesen endothelialen Adhäsionsmolekülen zu sein scheint (63, 163). Erklärt werden diese Phänomene durch die potentielle Fähigkeit bestimmter Entzündungsmediatoren, am Entzündungsgeschehen beteiligte Zellpopulationen differentiell zu aktivieren. Inflammatorische Stimuli wie IL-1 β oder I/R, welche eine JAM-A-, PECAM-1- und ICAM-2-abhängige Transmigration von Leukozyten induzieren, scheinen Mechanismen in Gang zu setzen, welche die Transmigration von Leukozyten primär über eine Aktivierung von Endothelzellen vermitteln (127). Im Gegenzug scheint die Stimulation mit LTB₄, PAF oder TNF- α zu einer direkten Aktivierung des Leukozyten zu führen, JAM-A, PECAM-1 und ICAM-2-abhängige Pathways zu umgehen und andere Mechanismen wie β_2 /ICAM-1- oder ESAM-abhängige Pathways für die transendotheliale Leukozytenmigration zu initiieren (127). Darüber hinaus wird diskutiert, dass diese Pathways neben der parazellulären Transmigration auch eine transzelluläre Transmigration von Leukozyten induzieren (9, 116). Jüngste Studien haben allerdings gezeigt, dass dieser transzelluläre Transmigrationsweg nur von einem geringen Teil (5 – 15 %) der transmigrierenden Leukozyten genutzt wird (20, 41, 116).

Zusätzlich zur Nutzung alternativer Transmigrationswege, könnten auch weitere Faktoren zur Stimulus-Abhängigkeit des leukozytären Rekrutierungsprozesses beitragen. Kürzlich wurde

gezeigt, dass PECAM-1-abhängige Transmigration von Leukozyten nicht allein von den inflammatorischen Bedingungen sondern auch vom genetischen Hintergrund der eingesetzten Versuchstiere abhängig ist (149). Diese Beobachtungen deuten auf molekulargenetische Faktoren für die PECAM-1-abhängige Leukozytentransmigration hin. Da Ähnliches auch für JAM-A- und ICAM-2-medierte Ereignisse gelten könnte, ist es vorstellbar, dass die stimulusabhängigen Regulation des leukozytären Transmigrationsprozesses durch JAM-A auch Ausdruck bestimmter Expressionsmuster von verschiedenen Adhäsionsmolekülen ist. Folglich könnte JAM-A-vermittelte Leukozytentransmigration nicht nur entzündungsspezifisch, sondern auch gewebespezifisch sein.

Interessanterweise war die Inhibition der Leukozytentransmigration in Mäusen, welche mit BV-11 behandelt wurden, stets größer als jene in JAM-A-defizienten Tieren. Diese Befunde deuten auf Kompensationsmechanismen in JAM-A-defizienten Mäusen hin, welche derzeit noch nicht geklärt sind und z.B. durch andere Adhäsionsmoleküle vermittelt sein könnten. Ferner war die Transmigration von Leukozyten weder in JAM-A-defizienten Mäusen noch in Mäusen, welche BV-11 erhielten, vollständig inhibiert. In diesem Zusammenhang wurde von Prof. Nourshargh und Mitarbeitern die Bedeutung von PECAM-1 näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine simultane Blockade von JAM-A und PECAM-1 im Vergleich zu alleiniger Blockade von JAM-A bzw. PECAM-1 zu keinen additiven Effekten bei der Inhibition der Leukozytentransmigration führt. Welche Rolle in diesem Zusammenhang andere Adhäsions- bzw. Signalmoleküle wie ESAM, CD99 und VE-Cadherin oder die Inanspruchnahme transzellulärer Transmigrationswege spielen, ist derzeit noch nicht geklärt. Während sowohl in Tieren mit JAM-A-Defizienz wie auch in WT-Tieren nach Vorbehandlung mit BV-11 spezifisch der Schritt der Leukozytentransmigration inhibiert war, war die Leukozytenadhärenz unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen wie bei LTB₄-induzierter Entzündung in JAM-A-defizienten Tieren gegenüber WT-Tieren signifikant erhöht. Die Ursache dafür ist gegenwärtig unklar, allerdings könnten diese Befunde damit zusammenhängen, dass JAM-A mit seinem zytoplasmatischen Ende an verschiedene intrazelluläre Moleküle bindet, welche wie Rap-1 die adhäsiven Eigenschaften von Cadherinen und Integrinen regulieren. *In vitro* Untersuchungen zeigten in diesem Zusammenhang, dass JAM-A-defiziente Leukozyten unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen eine erhöhte Adhäsivität zu Protein-überzogenen Oberflächen bzw. Endothelzellen besitzen (28).

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass JAM-A *in vitro* für die Migration von dendritischen Zellen von wesentlicher Bedeutung ist (21). Als Maß für das interstitielle

Migrationsverhalten von Leukozyten wurde deshalb die Gewebeverteilung transmigrierter Leukozyten bestimmt. Während JAM-A-Defizienz nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion sowie nach 4-stündiger Stimulation mit IL-1 β keinen Einfluss auf das interstitielle Migrationsverhalten transmigrierter Leukozyten besitzt, waren transmigrierte Leukozyten nach LTB₄-induzierter Entzündung in JAM-A-defizienten Tieren verglichen mit WT-Tieren signifikant weniger weit vom Gefäß in das perivaskuläre Gewebe hinein migriert. Die Ursache für das veränderte Migrationsverhalten JAM-A-defizienter Leukozyten bei LTB₄-induzierter Entzündung könnte eine verminderte Aktivierung (eigentlicher) intrazellulärer Bindungspartner des JAM-A-Moleküls sein, welche für die Organisation zytoskelettaler Aktinfilamente mitverantwortlich sind (28).

Der Grund, warum JAM-A keine Bedeutung für die interstitielle Migration transmigrierter Leukozyten nach I/R bzw. nach 4-stündiger Stimulation mit IL-1 β zu besitzen scheint, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Die Gesamtheit unserer Ergebnisse lässt jedoch folgende Hypothese zu:

Unter der Annahme, dass JAM-A das interstitielle Migrationsverhalten ausschließlich derjenigen Leukozyten reguliert, für deren transendotheliale Migration JAM-A von essentieller Bedeutung ist (nach I/R bzw. nach 4-stündiger Stimulation mit IL-1 β), kann die funktionelle Relevanz von JAM-A für die interstitielle Migration dieser „JAM-A-abhängiger“ Leukozyten durch die Blockade der transendothelialen Migration in JAM-A-defizienten Tieren (nach I/R bzw. nach 4-stündiger Stimulation mit IL-1 β) nicht detektiert werden. Bei LTB₄-induzierter Entzündung hingegen – ein inflammatorischer Stimulus, welcher eine JAM-A-unabhängige Leukozytentransmigration induziert – können diese „JAM-A-abhängigen“ Leukozyten die Endothelzellbarriere in JAM-A-defizienten Tieren ungehindert passieren und zeigen ihre veränderten Eigenschaften erst bei der interstitiellen Migration im perivaskulären Gewebe. Demzufolge lassen diese Überlegungen den Schluss zu, dass JAM-A unabhängig von den entsprechenden inflammatorischen Bedingungen funktionelle Relevanz für die interstitielle Migration von Leukozyten besitzen könnte.

JAM-A wird sowohl auf murinen Leukozyten wie auch auf murinen Endothelzellen und anderen Zellpopulationen exprimiert (28, 102). Aufgrund der kontroversen Datenlage (vgl. Tab. I/1) zur Bedeutung von endotheliale JAM-A gegenüber der Funktion von leukozytärem JAM-A bei der Transmigration von Leukozyten wurde der leukozytäre Rekrutierungsprozess in Mäusen mit endothelspezifischer JAM-A-Defizienz untersucht. In unseren Experimenten am *M. cremaster* konnten wir zeigen, dass endotheliales JAM-A eine entscheidende Rolle bei der Transmigration von Leukozyten nach IL-1 β -induzierter

Entzündung und nach I/R spielt. Ähnliche Beobachtungen wurden zuvor im Modell des hepatischen I/R-Schadens gemacht (81). Ferner wurden diese Befunde durch die Ergebnisse von Zelltransferexperimenten der Arbeitsgruppe von Prof. Nourshargh bestätigt. Im Gegensatz dazu, war die Leukozytenrekrutierung aber sowohl in einem Thioglycollat-Peritonitis-Modell wie auch nach myokardialer I/R von einer endothelialen JAM-A-Defizienz unbeeinflusst (28). Vielmehr war die Leukozytenrekrutierung in chimerischen Mäusen, deren zirkulierende Leukozyten kein JAM-A exprimierten, bei Thioglycollat-induzierter Peritonitis signifikant vermindert (28). Letztere Befunde in Herz und Peritoneum deuten daher, im Gegensatz zu den Befunden in Leber und Skelettmuskel, auf eine funktionelle Bedeutung des leukozytär exprimierten JAM-A für die Transmigration von Leukozyten hin.

Die Ursache für diese kontroversen Ergebnisse ist derzeit nicht verstanden. Gegenwärtig werden mehrere Erklärungsansätze diskutiert. Einerseits könnten die unterschiedlichen inflammatorischen Bedingungen in den zuvor genannten Studien eine Erklärung für diese kontroversen Befunde liefern und die inkonsistenten Ergebnisse somit Variabilität in der Expression von JAM-A sowie Kompensation durch andere Adhäsionsmoleküle widerspiegeln. Andererseits könnten die unterschiedlichen Befunde in den einzelnen Entzündungsmodellen aber auch durch eine potentielle Gewebespezifität der JAM-A-vermittelten Leukozytenmigration erklärt werden.

Bei einem exakten Vergleich der bisher publizierten und als kontrovers erachteten Studien fällt allerdings auf, dass die Bedeutung des endothelialen JAM-A bislang in unterschiedlichen Phasen einer inflammatorischen Antwort untersucht wurde. Während die Rekrutierung von Leukozyten in Leber und Skelettmuskel bei akuter Entzündung (2 – 4 h) beobachtet wurde (81), wurde die Leukozyteninfiltration von Herz und Peritonealhöhle zu späteren Zeitpunkten (6 – 24 h) quantitativ analysiert. Aus diesem Grund wurde der leukozytäre Rekrutierungsprozess in der vorliegenden Arbeit systematisch sowohl nach 4-stündiger wie auch nach 24-stündiger IL-1 β -induzierter Entzündung analysiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass endotheliales JAM-A die Transmigration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten zwar initial nach Stimulation mit IL-1 β reguliert, zu einem späteren Zeitpunkt jedoch keine Bedeutung mehr für die Transmigration dieser Zellen besitzt. Diese Befunde könnten somit einen Erklärungsansatz für die bereits publizierten und bisher als kontrovers interpretierten Studien zur Bedeutung des endothelialen JAM-A liefern.

Die Mechanismen, welcher dieser im zeitlichen Verlauf differentiellen Regulation der Leukozytentransmigration zugrunde liegen, sind bislang nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung könnte in einer im zeitlichen Verlauf geringer werdende Expression von

endotheliales JAM-A („Downregulation“) liegen. PCR-Untersuchungen zeigten im *M. cremaster* jedoch eine im zeitlichen Verlauf verstärkte RNA-Expression von JAM-A nach 24-stündiger Stimulation mit IL-1 β und konnten diese Hypothese nicht bestätigen. Ein immunhistochemischer Nachweis des JAM-A-Proteins, welcher derzeit nur an Kryoschnitten durchgeführt werden kann, erlaubte am *M. cremaster* keine eindeutige Zuordnung von JAM-A zu endothelialen Strukturen und ließ deshalb keine Rückschlüsse auf das Expressionsverhalten dieses Adhäsionsmoleküls zu.

Allerdings scheint endotheliales JAM-A nach Stimulation mit bestimmten inflammatorischen Zytokinen von den interzellulären Zellkontakten auf die Oberfläche der Endothelzelle transloziert zu werden, somit seine Funktion für die transendotheliale Migration von Leukozyten zu verlieren und durch eine potentielle Implementierung anderer Adhäsionsmoleküle von seiner ursprünglichen Rolle abgelöst zu werden. Dieser als „Redistribution“ des endothelialen JAM-A bezeichnete Vorgang könnte die im zeitlichen Verlauf veränderte Funktion des endothelialen JAM-A erklären. Die Existenz dieses Mechanismus wird in der aktuellen Fachliteratur allerdings noch kontrovers diskutiert und bedarf weiterer Abklärung (154, 155).

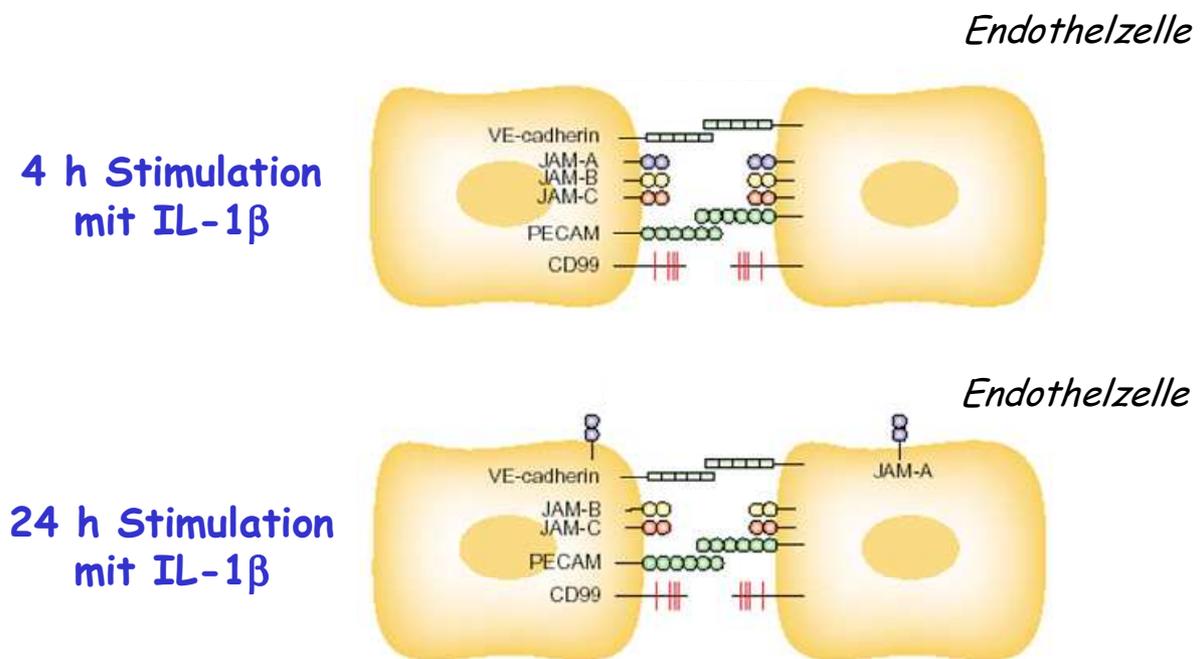
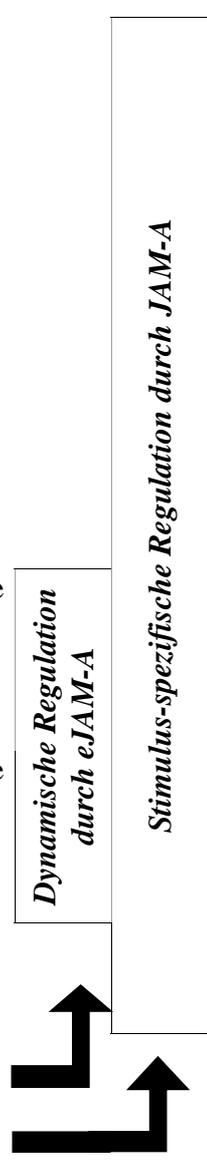


Abb. V/5: Vereinfachte Schemadarstellung der Redistribution des endothelialen JAM-A im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit IL-1 β [nach (117)].

Interessanterweise zeigen unsere Untersuchungen auch, dass die Transmigration von Leukozyten nach 24-stündiger Stimulation mit IL-1 β in Tieren mit einer kompletten JAM-A-Defizienz im Vergleich zu WT-Tieren signifikant vermindert war. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass leukozytäres JAM-A die Transmigration von Leukozyten auch unabhängig von Interaktionen mit dem endothelialen JAM-A beeinflussen kann. Da nach gegenwärtigem Kenntnisstand endotheliales JAM-A der einzige Interaktionspartner des leukozytären JAM-A ist, muss davon ausgegangen werden, dass leukozytäres JAM-A auch auf andere Weise als durch Interaktionen mit Adhäsionsmolekülen die Transmigration von Leukozyten reguliert. Dabei könnte leukozytäres JAM-A durch seinen Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts funktionelle Relevanz für den sog. „*shape change*“ des Leukozyten besitzen, welcher für die parazelluläre Passage bei der leukozytären Transmigration wesentlich ist. Diese Hypothese wird durch Beobachtungen gestützt, welche in JAM-A-defizienten Tieren nach 24-stündiger Stimulation mit IL-1 β ein verändertes interstitielles Migrationsverhalten transmigrierter Leukozyten zeigen und somit auf einen zu diesem Zeitpunkt noch relevanten Einfluss von JAM-A auf die zytoskelettale Organisation hindeuten. Die vorliegenden Befunde geben daher Hinweise auf eine doppelte Funktion des leukozytären JAM-A als Adhäsionsmolekül und als Modulator der zytoskelettalen Organisation bei leukozytären Formveränderungen.

Zusammenfassend geben unsere Untersuchungen Hinweise auf die Beteiligung des Moleküls JAM-A beim leukozytären Transmigrationsprozess *in vivo*. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass JAM-A Bedeutung für das interstitielle Migrationsverhalten transmigrierter Leukozyten besitzt. Schließlich deuten die Ergebnisse unserer Experimente sowohl auf eine Stimulus-spezifische wie auch auf eine im zeitlichen Verlauf differentielle Regulation der leukozytären Transmigration durch endothelial bzw. leukozytär exprimiertes JAM-A hin und liefern somit Erklärungsansätze für die bisher inkonsistenten Daten zur funktionellen Relevanz dieses Adhäsionsmoleküls bei der transendothelialen Migration von Leukozyten.

Tab. V/6: Erklärungsansätze für die bisher inkonsistenten Daten zu den Auswirkungen der Blockade von JAM-A [nach (127)].

Modell	Blockade	Auswirkungen	Erklärungsansatz
Boyden chamber	mAB	Verminderte Monozytentransmigration	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> <p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Dynamische Regulation durch eJAM-A</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto; margin-top: 10px;"> <p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Stimulus-spezifische Regulation durch JAM-A</p> </div> 
Flusskammer	mAB	<u>Keine</u> Verminderung der Leukozytentransmigration	
Dermatitis	mAB	Verminderte Monozyteninfiltration	
Entzündliche Meningitis	mAB	Verminderte Infiltration durch Neutrophile/ Monozyten	
Virale/bakterielle Meningitis	mAB	<u>Keine</u> Verminderung der Leukozyteninfiltration	
Peritonitis	genetisch	Verminderte Infiltration durch Neutrophile	
I/R der Leber	genetisch	- Verminderte Infiltration durch Neutrophile - Regulation durch <u>endotheliales</u> JAM-A - Verstärkter Gewebeschaden	
I/R des Herzens	genetisch	- Verminderte Infiltration durch Neutrophile - Regulation durch <u>leukozytäres</u> JAM-A - Verstärkter Gewebeschaden	
Verzögerte Hypersensitivität	genetisch	Verstärkte Migration von dendritischen Zellen zu Lymphknoten	
M. cremaster	genetisch mAB	- Dynamische Regulation der Leukozytentransmigration durch eJAM-A - Stimulus-spezifische Regulation der Leukozytentransmigration durch JAM-A - Regulation der interstitiellen Leukozytenmigration	

2.4 Bedeutung der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 für die Leukozytenrekrutierung bei Entzündung und I/R

Im dritten und letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 für die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses bei Chemokin-induzierter Entzündung und während I/R untersucht.

Tab. V/7: Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 [nach (118, 167)].

Rezeptor	Expression	Liganden
Ccr1	Neutrophile, basophile, eosinophile Granulozyten; Monozyten, NK-Zellen, Lymphozyten, Dendritische Zellen	MIP-1 α , RANTES, MIP-1, MCP-3, MCP-4, HCC-1, HCC-2, HCC-3, HCC-4, HCC-5
Ccr2	Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, NK-Zellen	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP4
Ccr5	Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Thymozyten, Lymphozyten, Dendritische Zellen	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES

Wie in der Literatur bereits beschrieben, führt die intraskrotale Applikation der CC Chemokine MCP-1 bzw. MIP-1 α im *M. cremaster* der Maus zu einer signifikanten Induktion von leukozytärer Adhärenz, Transmigration und interstitieller Migration (169). Die Mechanismen, welche diesen Beobachtungen zugrunde liegen, sind bislang nicht vollständig verstanden. Gegenwärtig herrscht die Vorstellung, dass die applizierten Chemokine in den Kremastermuskel diffundieren und im interstitiellen Gewebe an Glycosaminoglycane (GAGs) gebunden werden. Dabei kann es zu einer Aktivierung von Zellen im interstitiellen Gewebe wie z.B. Gewebsmakrophagen und Mastzellen kommen. Darüber hinaus wird angenommen, dass Chemokine sowohl passiv durch interzelluläre Kontakte diffundieren wie auch aktiv mit Hilfe von spezifischen Transportmolekülen durch Endothelzellen hindurchgeschleust und anschließend auf der luminalen Endothelzelloberfläche, ebenfalls an GAGs gebunden, präsentiert werden (115). Auf diese Weise können auf dem Gefäßendothel rollenden Leukozyten mit Chemokinen interagieren (142, 161). Welche Bedeutung die mit den applizierten Chemokinen interagierenden Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 dabei für

die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses besitzen, war bisher nur unvollständig geklärt.

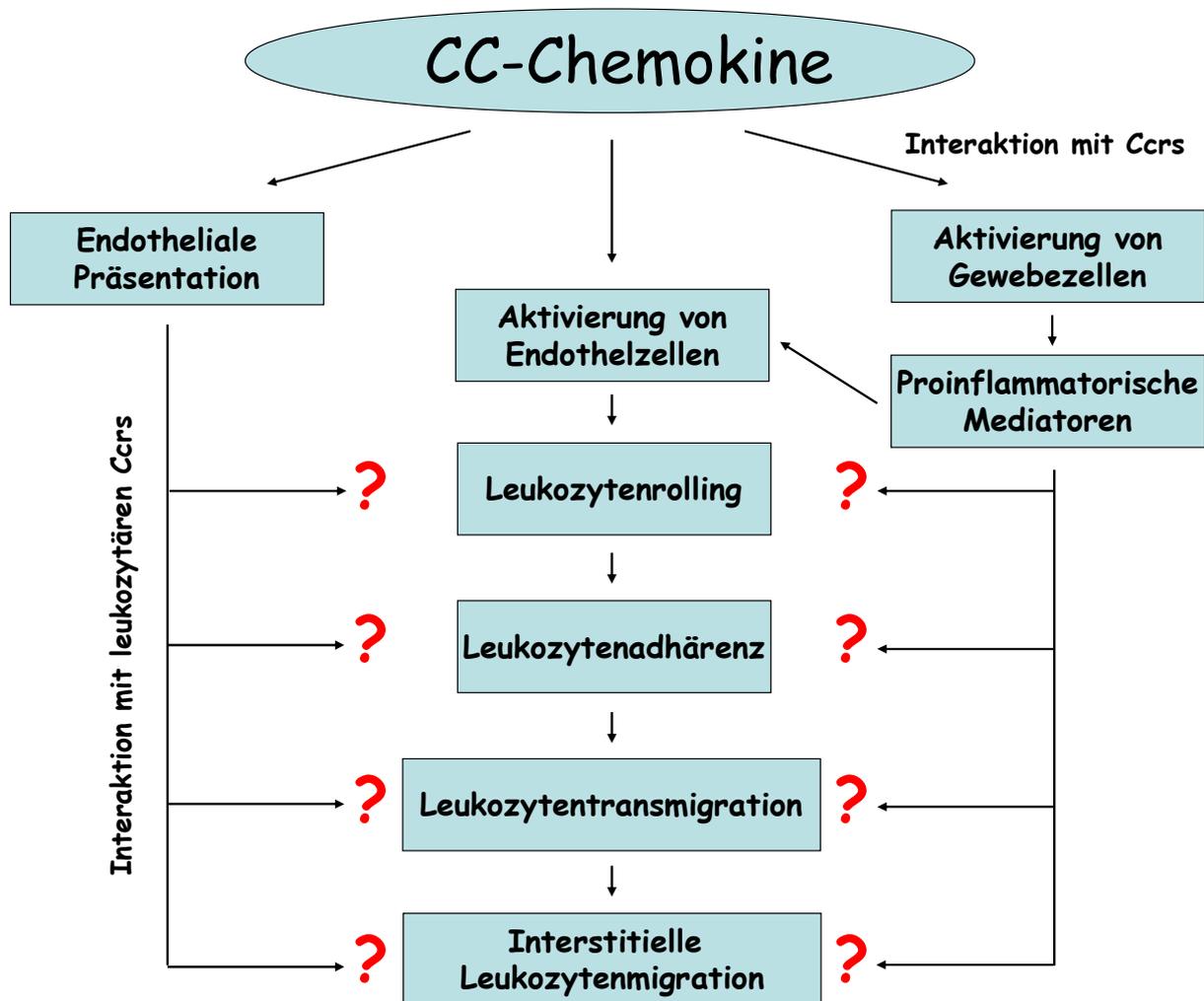


Abb. V/6: Vereinfachte Schemadarstellung möglicher Mechanismen der durch CC Chemokine induzierten Leukozytenrekrutierung.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Rolle des Chemokinrezeptors Ccr2 für die MCP-1-induzierte Leukozytenmigration analysiert. Ccr2 wird auf der Oberfläche unterschiedlicher Leukozytenpopulationen exprimiert und kann Interaktionen mit den Chemokinen MCP-1, -2, -3 und -4 eingehen (118, 167). Unsere intravitalmikroskopischen Befunde deuten darauf hin, dass der Chemokinrezeptor Ccr2 *in vivo* feste Adhärenz und (konsekutive) transendotheliale Migration von Leukozyten bei MCP-1-induzierter Entzündung vermittelt und bestätigen somit die Beobachtungen von Kuziel und Mitarbeitern (88). Darüber hinaus zeigte die

Untersuchung immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitte erstmals, dass Ccr2 dabei vor allem für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten verantwortlich ist. Ferner lassen unsere Daten darauf schließen, dass Ccr2 keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten transmigrierter Leukozyten besitzt.

In weiteren Experimenten wurde die funktionelle Relevanz des Chemokinrezeptors Ccr1 für die Rekrutierung von Leukozyten nach Stimulation mit MIP-1 α , einem Ccr1-Liganden, untersucht. Ccr1 konnte auf neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie auf Monozyten, Lymphozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen nachgewiesen werden und dient als Rezeptor für unterschiedliche CC Chemokine (118, 167). Die vorliegenden Befunde zeigen erstmalig, dass der Chemokinrezeptor Ccr1 *in vivo* an der Regulation von Adhärenz und (konsekutiver) Transmigration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten beteiligt ist (123). *In vitro* Untersuchungen konnten bereits nachweisen, dass Ccr1 feste Adhärenz und Transmigration von humanen Monozyten und bestimmten T-Zell-Subpopulationen vermittelt (174). Des Weiteren war Ccr1-Defizienz bzw. pharmakologische Blockade durch den Ccr1-Antagonisten BX471 in verschiedenen Entzündungsmodellen mit einer verminderten Rekrutierung von Leukozyten assoziiert. Dabei zeigten sich schädliche Effekte wie z.B. nach Infektion mit *Toxoplasma gondii*, aber auch protektive Effekte wie z.B. bei Hydronephrose oder Herztransplantation (4, 47, 76).

Zuletzt wurde untersucht, welche Rolle der Chemokinrezeptor Ccr5 für die MIP-1 α -induzierte Rekrutierung von Leukozyten spielt. Ccr5 wird auf einer Reihe unterschiedlicher Leukozytenpopulationen exprimiert und ist Bindungspartner von MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Ccr5 *in vivo*, ähnlich wie Ccr1, Adhärenz und (konsekutive) transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei MIP-1 α -induzierter Entzündung mediiert. Die Bedeutung von Ccr5 wird in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert. Bisherige *in vitro* Befunde deuten darauf hin, dass Ccr5 selektiv die transendotheliale Migration von Monozyten und bestimmten T-Zellsubpopulationen reguliert (174). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ccr5 die Migration von CD8⁺ Lymphozyten in entzündetes Gewebe reguliert, wohingegen Ccr5-Defizienz bei einem Tiermodell der Tuberkulose mit einer erhöhten Leukozyten-Infiltration der Lunge verbunden war (1, 98). Die Ursache für diese inkonsistenten Daten ist derzeit nicht bekannt, könnte aber z.B. auf entzündungs- bzw. gewebespezifische Effekte zurückzuführen sein oder auf eine spezifische Relevanz dieses Chemokinrezeptors für bestimmte Leukozytensubpopulationen hindeuten.

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen im Modell der Chemokin-induzierten Entzündung, dass Ccr1, Ccr2 und Ccr5 *in vivo* feste Adhärenz und (konsekutive) transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten vermitteln. Welche Bedeutung diese Chemokinrezeptoren für die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses bei der klinisch relevanteren Entzündungsform von I/R besitzen, wurde in einer abschließenden Versuchsreihe systematisch untersucht.

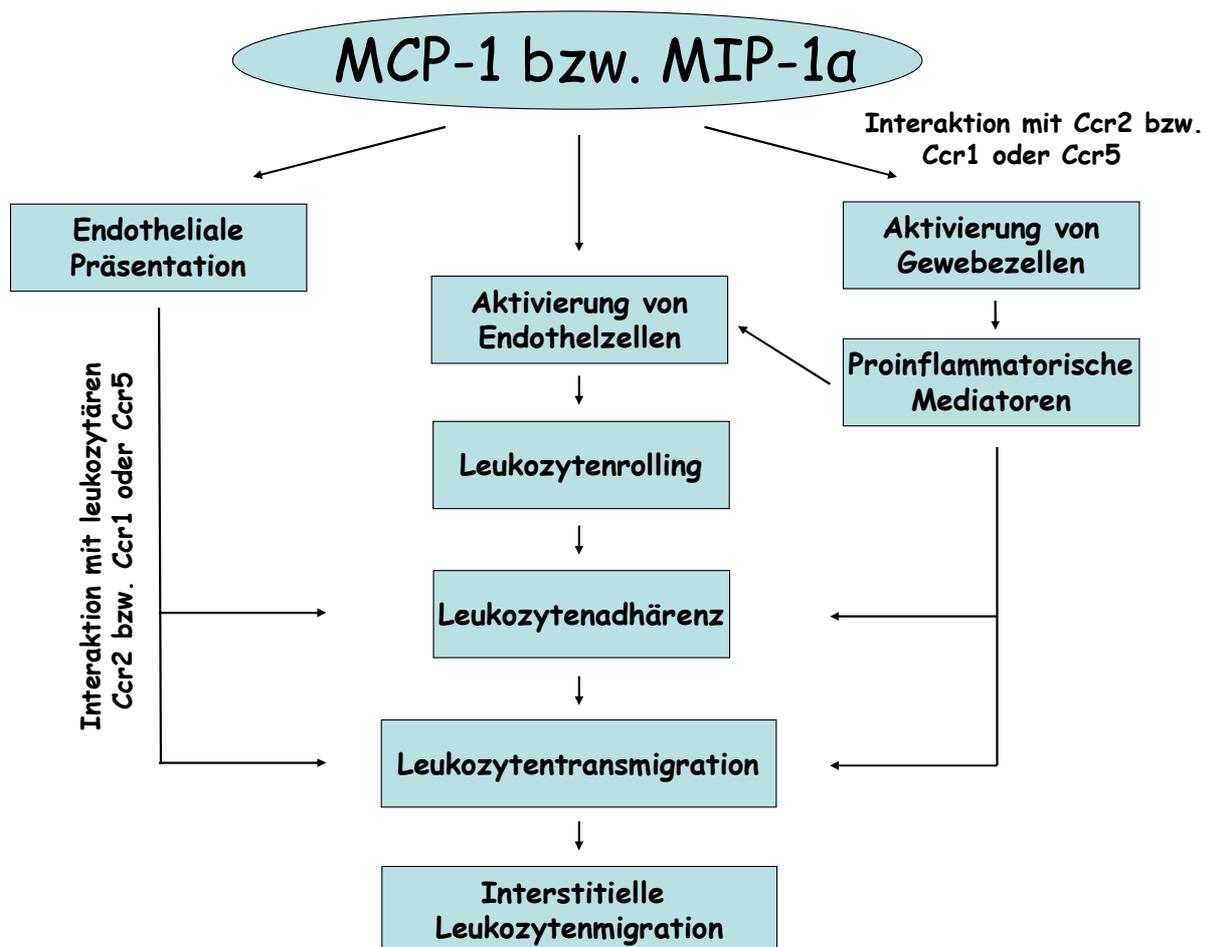


Abb. V/7: Vereinfachte Schemadarstellung möglicher Mechanismen der Regulation leukozytärer Adhärenz und (konsekutiver) Transmigration durch Ccr1, Ccr2 bzw. Ccr5 bei der MCP-1- bzw. MIP-1 α - induzierten Rekrutierung von Leukozyten.

In den letzten Jahrzehnten konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden, dass I/R zu einer Schädigung des betroffenen Gewebes führt, welche eng mit der Infiltration von Leukozyten assoziiert ist (54, 71, 141). Allerdings mehren sich in letzter Zeit die Hinweise darauf, dass infiltrierende Leukozyten auch zu Geweberegeneration beitragen können (3, 49,

81, 95). Dies hat zu einer differenzierteren Betrachtung dieser Zellpopulation bei der Pathogenese des I/R-Schadens geführt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 sowie MIP-1 α , ein Ligand des Chemokinrezeptors Ccr1, eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten in das reperfundierte Gewebe spielen (45, 83, 160). Die Bedeutung von Ccr1, Ccr2 und Ccr5 für die einzelnen Schritte des leukozytären Extravasationsprozesses während I/R wurde bislang jedoch noch nicht charakterisiert.

In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 nicht in die Mechanismen des postischämischen Leukozytenrolling involviert sind. Damit befinden sich diese Daten in Übereinstimmung mit unseren bisherigen Untersuchungen zur Bedeutung der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 bei Chemokin-induzierter Entzündung.

Feste Adhärenz am Gefäßendothel ist der zweite Schritt im kaskadenartig verlaufenden Prozess der Leukozytenrekrutierung und ist zugleich Voraussetzung für transendotheliale und interstitielle Migration von Leukozyten (17). Unsere Befunde belegen, dass Ccr1, Ccr2, und Ccr5 eine wichtige Rolle bei der festen Adhärenz von Leukozyten unter postischämischen Bedingungen spielen. Auch diese Ergebnisse sind im Einklang mit unseren Beobachtungen bei Chemokin-induzierter Entzündung.

Allerdings ist es uns in den Untersuchungen zur Bedeutung von Ccr1, Ccr2, und Ccr5 bei I/R nun erstmalig gelungen, zu zeigen, dass diese Chemokinrezeptoren unterschiedlich in jene Mechanismen involviert sind, welche feste Adhärenz von Leukozyten in der initialen Reperfusionphase vermitteln. Während Ccr1 und Ccr5 die Leukozytenadhärenz vor allem zu Beginn der Reperfusionphase regulieren, scheint Ccr2 erst zu späteren Zeitpunkten in diesen Prozess einzugreifen. Eine Erklärung für diese Befunde könnte die Beteiligung von Monozyten bzw. Makrophagen bei der Pathogenese des Ischämie-Reperfusionsschadens liefern. Während die funktionelle Relevanz von Monozyten/Makrophagen für die Heilungsphase nach I/R in der Literatur gut dokumentiert ist, ist über die Bedeutung dieser Zellpopulation in der frühen Reperfusionphase nur wenig bekannt (119). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass neben neutrophilen Granulozyten auch Monozyten das postischämische Gewebe bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach Einsetzen der Reperfusion infiltrieren und dort eine Reihe proinflammatorischer Mediatoren freisetzen (13, 44, 56). Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass Ccr2⁺ mononukleäre Leukozyten starke Mediatoren der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sind (106). Es wird angenommen, dass die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren durch aktivierte Ccr2⁺ Monozyten und T-

Zellen sekundär zu einer weiteren Extravasation von neutrophilen Granulozyten führt. Folglich könnte die Ccr2-abhängige feste Adhärenz von Leukozyten am postischämischen Gefäßendothel eines Zusammenspiels zwischen unterschiedlichen Leukozyten-subpopulationen wie neutrophilen Granulozyten und Ccr2⁺ mononukleären Zellen bedürfen und deshalb im zeitlichen Verlauf verzögert sein.

Des Weiteren könnten neuere Befunde, welche belegen, dass die Expression des Ccr2-Liganden MCP-1 von der Expression des CXC Chemokins MIP-2 abhängig ist, eine weitere Erklärung für die verzögerten Effekte von Ccr2 bei der Leukozytenadhärenz während I/R liefern (162). Unsere Ergebnisse könnten daher auch bestimmte Expressionsprofile von Chemokinen im zeitlichen Verlauf der initialen Reperfusionphase widerspiegeln und somit auf eine Hierarchie von Chemokinen und deren Rezeptoren während I/R hinweisen.

Um in das extravaskuläre Kompartiment zu gelangen müssen Leukozyten sowohl die Endothelbarriere als auch die Basalmembran überwinden. In unseren Experimenten konnten wir nachweisen, dass die Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 zur Rekrutierung von Leukozyten in das reperfundierte Gewebe beitragen. Es zeigte sich, dass 80 – 90 % der transmigrierten Leukozyten Ly-6G⁺ neutrophile Granulozyten und 5 – 10 % F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen waren. Ccr1-, Ccr2- und Ccr5-Defizienz war mit keiner Veränderung des Anteils Ly6G⁺ und F4/80⁺ Leukozyten an allen CD45⁺ Leukozyten verbunden. Wir schließen daraus, dass Ccr1, Ccr2, und Ccr5 eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Extravasation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei I/R spielt. Diese Befunde decken sich mit Beobachtungen in anderen Organen. Sowohl Ccr2-Defizienz in der reperfundierten Niere als auch Blockade von MIP-1 α in der postischämischen Lunge waren mit einer verminderten Leukozyteninfiltration des jeweiligen Gewebes assoziiert (45, 83). Darüber hinaus konnte in unseren Untersuchungen zum ersten Mal die funktionelle Relevanz des Chemokinrezeptors Ccr1 für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bei I/R nachgewiesen werden. Studien unter anderen inflammatorischen Bedingungen stützen diese Befunde (123, 136). Allerdings hatte die Blockade des Chemokinrezeptors Ccr5 nach fokaler zerebraler Ischämie in Mäusen keine Auswirkungen auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (160). In derselben Studie schien Ccr5 jedoch die Infiltration des postischämischen Gehirns mit Makrophagen zu regulieren. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnten organspezifische Effekte sein, da zusätzlich zu zirkulierenden Leukozyten und Endothel-/Epithelzellen, auch ortsständige Zellen, welche einen bestimmten Gewebetyp charakterisieren, eine herausragende Rolle bei Entzündung spielen (48, 74).

In diesem Zusammenhang sollen vor allem Gewebemastzellen unmittelbar nach Einsetzen der Reperfusion eine Reihe von Substanzen freisetzen, welche die Extravasation von neutrophilen Granulozyten initiieren (74). Ferner konnte Ccr1, Ccr2 und Ccr5 auf Mastzellen nachgewiesen werden und es wurde gezeigt, dass diese Zellpopulation *in vivo* bei der CC Chemokin-induzierten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle spielt (128, 169). Darüber hinaus zeigte sich, dass MIP-1 α *in vivo* die Extravasation von neutrophilen Granulozyten durch eine sequentielle Freisetzung von TNF- α und LTB₄ mediiert (135, 137). Folglich könnten CC Chemokine die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten während der postischämischen Entzündungsantwort indirekt über eine intermediäre Aktivierung von Gewebszellen wie z.B. Mastzellen und die daraus resultierende Freisetzung weiterer proinflammatorischer Mediatoren triggern.

Interessanterweise konnten wir in weiteren Untersuchungen belegen, dass Ccr1-, Ccr2- und Ccr5-Defizienz nicht mit einer veränderten Anzahl von Mastzellen im *M. cremaster* assoziiert ist. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in Chemokinrezeptor-defizienten Mäusen eher das Ergebnis einer geringeren Mastzellaktivierung reflektieren könnte als die Folge einer verminderten Mastzellichte im Kremastermuskel Chemokinrezeptor-defizienter Tiere zu sein scheint.

Darüber hinaus ist es uns gelungen, erstmals nachzuweisen, dass die Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 auf der Oberfläche von nativen, murinen neutrophilen Granulozyten exprimiert werden. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass Ccr2- und Ccr5-abhängige feste Adhärenz und (konsekutive) Transmigration von neutrophilen Granulozyten in das postischämische Gewebe auch direkt durch Interaktionen zwischen diesen Chemokinrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten und deren entsprechenden Chemokinliganden vermittelt wird.

Die Frage, ob die Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 die transendotheliale Migration von Leukozyten direkt regulieren oder ob die beobachteten Effekte nur die Folge einer verminderten Leukozytenadhärenz sind, kann in dieser *in vivo* Studie nicht abschließend geklärt werden. Allerdings sprechen *in vitro* Daten dafür, dass CC Chemokine und deren Rezeptoren neben der Leukozytenadhärenz auch den Schritt der Transmigration durch die Modulation des Aktivierungsstatus von leukozytären Integrinen mediierten (172-174). Dabei sollen Interaktionen zwischen aktivierten Integrinen und deren Bindungspartnern, wie z.B. JAM-A oder JAM-C (171), die transendotheliale Migration von Leukozyten vermitteln. Deshalb könnte die verminderte Leukozytenrekrutierung in Chemokinrezeptor-defizienten Tieren sowohl die Folge einer reduzierten Leukozytenadhärenz als auch das Ergebnis von

Auswirkungen auf Mechanismen sein, welche direkt in den leukozytären Transmigrationsprozess eingreifen.

Allerdings hatte Ccr1-, Ccr2- und Ccr5-Defizienz während I/R jeweils keine vollständige Blockade der Leukozytentransmigration zur Folge, was auf die Beteiligung weiterer Mechanismen hinweist. In diesem Zusammenhang könnten Adhäsionsmoleküle wie z.B. CD31, CD99, JAM-A, JAM-C und ESAM, welche auf der Oberfläche von Endothelzellen bzw. Leukozyten exprimiert werden, oder auch leukozytäre Proteasen diesen Prozess unabhängig von den jeweils untersuchten Chemokinrezeptoren medieren (80, 179).

Nach ihrer transendothelialen Migration sollen Leukozyten schließlich entlang eines Chemokingradienten zum Ort der Entzündung migrieren (140). Während I/R können die unterschiedlichsten Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten, Gewebsmakrophagen und Mastzellen, Quelle von Mediatoren sein, welche die Fortbewegung von Leukozyten innerhalb des interstitiellen Gewebes vermitteln. In unseren Versuchen konnten wir mit Hilfe der RLOT-Intravitalmikroskopie beobachten, dass I/R die Migration von Leukozyten im perivaskulären Gewebe induziert. Interessanterweise war Ccr1-, Ccr2- und Ccr5-Defizienz ähnlich wie bei der Chemokin-induzierten Leukozytenrekrutierung auch bei dieser Entzündungsform nicht mit einer veränderten Gewebeverteilung transmigrierter Leukozyten assoziiert.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass Ccr1, Ccr2 und Ccr5 durch die Regulation fester Adhärenz und (konsekutiver) transendothelialer Migration sowohl bei Chemokin-induzierter Entzündung wie auch während I/R zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten beitragen. Zusätzlich konnten wir nachweisen, dass diese Chemokinrezeptoren unter den jeweiligen inflammatorischen Bedingungen keinen Einfluss auf das interstitielle Migrationsverhalten transmigrierter Leukozyten besitzen. Schließlich erlauben unsere intravitalmikroskopischen Befunde Einblicke in die dynamische bzw. differentielle Regulation der Leukozytenextravasation während der frühen Reperfusionphase durch die Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5.

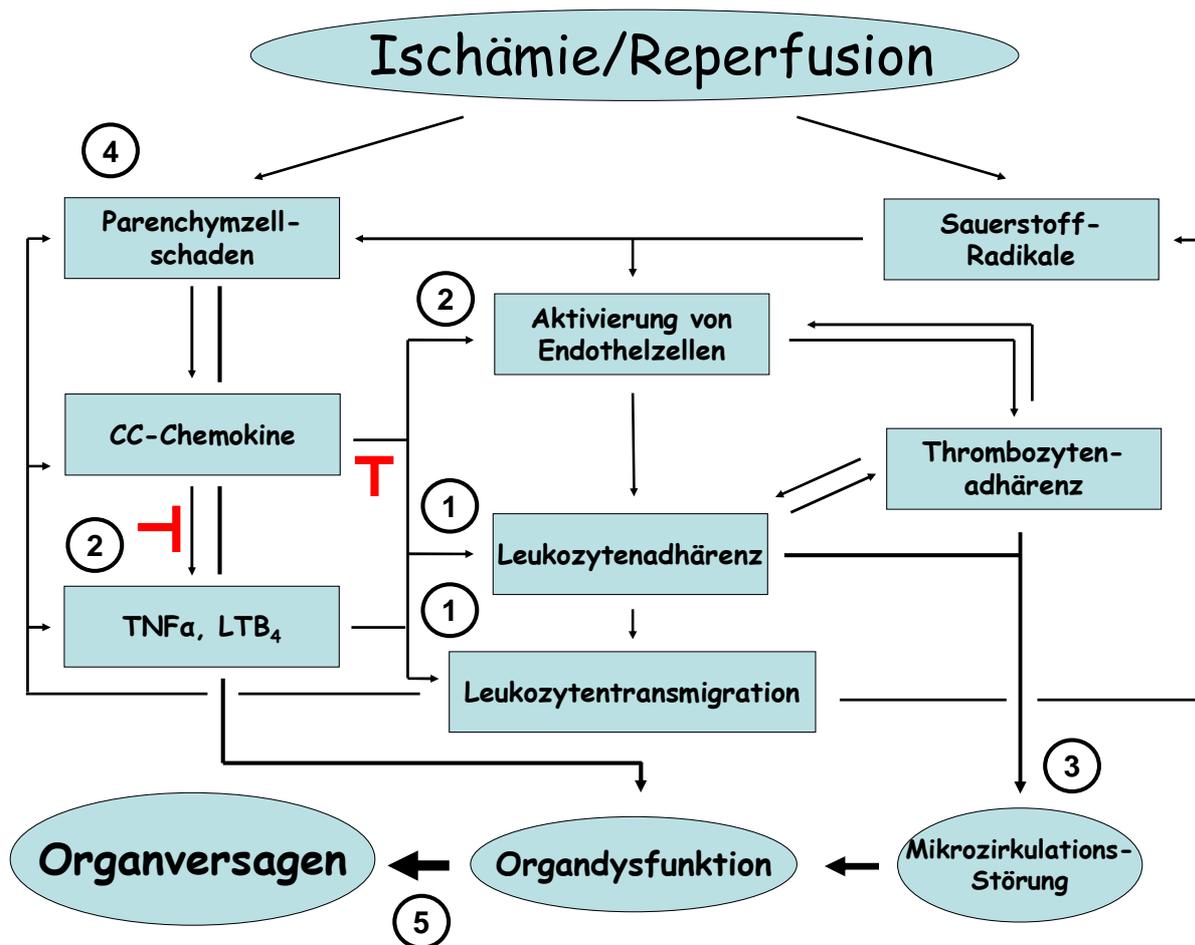


Abb. V/8: Vereinfachtes pathophysiologisches Konzept zur Blockade der Rezeption von CC Chemokinen über Ccr1, Ccr2 oder Ccr5 bei I/R: Die Blockade der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 oder Ccr5 führt durch Inhibition (1) von Interaktionen mit leukozytären Ccrs z.B. über Veränderungen der Integrin-Affinität und/oder (2) mit nicht-leukozytären Ccrs z.B. über Sekretion von Entzündungsmediatoren und Aktivierung von Endothelzellen zur Verminderung leukozytärer Adhärenz und (konsekutiver) Transmigration. Die Folge ist eine Abschwächung der durch intravasale Thrombozyten-/Leukozytenkonglomerate bedingten (3) postischämischen Mikrozirkulationsstörung und des durch Leukozyteninfiltration bedingten (4) Parenchymzellschadens, woraus sich eine Verringerung der (5) Dysfunktion bzw. Prävention vor Versagen des reperfundierten Organs ergibt.

VI. SCHLUSSFOLGERUNG

Leukozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen und I/R. Die Rekrutierung von Leukozyten aus den mikrovaskulären Stromgebieten in das entzündete Gewebe ist ein hochkomplexer Prozess, der bislang nicht vollständig verstanden ist. Die Rolle des Adhäsionsmoleküls JAM-A wird dabei in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert. Die Bedeutung der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 für die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses ist *in vivo* unzulänglich geklärt.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, das etablierte Modell der Zytokin- bzw. Chemokin-induzierten Entzündung am *M. cremaster* der Maus zu einem Versuchsmodell weiter zu entwickeln, welches die Untersuchung aller Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses während I/R erlaubt. Dies war der Ausgangspunkt für Studien, welche in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen die Mechanismen der leukozytären Diapedese näher erforschen sollten.

In diesem Zusammenhang wurde die Rolle des Adhäsionsmoleküls JAM-A für die Rekrutierung von Leukozyten zum ersten Mal systematisch unter verschiedenen inflammatorischen Bedingungen untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass JAM-A die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten *in vivo* Stimulus-spezifisch mediiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Transmigration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten einer dynamischen Regulation durch das endothelial exprimierte JAM-A unterliegt. Schließlich lassen unsere Beobachtungen darauf schließen, dass das leukozytäre JAM-A in die Regulation der interstitiellen Leukozytenmigration involviert ist. Auf Basis der hier erhobenen Befunde können die in der Literatur publizierten und ursprünglich als kontrovers interpretierte Daten zur Bedeutung von JAM-A für die Rekrutierung von Leukozyten aus einem anderen Blickwinkel betrachtet und durch die hier erstmalig beschriebenen besonderen Eigenschaften dieses Adhäsionsmoleküls erklärt werden.

Des Weiteren wurde die Bedeutung der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 systematisch bei Chemokin-induzierter Entzündung sowie bei I/R analysiert. Die Ergebnisse belegen, dass Ccr1, Ccr2 und Ccr5 nach Chemokinstimulation *in vivo* feste Adhärenz und (konsekutive) Transmigration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten vermitteln und bestätigen somit bisherige *in vitro* Befunde. Ferner zeigen unsere Daten, dass die untersuchten Chemokinrezeptoren keinen Einfluss auf das interstitielle Migrationsverhalten transmigrierter Leukozyten haben. In der vorliegenden Arbeit ist es weiterhin zum ersten Mal gelungen, die Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 auf der Oberfläche von nativen neutrophilen

Granulozyten der Maus nachzuweisen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Ccr1, Ccr2 und Ccr5 durch dynamische bzw. differentielle Regulation von Adhärenz und (konsekutiver) Transmigration auch funktionelle Relevanz für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in postischämisches Gewebe besitzen.

Pharmakologische Inhibitoren von CC-Chemokinrezeptoren (z.B. BX471) werden bereits in klinischen Studien für die Zulassung zur therapeutischen Anwendung bei Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis und Arteriosklerose überprüft. Inwiefern die präventive und/oder therapeutische Beeinflussung der Leukozytenrekrutierung während I/R durch die pharmakologische Blockade der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 eine Anwendung in der klinischen Routine finden könnte, muss durch weitere experimentelle und klinische Studien geklärt werden.

Die Herausforderung der Zukunft ist, die molekularen Grundlagen des Rekrutierungsprozesses jener Leukozytensubpopulationen zu erforschen, welche in besonderem Masse an der Pathogenese einer definierten Erkrankung beteiligt sind. Auf Basis dieser Erkenntnisse könnten pharmakologische Substanzen entwickelt werden, welche eine gezielte Kontrolle des leukozytären Extravasationsprozesses ermöglichen. Das Ziel ist, selektiv die Rekrutierung pathogenetisch relevanter Leukozytenpopulationen zu inhibieren, ohne dabei Einfluss auf nicht-beteiligte Leukozytenpopulationen auszuüben. Auf diese Weise könnten Störungen der Wundheilung und Geweberegeneration sowie das Risiko zur Entstehung von Infektionen oder Neoplasien, wie sie durch eine unspezifische Immunsuppression bei gegenwärtig verwendeten Therapieregimen auftreten, wesentlich reduziert werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die Eigenschaft von Leukozyten, das Gefäßsystem zu verlassen und in das umliegende Gewebe auszuwandern, ist von essentieller Bedeutung für die Bekämpfung von Infektionen und darüber hinaus entscheidend für die Pathogenese des I/R-Schadens.

Die Extravasation von Leukozyten stellt dabei einen kaskadenartig verlaufenden Prozess dar, welcher sich in die Schritte Rolling, Adhärenz, transendotheliale und interstitielle Migration gliedern lässt. Ein geeignetes Versuchsmodell, welches am *M. cremaster* der Maus *in vivo* alle Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses während I/R zu analysieren erlaubt, liegt bisher nicht vor. Während die frühen Schritte des leukozytären Extravasationsprozesses weitgehend aufgeklärt sind, sind die Schritte der transendothelialen und interstitiellen Migration von Leukozyten unzureichend verstanden. *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass das Molekül JAM-A in die Transmigration von Leukozyten involviert ist, jüngste *in vivo* Studien zeigen jedoch kontroverse Ergebnisse. Ferner gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass die Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 an der Extravasation von Leukozyten beteiligt sind. Welche Bedeutung diese Chemokinrezeptoren für die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses bei Entzündung und I/R besitzen, ist bislang unklar.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher i) ein geeignetes Modell zur Untersuchung aller Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses bei I/R am *M. cremaster* der Maus zu entwickeln, ii) die Bedeutung des Adhäsionsmoleküls JAM-A für die Transmigration von Leukozyten zu untersuchen und iii) die Rolle der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 für die einzelnen Schritte des leukozytären Rekrutierungsprozesses bei Entzündung und I/R zu analysieren.

In unterschiedlichen Versuchsansätzen wurde mit Hilfe der RLOT-Intravitalmikroskopie am *M. cremaster* anästhesierter Mäuse die leukozytären Migrationsparameter untersucht. Zur Bestimmung des Phänotyps transmigrierter Leukozyten wurden immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten durchgeführt.

In einer ersten Versuchsreihe wurden die einzelnen Schritte des leukozytären Extravasationsprozesses systematisch in Abhängigkeit von Ischämiedauer und Reperfusionzeit untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass es bereits nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion gegenüber schein-operierten Kontrolltieren zu einem starken Anstieg von Leukozytenadhärenz und -transmigration kommt. Eine Verlängerung der Ischämiezeit auf 60 bzw. 90 min konnte keine Steigerung der Effekte erzielen. Diese Befunde waren der Ausgangspunkt für weitergehende Untersuchungen, welche die Mechanismen des leukozytären Rekrutierungsprozesses näher charakterisieren sollen.

In diesem Zusammenhang wurde in einer zweiten Versuchsreihe unter Verwendung von JAM-A-defizienten Mäusen die Bedeutung des Adhäsionsmoleküls JAM-A für die Leukozytenrekrutierung systematisch unter verschiedenen inflammatorischen Bedingungen analysiert. Unsere Daten belegen, dass die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten einer Stimulus-spezifischen Regulation durch JAM-A unterliegt. Ferner lassen die Ergebnisse unserer Untersuchungen in eJAM-A-defizienten Tieren darauf schließen, dass endotheliales JAM-A die Transmigration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten zwar in der Initialphase entzündlicher Prozesse vermittelt, zu späteren Zeitpunkten jedoch keine Bedeutung mehr zu besitzen scheint. Schließlich deuten unsere Befunde darauf hin, dass leukozytäres JAM-A an den der interstitiellen Leukozytenmigration zugrunde liegenden Mechanismen beteiligt ist.

In einer letzten Versuchsreihe wurde die Rolle der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 für die Rekrutierung von Leukozyten bei Chemokin-induzierter Entzündung und I/R untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Chemokinrezeptoren die Extravasation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei Chemokin-induzierter Entzündung durch Effekte auf Adhärenz und (konsekutive) transendotheliale Migration medieren und keinen Einfluss auf das interstitielle Migrationsverhalten transmigrierter Leukozyten besitzen. Des Weiteren ist es mittels durchflusszytometrischer Analyse gelungen, die Expression von Ccr2 und Ccr5 auf nativen neutrophilen Granulozyten nachzuweisen. Darüber hinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass die Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5 zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in das postischämische Gewebe durch dynamische bzw. differentielle Regulation von Adhärenz und (konsekutiver) Transmigration beitragen.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Algood H.M., Flynn J.L. (2004) CCR5-deficient mice control Mycobacterium tuberculosis infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration. *J. Immunol.* 173, 3287-3296.
2. Alon R., Kassner P.D., Carr M.W., Finger E.B., Hemler M.E., Springer T.A. (1995) The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J. Cell Biol.* 128, 1243-1253.
3. Anders H.J., Frink M., Linde Y., Banas B., Wornle M., Cohen C.D., Vielhauer V., Nelson P.J., Grone H.J., Schlondorff D. (2003) CC chemokine ligand 5/RANTES chemokine antagonists aggravate glomerulonephritis despite reduction of glomerular leukocyte infiltration. *J. Immunol.* 170, 5658-5666.
4. Anders H.J., Vielhauer V., Frink M., Linde Y., Cohen C.D., Blattner S.M., Kretzler M., Strutz F., Mack M., Grone H.J., Onuffer J., Horuk R., Nelson P.J., Schlondorff D. (2002) A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J. Clin. Invest* 109, 251-259.
5. Andersen M.H., Schrama D., Thor S.P., Becker J.C. (2006) Cytotoxic T cells. *J. Invest Dermatol.* 126, 32-41.
6. Arrate M.P., Rodriguez J.M., Tran T.M., Brock T.A., Cunningham S.A. (2001) Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 45826-45832.
7. Ascon D.B., Lopez-Briones S., Liu M., Ascon M., Savransky V., Colvin R.B., Soloski M.J., Rabb H. (2006) Phenotypic and functional characterization of kidney-infiltrating lymphocytes in renal ischemia reperfusion injury. *J. Immunol.* 177, 3380-3387.
8. Baez S. (1973) An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc. Res.* 5, 384-394.
9. Barreiro O., Yanez-Mo M., Serrador J.M., Montoya M.C., Vicente-Manzanares M., Tejedor R., Furthmayr H., Sanchez-Madrid F. (2002) Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J. Cell Biol.* 157, 1233-1245.
10. Beck J., Stummer W., Lehmborg J., Baethmann A., Uhl E. (1997) Leukocyte-endothelium interactions in global cerebral ischemia. *Acta Neurochir. Suppl* 70, 53-55.
11. Bevilacqua M.P., Stengelin S., Gimbrone M.A., Jr., Seed B. (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243, 1160-1165.
12. Bilsland C.A., Diamond M.S., Springer T.A. (1994) The leukocyte integrin p150,95 (CD11c/CD18) as a receptor for iC3b. Activation by a heterologous beta subunit and localization of a ligand recognition site to the I domain. *J. Immunol.* 152, 4582-4589.

13. Birdsall H.H., Green D.M., Trial J., Youker K.A., Burns A.R., MacKay C.R., LaRosa G.J., Hawkins H.K., Smith C.W., Michael L.H., Entman M.L., Rossen R.D. (1997) Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation* 95, 684-692.
14. Boring L., Gosling J., Chensue S.W., Kunkel S.L., Farese R.V., Jr., Broxmeyer H.E., Charo I.F. (1997) Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest* 100, 2552-2561.
15. Boring L., Gosling J., Cleary M., Charo I.F. (1998) Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894-897.
16. Burne-Taney M.J., Ascon D.B., Daniels F., Racusen L., Baldwin W., Rabb H. (2003) B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury. *J. Immunol.* 171, 3210-3215.
17. Butcher E.C. (1991) Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67, 1033-1036.
18. Campbell J.J., Hedrick J., Zlotnik A., Siani M.A., Thompson D.A., Butcher E.C. (1998) Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279, 381-384.
19. Carlos T.M., Harlan J.M. (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068-2101.
20. Carman C.V., Springer T.A. (2004) A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol.* 167, 377-388.
21. Cera M.R., Del Prete A., Vecchi A., Corada M., Martin-Padura I., Motoike T., Tonetti P., Bazzoni G., Vermi W., Gentili F., Bernasconi S., Sato T.N., Mantovani A., Dejana E. (2004) Increased DC trafficking to lymph nodes and contact hypersensitivity in junctional adhesion molecule-A-deficient mice. *J. Clin. Invest* 114, 729-738.
22. Chambers D.E., Parks D.A., Patterson G., Roy R., McCord J.M., Yoshida S., Parmley L.F., Downey J.M. (1985) Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J. Mol. Cell Cardiol.* 17, 145-152.
23. Charo I.F., Ransohoff R.M. (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 354, 610-621.
24. Cheng S.S., Lai J.J., Lukacs N.W., Kunkel S.L. (2001) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor up-regulates CCR1 in human neutrophils. *J. Immunol.* 166, 1178-1184.
25. Chosay J.G., Fisher M.A., Farhood A., Ready K.A., Dunn C.J., Jaeschke H. (1998) Role of PECAM-1 (CD31) in neutrophil transmigration in murine models of liver and peritoneal inflammation. *Am. J. Physiol* 274, G776-G782.

26. Cliff W.J. (1966) The acute inflammatory reaction in the rabbit ear chamber with particular reference to the phenomenon of leukocytic migration. *J. Exp. Med.* 124, 543-556.
27. Cook D.N., Beck M.A., Coffman T.M., Kirby S.L., Sheridan J.F., Pragnell I.B., Smithies O. (1995) Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science* 269, 1583-1585.
28. Corada M., Chimenti S., Cera M.R., Vinci M., Salio M., Fiordaliso F., De Angelis N., Villa A., Bossi M., Staszewsky L.I., Vecchi A., Parazzoli D., Motoike T., Latini R., Dejana E. (2005) Junctional adhesion molecule-A-deficient polymorphonuclear cells show reduced diapedesis in peritonitis and heart ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 10634-10639.
29. Cunningham S.A., Rodriguez J.M., Arrate M.P., Tran T.M., Brock T.A. (2002) JAM2 interacts with alpha4beta1. Facilitation by JAM3. *J. Biol. Chem.* 277, 27589-27592.
30. Dangerfield J., Larbi K.Y., Huang M.T., Dewar A., Nourshargh S. (2002) PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *J. Exp. Med.* 196, 1201-1211.
31. Dangerfield J.P., Wang S., Nourshargh S. (2005) Blockade of alpha6 integrin inhibits IL-1beta- but not TNF-alpha-induced neutrophil transmigration in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 77, 159-165.
32. De Lema G.P., Maier H., Franz T.J., Escribese M., Chilla S., Segerer S., Camarasa N., Schmid H., Banas B., Kalaydjiev S., Busch D.H., Pfeffer K., Mampaso F., Schlondorff D., Luckow B. (2005) Chemokine receptor Ccr2 deficiency reduces renal disease and prolongs survival in MRL/lpr lupus-prone mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 3592-3601.
33. Dejana E. (2004) Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 261-270.
34. Del Maschio A., De Luigi A., Martin-Padura I., Brockhaus M., Bartfai T., Fruscella P., Adorini L., Martino G., Furlan R., De Simoni M.G., Dejana E. (1999) Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J. Exp. Med.* 190, 1351-1356.
35. Delves P.J., Roitt I.M. (2000) The immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343, 37-49.
36. Denk W., Strickler J.H., Webb W.W. (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76.
37. Diamond M.S., Alon R., Parkos C.A., Quinn M.T., Springer T.A. (1995) Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD1). *J. Cell Biol.* 130, 1473-1482.

38. Ebnet K., Suzuki A., Ohno S., Vestweber D. (2004) Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J. Cell Sci.* 117, 19-29.
39. Engelhardt B., Wolburg H. (2004) Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur. J. Immunol.* 34, 2955-2963.
40. Faint R.W. (1992) Platelet-neutrophil interactions: their significance. *Blood Rev.* 6, 83-91.
41. Feng D., Nagy J.A., Pyne K., Dvorak H.F., Dvorak A.M. (1998) Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J. Exp. Med.* 187, 903-915.
42. Ferrante R.J., Hobson R.W., Miyasaka M., Granger D.N., Duran W.N. (1996) Inhibition of white blood cell adhesion at reperfusion decreases tissue damage in posts ischemic striated muscle. *J. Vasc. Surg.* 24, 187-193.
43. Ferrari R., Ceconi C., Curello S., Cargnoni A., Condorelli E., Raddino R. (1985) Role of oxygen in myocardial ischaemic and reperfusion damage: effect of alpha-tocopherol. *Acta Vitaminol. Enzymol.* 7 Suppl, 61-70.
44. Formigli L., Manneschi L.I., Nediani C., Marcelli E., Fratini G., Orlandini S.Z., Perna A.M. (2001) Are macrophages involved in early myocardial reperfusion injury? *Ann. Thorac. Surg.* 71, 1596-1602.
45. Furuichi K., Wada T., Iwata Y., Kitagawa K., Kobayashi K., Hashimoto H., Ishiwata Y., Asano M., Wang H., Matsushima K., Takeya M., Kuziel W.A., Mukaida N., Yokoyama H. (2003) CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2503-2515.
46. Gao J.L., Wynn T.A., Chang Y., Lee E.J., Broxmeyer H.E., Cooper S., Tiffany H.L., Westphal H., Kwon-Chung J., Murphy P.M. (1997) Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *J. Exp. Med.* 185, 1959-1968.
47. Gao W., Topham P.S., King J.A., Smiley S.T., Csizmadia V., Lu B., Gerard C.J., Hancock W.W. (2000) Targeting of the chemokine receptor CCR1 suppresses development of acute and chronic cardiac allograft rejection. *J. Clin. Invest* 105, 35-44.
48. Garcia-Ramallo E., Marques T., Prats N., Beleta J., Kunkel S.L., Godessart N. (2002) Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *J. Immunol.* 169, 6467-6473.
49. Gasser O., Schifferli J.A. (2004) Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* 104, 2543-2548.
50. Goodman T., Lefrancois L. (1988) Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. *Nature* 333, 855-858.

51. Gotsch U., Borges E., Bosse R., Boggemeyer E., Simon M., Mossmann H., Vestweber D. (1997) VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 5), 583-588.
52. Granger D.N. (1988) Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol* 255, H1269-H1275.
53. Gute D.C., Ishida T., Yarimizu K., Korthuis R.J. (1998) Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol. Cell Biochem.* 179, 169-187.
54. Harris A.G., Leiderer R., Peer F., Messmer K. (1996) Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *Am. J. Physiol* 271, H2388-H2398.
55. Harris E.S., McIntyre T.M., Prescott S.M., Zimmerman G.A. (2000) The leukocyte integrins. *J. Biol. Chem.* 275, 23409-23412.
56. Herskowitz A., Choi S., Ansari A.A., Wesselingh S. (1995) Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am. J. Pathol.* 146, 419-428.
57. Hickey M.J., Forster M., Mitchell D., Kaur J., De Caigny C., Kubes P. (2000) L-selectin facilitates emigration and extravascular locomotion of leukocytes during acute inflammatory responses in vivo. *J. Immunol.* 165, 7164-7170.
58. Hirabayashi S., Tajima M., Yao I., Nishimura W., Mori H., Hata Y. (2003) JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Mol. Cell Biol.* 23, 4267-4282.
59. Hirata K., Ishida T., Penta K., Rezaee M., Yang E., Wohlgemuth J., Quertermous T. (2001) Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 16223-16231.
60. Hoffman R., Gross L. (1975) The modulation contrast microscope. *Nature* 254, 586-588.
61. Hoffmann T.F., Leiderer R., Waldner H., Arbogast S., Messmer K. (1995) Ischemia reperfusion of the pancreas: a new in vivo model for acute pancreatitis in rats. *Res. Exp. Med. (Berl)* 195, 125-144.
62. Horuk R., Clayberger C., Krensky A.M., Wang Z., Grone H.J., Weber C., Weber K.S., Nelson P.J., May K., Rosser M., Dunning L., Liang M., Buckman B., Ghannam A., Ng H.P., Islam I., Bauman J.G., Wei G.P., Monahan S., Xu W., Snider R.M., Morrissey M.M., Hesselgesser J., Perez H.D. (2001) A non-peptide functional antagonist of the CCR1 chemokine receptor is effective in rat heart transplant rejection. *J. Biol. Chem.* 276, 4199-4204.
63. Huang M.T., Larbi K.Y., Scheiermann C., Woodfin A., Gerwin N., Haskard D.O., Nourshargh S. (2006) ICAM-2 mediates neutrophil transmigration in vivo: evidence for stimulus specificity and a role in PECAM-1-independent transmigration. *Blood* 107, 4721-4727.

64. Iida S., Kohro T., Kodama T., Nagata S., Fukunaga R. (2005) Identification of CCR2, flotillin, and gp49B genes as new G-CSF targets during neutrophilic differentiation. *J. Leukoc. Biol.*
65. Issekutz T.B. (1995) In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, IL-1 alpha, TNF-alpha, IFN-gamma, and C5a utilizes LFA-1, Mac-1, and VLA-4. The relative importance of each integrin. *J. Immunol.* 154, 6533-6540.
66. Jennings R.B., Reimer K.A. (1991) The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu. Rev. Med.* 42, 225-246.
67. Jerome S.N., Kong L., Korhuis R.J. (1994) Microvascular dysfunction in postischemic skeletal muscle. *J. Invest Surg.* 7, 3-16.
68. Jiang H., Chess L. (2006) Regulation of immune responses by T cells. *N. Engl. J. Med.* 354, 1166-1176.
69. Jo N., Wu G.S., Rao N.A. (2003) Upregulation of chemokine expression in the retinal vasculature in ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4054-4060.
70. Johnston B., Burns A.R., Suematsu M., Issekutz T.B., Woodman R.C., Kubes P. (1999) Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. *J. Clin. Invest* 103, 1269-1276.
71. Jolly S.R., Kane W.J., Hook B.G., Abrams G.D., Kunkel S.L., Lucchesi B.R. (1986) Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion. *Am. Heart J.* 112, 682-690.
72. Jutila M.A. (1994) Function and regulation of leukocyte homing receptors. *J. Leukoc. Biol.* 55, 133-140.
73. Kanda H., Tateya S., Tamori Y., Kotani K., Hiasa K., Kitazawa R., Kitazawa S., Miyachi H., Maeda S., Egashira K., Kasuga M. (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest* 116, 1494-1505.
74. Kanwar S., Kubes P. (1994) Ischemia/reperfusion-induced granulocyte influx is a multistep process mediated by mast cells. *Microcirculation.* 1, 175-182.
75. Kanwar S., Smith C.W., Kubes P. (1998) An absolute requirement for P-selectin in ischemia/reperfusion-induced leukocyte recruitment in cremaster muscle. *Microcirculation.* 5, 281-287.
76. Khan I.A., Murphy P.M., Casciotti L., Schwartzman J.D., Collins J., Gao J.L., Yeaman G.R. (2001) Mice lacking the chemokine receptor CCR1 show increased susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 166, 1930-1937.
77. Khandoga A., Biberthaler P., Messmer K., Krombach F. (2003) Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion in vivo: a systematic analysis. *Microvasc. Res.* 65, 71-77.

78. Khandoga A., Biberthaler P., Messmer K., Krombach F. (2003) Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion in vivo: a systematic analysis. *Microvasc. Res.* 65, 71-77.
79. Khandoga A., Hanschen M., Kessler J.S., Krombach F. (2006) CD4+ T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and platelets. *Hepatology* 43, 306-315.
80. Khandoga A., Kessler J.S., Hanschen M., Khandoga A.G., Burggraf D., Reichel C., Hamann G.F., Enders G., Krombach F. (2006) Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil and T cell recruitment and migration in the postischemic liver. *J. Leukoc. Biol.* 79, 1295-1305.
81. Khandoga A., Kessler J.S., Meissner H., Hanschen M., Corada M., Motoike T., Enders G., Dejana E., Krombach F. (2005) Junctional adhesion molecule -A deficiency increases hepatic ischemia-reperfusion injury despite reduction of neutrophil transendothelial migration. *Blood*.
82. Koch A.E., Kunkel S.L., Harlow L.A., Mazarakis D.D., Haines G.K., Burdick M.D., Pope R.M., Strieter R.M. (1994) Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest* 93, 921-928.
83. Krishnadasan B., Farivar A.S., Naidu B.V., Woolley S.M., Byrne K., Fraga C.H., Mulligan M.S. (2004) Beta-chemokine function in experimental lung ischemia-reperfusion injury. *Ann. Thorac. Surg.* 77, 1056-1062.
84. Kuebler W.M., Parthasarathi K., Wang P.M., Bhattacharya J. (2000) A novel signaling mechanism between gas and blood compartments of the lung. *J. Clin. Invest* 106, 607.
85. Kunkel E.J., Jung U., Bullard D.C., Norman K.E., Wolitzky B.A., Vestweber D., Beaudet A.L., Ley K. (1996) Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and intercellular adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* 183, 57-65.
86. Kupatt C., Wichels R., Horstkotte J., Krombach F., Habazettl H., Boekstegers P. (2002) Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *J. Leukoc. Biol.* 72, 455-461.
87. Kuroda T., Shiohara E., Homma T., Furukawa Y., Chiba S. (1994) Effects of leukocyte and platelet depletion on ischemia--reperfusion injury to dog pancreas. *Gastroenterology* 107, 1125-1134.
88. Kuziel W.A., Morgan S.J., Dawson T.C., Griffin S., Smithies O., Ley K., Maeda N. (1997) Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 12053-12058.
89. Lalor P., Nash G.B. (1995) Adhesion of flowing leucocytes to immobilized platelets. *Br. J. Haematol.* 89, 725-732.
90. Lampugnani M.G., Resnati M., Raiteri M., Pigott R., Pisacane A., Houen G., Ruco L.P., Dejana E. (1992) A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* 118, 1511-1522.

91. Laudanna C., Kim J.Y., Constantin G., Butcher E. (2002) Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol. Rev.* 186, 37-46.
92. Lechner F., Sahrbacher U., Suter T., Frei K., Brockhaus M., Koedel U., Fontana A. (2000) Antibodies to the junctional adhesion molecule cause disruption of endothelial cells and do not prevent leukocyte influx into the meninges after viral or bacterial infection. *J. Infect. Dis.* 182, 978-982.
93. Lehr H.A., Olofsson A.M., Carew T.E., Vajkoczy P., von Andrian U.H., Hubner C., Berndt M.C., Steinberg D., Messmer K., Arfors K.E. (1994) P-selectin mediates the interaction of circulating leukocytes with platelets and microvascular endothelium in response to oxidized lipoprotein in vivo. *Lab Invest* 71, 380-386.
94. Ley K. (2001) Pathways and bottlenecks in the web of inflammatory adhesion molecules and chemoattractants. *Immunol. Res.* 24, 87-95.
95. Ley K. (2003) Healing without inflammation? *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 285, R718-R719.
96. Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I., Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678-689.
97. Lou O., Alcaide P., Luscinskas F.W., Muller W.A. (2007) CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *J. Immunol.* 178, 1136-1143.
98. Luangsay S., Kasper L.H., Rachinel N., Minns L.A., Mennechet F.J., Vandewalle A., Buzoni-Gatel D. (2003) CCR5 mediates specific migration of *Toxoplasma gondii*-primed CD8 lymphocytes to inflammatory intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 125, 491-500.
99. Luckow B., Joergensen J., Chilla S., Li J.P., Henger A., Kiss E., Wiczorek G., Roth L., Hartmann N., Hoffmann R., Kretzler M., Nelson P.J., Perez d.L., Maier H., Wurst W., Balling R., Pfeffer K., Grone H.J., Schlondorff D., Zerwes H.G. (2004) Reduced intragraft mRNA expression of matrix metalloproteinases Mmp3, Mmp12, Mmp13 and Adam8, and diminished transplant arteriosclerosis in Ccr5-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 34, 2568-2578.
100. Mack M., Cihak J., Simonis C., Luckow B., Proudfoot A.E., Plachy J., Bruhl H., Frink M., Anders H.J., Vielhauer V., Pfirstinger J., Stangassinger M., Schlondorff D. (2001) Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J. Immunol.* 166, 4697-4704.
101. Mandell K.J., Parkos C.A. (2005) The JAM family of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 857-867.
102. Martin-Padura I., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., Romano M., Fruscella P., Panzeri C., Stoppacciaro A., Ruco L., Villa A., Simmons D., Dejana E. (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* 142, 117-127.

103. Massberg S., Enders G., Leiderer R., Eisenmenger S., Vestweber D., Krombach F., Messmer K. (1998) Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 92, 507-515.
104. Massberg S., Gonzalez A.P., Leiderer R., Menger M.D., Messmer K. (1998) In vivo assessment of the influence of cold preservation time on microvascular reperfusion injury after experimental small bowel transplantation. *Br. J. Surg.* 85, 127-133.
105. Massberg S., Messmer K. (1998) The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant. Proc.* 30, 4217-4223.
106. Maus U.A., Waelsch K., Kuziel W.A., Delbeck T., Mack M., Blackwell T.S., Christman J.W., Schlondorff D., Seeger W., Lohmeyer J. (2003) Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis. *J. Immunol.* 170, 3273-3278.
107. May M.J., Ghosh S. (1997) Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin. Cancer Biol.* 8, 63-73.
108. Mazzoni M.C., Borgstrom P., Intaglietta M., Arfors K.E. (1989) Luminal narrowing and endothelial cell swelling in skeletal muscle capillaries during hemorrhagic shock. *Circ. Shock* 29, 27-39.
109. McCord J.M. (1987) Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed. Proc.* 46, 2402-2406.
110. McLean P.G., Ahluwalia A., Perretti M. (2000) Association between kinin B(1) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *J. Exp. Med.* 192, 367-380.
111. Meerschaert J., Furie M.B. (1995) The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. *J. Immunol.* 154, 4099-4112.
112. Mempel T.R., Moser C., Hutter J., Kuebler W.M., Krombach F. (2003) Visualization of leukocyte transendothelial and interstitial migration using reflected light oblique transillumination in intravital video microscopy. *J. Vasc. Res.* 40, 435-441.
113. Menger M.D., Pelikan S., Steiner D., Messmer K. (1992) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am. J. Physiol* 263, H1901-H1906.
114. Menger M.D., Steiner D., Messmer K. (1992) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am. J. Physiol* 263, H1892-H1900.
115. Middleton J., Neil S., Wintle J., Clark-Lewis I., Moore H., Lam C., Auer M., Hub E., Rot A. (1997) Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91, 385-395.

116. Millan J., Hewlett L., Glyn M., Toomre D., Clark P., Ridley A.J. (2006) Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat. Cell Biol.* 8, 113-123.
117. Muller W.A. (2003) Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24, 327-334.
118. Murphy P.M., Baggiolini M., Charo I.F., Hebert C.A., Horuk R., Matsushima K., Miller L.H., Oppenheim J.J., Power C.A. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 145-176.
119. Murry C.E., Giachelli C.M., Schwartz S.M., Vracko R. (1994) Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am. J. Pathol.* 145, 1450-1462.
120. Nasdala I., Wolburg-Buchholz K., Wolburg H., Kuhn A., Ebnet K., Brachtendorf G., Samulowitz U., Kuster B., Engelhardt B., Vestweber D., Butz S. (2002) A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J. Biol. Chem.* 277, 16294-16303.
121. Nayler W.G., Elz J.S. (1986) Reperfusion injury: laboratory artifact or clinical dilemma? *Circulation* 74, 215-221.
122. Newman P.J. (1997) The biology of PECAM-1. *J. Clin. Invest* 100, S25-S29.
123. Ninichuk V., Gross O., Reichel C., Khandoga A., Pawar R.D., Ciubar R., Segerer S., Belemezova E., Radomska E., Luckow B., De Lema G.P., Murphy P.M., Gao J.L., Henger A., Kretzler M., Horuk R., Weber M., Krombach F., Schlondorff D., Anders H.J. (2005) Delayed Chemokine Receptor Chemokine Receptor 1 Blockade Prolongs Survival in Collagen 4A3-Deficient Mice with Alport Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*
124. Nolte D., Bayer M., Lehr H.A., Becker M., Krombach F., Kreimeier U., Messmer K. (1992) Attenuation of postischemic microvascular disturbances in striated muscle by hyperosmolar saline dextran. *Am. J. Physiol* 263, H1411-H1416.
125. Nomarski G. (1957) [From phase contrast to contrast by interference.]. *Rev. Hematol.* 12, 439-442.
126. Norman K.E., Moore K.L., McEver R.P., Ley K. (1995) Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 86, 4417-4421.
127. Nourshargh S., Krombach F., Dejana E. (2006) The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J. Leukoc. Biol.* 80, 714-718.
128. Oliveira S.H., Lukacs N.W. (2001) Stem cell factor and igE-stimulated murine mast cells produce chemokines (CCL2, CCL17, CCL22) and express chemokine receptors. *Inflamm. Res.* 50, 168-174.
129. Olsson G.M., Brunmark A., Brunk U.T. (1989) Acridine orange-mediated photodamage of microsomal- and lysosomal fractions. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 56, 247-257.

130. Oppermann M. (2004) Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal.* 16, 1201-1210.
131. Ottonello L., Montecucco F., Bertolotto M., Arduino N., Mancini M., Corcione A., Pistoia V., Dallegri F. (2005) CCL3 (MIP-1alpha) induces in vitro migration of GM-CSF-primed human neutrophils via CCR5-dependent activation of ERK 1/2. *Cell Signal.* 17, 355-363.
132. Panes J., Perry M.A., Anderson D.C., Manning A., Leone B., Cepinskas G., Rosenbloom C.L., Miyasaka M., Kvietys P.R., Granger D.N. (1995) Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am. J. Physiol* 269, H1955-H1964.
133. Petri B., Bixel M.G. (2006) Molecular events during leukocyte diapedesis. *FEBS J.* 273, 4399-4407.
134. Prorock A.J., Hafezi-Moghadam A., Laubach V.E., Liao J.K., Ley K. (2003) Vascular protection by estrogen in ischemia-reperfusion injury requires endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 284, H133-H140.
135. Ramos C.D., Canetti C., Souto J.T., Silva J.S., Hogaboam C.M., Ferreira S.H., Cunha F.Q. (2005) MIP-1alpha[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4. *J. Leukoc. Biol.* 78, 167-177.
136. Ramos C.D., Canetti C., Souto J.T., Silva J.S., Hogaboam C.M., Ferreira S.H., Cunha F.Q. (2005) MIP-1{alpha}[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-{\alpha} and LTB4. *J. Leukoc. Biol.*
137. Ramos C.D., Fernandes K.S., Canetti C., Teixeira M.M., Silva J.S., Cunha F.Q. (2006) Neutrophil recruitment in immunized mice depends on MIP-2 inducing the sequential release of MIP-1alpha, TNF-alpha and LTB(4). *Eur. J. Immunol.* 36, 2025-2034.
138. Raud J., Lindbom L., Dahlen S.E., Hedqvist P. (1989) Periarteriolar localization of mast cells promotes oriented interstitial migration of leukocytes in the hamster cheek pouch. *Am. J. Pathol.* 134, 161-169.
139. Reichel C.A., Khandoga A., Anders H.J., Schlondorff D., Luckow B., Krombach F. (2006) Chemokine receptors Ccr1, Ccr2, and Ccr5 mediate neutrophil migration to postschismic tissue. *J. Leukoc. Biol.* 79, 114-122.
140. Rollins B.J. (1996) Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* 2, 198-204.
141. Romson J.L., Hook B.G., Kunkel S.L., Abrams G.D., Schork M.A., Lucchesi B.R. (1983) Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 67, 1016-1023.
142. Rot A. (1992) Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol. Today* 13, 291-294.

143. Rot A., von Andrian U.H. (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 891-928.
144. Rothenberg M.E., Hogan S.P. (2006) The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 147-174.
145. Ruf A., Patscheke H. (1995) Platelet-induced neutrophil activation: platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11C/CD18. *Br. J. Haematol.* 90, 791-796.
146. Ruggeri Z.M. (1997) von Willebrand factor. *J. Clin. Invest* 100, S41-S46.
147. Ryan G.B., Majno G. (1977) Acute inflammation. A review. *Am. J. Pathol.* 86, 183-276.
148. Saetzler R.K., Jallo J., Lehr H.A., Philips C.M., Vasthare U., Arfors K.E., Tuma R.F. (1997) Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 505-513.
149. Schenkel A.R., Chew T.W., Muller W.A. (2004) Platelet endothelial cell adhesion molecule deficiency or blockade significantly reduces leukocyte emigration in a majority of mouse strains. *J. Immunol.* 173, 6403-6408.
150. Schenkel A.R., Mamdouh Z., Chen X., Liebman R.M., Muller W.A. (2002) CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat. Immunol.* 3, 143-150.
151. Schymeinsky J., Mocsai A., Walzog B. (2007) Neutrophil activation via beta(2) integrins (CD11/CD18): Molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb. Haemost.* 98, 262-273.
152. Scott A., Khan K.M., Cook J.L., Duronio V. (2004) What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? *Br. J. Sports Med.* 38, 248-249.
153. Segerer S., Nelson P.J., Schlondorff D. (2000) Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiology and therapeutic studies. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 152-176.
154. Shaw S.K., Ma S., Kim M.B., Rao R.M., Hartman C.U., Froio R.M., Yang L., Jones T., Liu Y., Nusrat A., Parkos C.A., Luscinskas F.W. (2004) Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. *J. Exp. Med.* 200, 1571-1580.
155. Shaw S.K., Perkins B.N., Lim Y.C., Liu Y., Nusrat A., Schnell F.J., Parkos C.A., Luscinskas F.W. (2001) Reduced expression of junctional adhesion molecule and platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) at human vascular endothelial junctions by cytokines tumor necrosis factor-alpha plus interferon-gamma Does not reduce leukocyte transmigration under flow. *Am. J. Pathol.* 159, 2281-2291.
156. Shotton D., White N. (1989) Confocal scanning microscopy: three-dimensional biological imaging. *Trends Biochem. Sci.* 14, 435-439.

157. Smith M.L., Long D.S., Damiano E.R., Ley K. (2003) Near-wall micro-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo. *Biophys. J.* 85, 637-645.
158. Sperandio M. (2006) Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J.* 273, 4377-4389.
159. Speyer C.L., Gao H., Rancilio N.J., Neff T.A., Huffnagle G.B., Sarma J.V., Ward P.A. (2004) Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Am. J. Pathol.* 165, 2187-2196.
160. Takami S., Minami M., Katayama T., Nagata I., Namura S., Satoh M. (2002) TAK-779, a nonpeptide CC chemokine receptor antagonist, protects the brain against focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 22, 780-784.
161. Tanaka Y., Adams D.H., Hubscher S., Hirano H., Siebenlist U., Shaw S. (1993) T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 361, 79-82.
162. Tarzami S.T., Cheng R., Miao W., Kitsis R.N., Berman J.W. (2002) Chemokine expression in myocardial ischemia: MIP-2 dependent MCP-1 expression protects cardiomyocytes from cell death. *J. Mol. Cell Cardiol.* 34, 209-221.
163. Thompson R.D., Noble K.E., Larbi K.Y., Dewar A., Duncan G.S., Mak T.W., Nourshargh S. (2001) Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)-deficient mice demonstrate a transient and cytokine-specific role for PECAM-1 in leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *Blood* 97, 1854-1860.
164. Tsukahara T., Makino Y., Fujii T., Ogawa M., Saisho H., Hamano Y., Ueda S., Akikusa B., Danoff T.M. (2002) Role of RANTES in the development of autoimmune tissue injuries in MRL-Fas lpr mice. *Clin. Immunol.* 103, 89-97.
165. Turegun M., Gudemez E., Newman P., Zins J., Siemionow M. (1999) Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) protects against ischemia-reperfusion injury in muscle flaps at microcirculatory level. *Plast. Reconstr. Surg.* 104, 1033-1040.
166. Tzima E., Irani-Tehrani M., Kiosses W.B., Dejana E., Schultz D.A., Engelhardt B., Cao G., DeLisser H., Schwartz M.A. (2005) A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437, 426-431.
167. Vielhauer V., Eis V., Schlondorff D., Anders H.J. (2004) Identifying chemokines as therapeutic targets in renal disease: lessons from antagonist studies and knockout mice. *Kidney Blood Press Res.* 27, 226-238.
168. von Andrian U.H., Hasslen S.R., Nelson R.D., Erlandsen S.L., Butcher E.C. (1995) A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* 82, 989-999.
169. Wan M.X., Wang Y., Liu Q., Schramm R., Thorlacius H. (2003) CC chemokines induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and recruitment in vivo: intermediary role of mast cells. *Br. J. Pharmacol.* 138, 698-706.

170. Wang X., Feuerstein G.Z., Gu J.L., Lysko P.G., Yue T.L. (1995) Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 115, 89-98.
171. Weber C. (2003) Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J. Mol. Med.* 81, 4-19.
172. Weber C., Lu C.F., Casanovas J.M., Springer T.A. (1997) Role of alpha L beta 2 integrin avidity in transendothelial chemotaxis of mononuclear cells. *J. Immunol.* 159, 3968-3975.
173. Weber C., Springer T.A. (1998) Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J. Immunol.* 161, 6825-6834.
174. Weber C., Weber K.S., Klier C., Gu S., Wank R., Horuk R., Nelson P.J. (2001) Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells. *Blood* 97, 1144-1146.
175. Wegmann F., Petri B., Khandoga A.G., Moser C., Khandoga A., Volkery S., Li H., Nasdala I., Brandau O., Fassler R., Butz S., Krombach F., Vestweber D. (2006) ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. *J. Exp. Med.* 203, 1671-1677.
176. Werr J., Xie X., Hedqvist P., Ruoslahti E., Lindbom L. (1998) beta1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue *In vivo*. *J. Exp. Med.* 187, 2091-2096.
177. Xie J., Li R., Kotovuori P., Vermot-Desroches C., Wijdenes J., Arnaout M.A., Nortamo P., Gahmberg C.G. (1995) Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain. *J. Immunol.* 155, 3619-3628.
178. Ying S., Meng Q., Zeibecoglou K., Robinson D.S., Macfarlane A., Humbert M., Kay A.B. (1999) Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J. Immunol.* 163, 6321-6329.
179. Young R.E., Thompson R.D., Larbi K.Y., La M., Roberts C.E., Shapiro S.D., Perretti M., Nourshargh S. (2004) Neutrophil elastase (NE)-deficient mice demonstrate a nonredundant role for NE in neutrophil migration, generation of proinflammatory mediators, and phagocytosis in response to zymosan particles *in vivo*. *J. Immunol.* 172, 4493-4502.
180. Zdolsek J.M. (1993) Acridine orange-mediated photodamage to cultured cells. *APMIS* 101, 127-132.
181. Zdolsek J.M., Olsson G.M., Brunk U.T. (1990) Photooxidative damage to lysosomes of cultured macrophages by acridine orange. *Photochem. Photobiol.* 51, 67-76.

182. Zen K., Liu Y., McCall I.C., Wu T., Lee W., Babbin B.A., Nusrat A., Parkos C.A. (2005) Neutrophil migration across tight junctions is mediated by adhesive interactions between epithelial coxsackie and adenovirus receptor and a junctional adhesion molecule-like protein on neutrophils. *Mol. Biol. Cell* 16, 2694-2703.
183. Zernike F. (1955) How I discovered phase contrast. *Science* 121, 345-349.
184. Zlotnik A., Yoshie O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 12, 121-127.

IX. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Alexander Baethmann danke ich sehr herzlich für die Aufnahme an das Institut für Chirurgische Forschung und den damit verbundenen Einstieg in die experimentelle Medizin. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl bedanken, unter dessen kommissarischer Leitung ich die vorliegende Arbeit abschließen durfte. Durch seine kompetenten Anregungen und Ratschläge unterstützte er meine Arbeit wissenschaftlich und persönlich.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Fritz Krombach für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und für das in mich gesetzte Vertrauen. Mit Geduld und Verständnis führte er mich an die Grundzüge wissenschaftlichen Denkens heran. Seine fachliche Kompetenz als akademischer Lehrer, seine Begeisterungsfähigkeit und Kreativität sowie seine herausragenden menschlichen Qualitäten haben mich tief beeindruckt und sind zugleich Vorbild und Ansporn für meinen weiteren Lebensweg.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Andrej Khandoga bedanken, der mich während meiner Zeit als Doktorand am Institut für Chirurgische Forschung exzellent betreute. Er lehrte mich wissenschaftliches Arbeiten, von Planung und Durchführung der Experimente bis hin zu Interpretation, Diskussion und Präsentation der Ergebnisse. Seine umfassenden Fachkenntnisse, die hervorragenden Ideen sowie die freundlichen Anregungen und Ratschläge haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Für die bis heute andauernde freundschaftliche Verbundenheit danke ich ihm im besonderen Maße.

Herrn Prof. Dr. Detlef Schlöndorff, Herrn PD Dr. Hans-Joachim Anders und Herrn Dr. Bruno Luckow aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München danke ich für die freundliche Bereitstellung der Chemokinrezeptor-defizienten Tiere. Die vorbildliche Zusammenarbeit in den gemeinsamen Projekten sowie die kritische und zugleich konstruktive Diskussion unserer Ergebnisse haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Prof. Dr. Elisabetta Dejana und Frau Dr. Monica Corada aus dem Institute of Molecular Oncology in Mailand/Italien sowie Frau Prof. Dr. Sussan Nourshargh und Frau Dr. Abigail Woodfin aus dem Imperial College in London/England danke ich für die freundliche

Bereitstellung der JAM-A-defizienten Mäuse und die hervorragende Kooperation in den gemeinsamen Projekten.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Siess danke ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 438 "Vaskuläre Biologie in der Medizin" der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Die bei den wöchentlichen Seminaren in intensiven Diskussionen mit den Kollegiaten gewonnenen Anregungen und Erkenntnisse sowie die finanzielle Unterstützung haben wesentlichen Anteil am Erfolg der vorliegenden Arbeit.

Mein Dank gebührt auch Frau Alke Schropp für ihre professionelle und stets geduldige Hilfe bei der Erstellung von Gewebeschnitten, Frau Silvia Münzing für die kompetente Durchführung und Auswertung der FACS-Analysen sowie Frau Bärbel Lorenz für die vorbildliche Durchführung der PCR. Auch den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Anne-Marie Allmeling und Frau Christine Csapo danke ich für ihre engagierte Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Herrn Dr. Jürgen Peters danke ich für die fachkundige und engagierte Beratung in allen statistischen Fragen. Bei Herrn Christian Moser möchte ich mich für die vorbildliche Anleitung beim Erlernen des Tiermodells und der Intravitalmikroskopie bedanken.

Den Tierpflegern im Institut, insbesondere Frau Brigitte Blount, danke ich für die verantwortungsvolle und zuverlässige Pflege der Versuchstiere.

Meinen Dank schulde ich auch den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, Herrn Peter Bihari, Herrn Marc Hanschen, Frau Stephanie Hüttinger, Frau Julia Kessler, Herrn Alexander Khandoga, Herrn James Meiring und Herrn Markus Rehberg für ihre tatkräftige Unterstützung und die außergewöhnlich freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Ebenso danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Doktoranden im Hause für das professionelle und einzigartig kollegiale Arbeitsklima, ohne welches die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Die vorliegende Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (GRK 438) und das EU NoE MAIN (LSHG-CT-2003-502935).

X. PUBLIKATIONEN

Abstracts

1. Reichel CA, Khandoga A, Woodfin A, Dejana E, Nourshargh S, Krombach F. (2007) JAM-A mediates leukocyte transmigration dynamically and in a stimulus-specific manner. **Inflamm Res.** 56: 185-185 Suppl.
2. Khandoga AG, Khandoga A, Reichel C, Krombach F. (2007) Single-cell tracking of interstitially migrating leukocytes upon local microinjection of chemoattractants in vivo. **Inflamm Res.** 56: 161-161 Suppl.
3. Reichel CA, Khandoga A, Woodfin A, Corada M, Dejana E, Nourshargh S, Krombach F. (2006) JAM-A mediates leukocyte transmigration dynamically and in a stimulus-specific manner. **J Vasc Res.** 43: 576-576.
4. Khandoga AG, Khandoga A, Reichel C, Krombach F. (2006) Single-cell tracking of interstitially migrating leukocytes upon local microinjection of chemoattractants in vivo. **J Vasc Res.** 43: 575-575.
5. Khandoga A, Kessler JS, Hanschen M, Khandoga AG, Reichel C, Krombach F. (2006) Matrix Metalloproteinases 2 and 9 are required for neutrophil and T cell migration during hepatic ischemia-reperfusion. **J Vasc Res.** 43: 36-36 Suppl. 1.
6. Khandoga AG, Khandoga A, Reichel C, Krombach F. (2006) Single-cell tracking of interstitially migrating leukocytes upon local microinjection of chemoattractants in vivo. **J Vasc Res.** 43: 68-68 Suppl. 1.
7. Woodfin A, Reichel C, Khandoga A, Corada M, Haskard D, Dejana E, Krombach F, Nourshargh S. (2006) Genetic Blockade of JAM-A- and PECAM-1-dependent pathways does not lead to an additive inhibitory Effect on Leukocyte Migration. **FASEB J.** 20: A648-A648 Part 1.
8. Woodfin A, Reichel C, Khandoga A, Corada M, Haskard D, Dejana E, Krombach F, Nourshargh S. (2006) JAM-A mediates leukocyte transmigration in a stimulus-specific manner. **FASEB J.** 20: A862-A862 Part 2.
9. Reichel CA, Khandoga A, Anders HJ, Schlöndorff D, Luckow B, Krombach F. (2006) Chemokine Receptors Ccr1, Ccr2, and Ccr5 regulate neutrophil migration to postischemic tissue. **J Vasc Res.** 43: 43-43.
10. Khandoga AG, Khandoga A, Reichel CA, Anders HJ, Schlöndorff D, Krombach F. (2006) Role of TLR4 for CXCL2-induced leukocyte migration. **J Vasc Res.** 43: 43-43.
11. Kessler JS, Khandoga A, Hanschen M, Khandoga AG, Reichel CA, Krombach F. (2006) Matrix Metalloproteinases 2 and 9 are required for neutrophil and T cell migration during hepatic ischemia-reperfusion. **J Vasc Res.** 43: 32-33.

12. Reichel CA, Khandoga A, Anders HJ, Luckow B, Schlöndorff D, Krombach F. (2004) Role of Chemokine Receptor CCR1 for MIP-1alpha-induced Leukocyte Recruitment in vivo. **J Vasc Res.** 41: 467-468

Originalia

1. Reichel CA, Rehberg M, Bihari P, Linder S, Khandoga A, Krombach F. (2008) Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: Evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling. **J Leukoc Biol.** 83(4):864-74.
2. Khandoga AG, Khandoga A, Reichel CA, Krombach F. (2007) Single-cell tracking of interstitially migrating leukocytes upon local microinjection of chemoattractants in vivo. *Submitted*
3. Woodfin A, Reichel CA, Khandoga A, Corada M, Voisin MB, Scheiermann C, Haskard DO, Dejana E, Krombach F, Nourshargh S. (2007) JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration. **Blood.** 110:1848-1856
4. Khandoga A , Kessler JS, Hanschen M, Khandoga, AG, Burggraf D, Reichel C, Hamann GF, Enders G, Krombach F. (2006) Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil and T cell recruitment and migration in the postischemic liver. **J Leukoc Biol.** 79(6):1295-305.
5. Reichel CA, Khandoga A, Anders HJ, Schlöndorff D, Luckow B, Krombach F. (2006) Chemokine receptors Ccr1, Ccr2, and Ccr5 mediate neutrophil migration to postischemic tissue. **J Leukoc Biol.** 79(1):114-22.
6. Ninichuk V, Gross O, Reichel C, Khandoga A, Pawar RD, Ciubar R, Segerer S, Belemezova E, Radomska E, Luckow B, de Lema GP, Murphy PM, Gao JL, Henger A, Kretzler M, Horuk R, Weber M, Krombach F, Schlöndorff D, Anders HJ. (2005) Delayed chemokine receptor 1 blockade prolongs survival in collagen 4A3-deficient mice with alport disease. **J Am Soc Nephrol.** 16(4):977-85.

XI. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Christoph Andreas Reichel
Geburtsdatum	10. September 1979
Geburtstort	München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Manfred Reichel Gerlinde Reichel (geb. Schraml)

Schulische Ausbildung

1986 – 1990	Grundschule an der Hirschbergstrasse, München
1990 – 1999	Neusprachliches Käthe-Kollwitz-Gymnasium, München

Zivildienst

1999 – 2000	Rettungssanitäter beim Malteser-Hilfsdienst München-Stadt
--------------------	---

Universitäre Ausbildung

2000 – 2007	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
--------------------	--

Studienaufenthalte	University of Tsukuba, Japan (2005) University of Sydney, Australien (2006) Mount Sinai School of Medicine, New York, USA (2006)
---------------------------	--

Graduiertenkolleg	Stipendiat im Graduiertenkolleg 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) am Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum der Universität München (2003 – 2005)
--------------------------	---

Beruflicher Werdegang

Seit 2007	Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum der Universität München, in der AG “Mikrozirkulation/Inflammation” (Prof. Dr. F. Krombach)
------------------	--