

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein,  
Technische Universität München

( Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring )

**Untersuchungen zur Bedeutung der neutrophilen  
Serinproteasen Proteinase 3 und Elastase an einem  
In vivo-Entzündungsmodell der Mäusehaut**

Denis Frenzel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. M. W. Ollert  
2. Priv. Doz. Dr. C. I. Traidl-Hoffmann

Die Dissertation wurde am 18.2.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.01.2009 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1.	Einführung.....	1
1.2.	Neutrophile Granulozyten.....	1
1.2.1.	Neutrophile Granula.....	2
1.3.	Neutrophile Proteasen („Neutrophil derived proteases“). .....	2
1.3.1.	Leukozyten-vermittelte lokalisierte Proteolyse.....	4
1.3.2.	Serinproteasen im Entzündungsgeschehen.....	5
1.3.2.1.	Papillon-Lefèvre Syndrom (PLS).....	5
1.3.2.2.	Alpha-1-Antityrpsin-Mangelsyndrom (AAT).....	6
1.3.2.3.	Serinproteasen im Hautmodell.....	6
1.4.	Molekulare Grundlage der Entzündungsreaktion.....	8
1.4.1.	Ödembildung (Leakage).....	8
1.4.2.	Rolling.....	9
1.4.3.	Sticking.....	9
1.4.4.	Transmigration .....	10
1.5.	Rolle von Serinproteasen an der Adhäsionskaskade .....	11
1.6.	Untersuchungsziel und Fragestellung .....	14
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1	Verwendete Materialien.....	15
2.2.	Verwendete Geräte.....	16
2.3.	Untersuchungen.....	17
2.3.1.	Versuchstiere.....	17
2.3.2.	Generierung der PRTN3 und ELA2 Doppelmutanten.....	18
2.3.3.	Narkosen.....	18
2.4.	Tiermodell der intravitalmikroskopischen Analyse.....	18
2.4.1.	Anatomie des Ohrs.....	18
2.4.2.	Depilierung des Mäuseohrs.....	19
2.4.3	Präparation des Ohrs.....	19
2.4.4.	Implantation des Dauerkatheters.....	19
2.5.	Entzündungsmodelle.....	20
2.5.1.	Irritative Dermatitis mit Croton Öl (ICD).....	20
2.5.2.	Reverse passive Arthus Reaktion (RPAR).....	21
2.6.	Intravitalmikroskopie.....	21
2.6.1.	Aufbau der intravitalmikroskopischen Messeinheit.....	21
2.6.2.	Lichtquelle zur Anregung der Fluoreszenz.....	22
2.6.3	Positionierung der Versuchstiere unter der Messeinheit und Aufnahme der Gefäßabschnitte .....	22
2.6.4.	Analyse der Mikrozirkulation.....	23
2.6.5	Auswerteeinheit.....	23
2.6.4.2.	Mikrozirkulatorische Parameter .....	23
2.6.4.3.	Kontrastverbessernde Maßnahmen.....	23
2.6.4.4.	Bestimmung des Gefäßdurchmessers.....	24
2.6.4.5.	Bestimmung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (LEI).....	24
2.6.4.6.	Bestimmung der Extravasation (Leakage) .....	25

2.7.	Weitere Parameter.....	25
2.7.1.	Atraumatische Ohrdickemessung.....	25
2.7.2.	Histologische Untersuchungen.....	26
2.7.2.1.	Histologische Färbungen.....	26
2.7.2.1.1.	Hämatoxylin/Eosin-Färbung.....	26
2.7.2.1.2.	CD 45 und Ly-6G.....	26
2.7.2.2.	Digitale Messung der Ohrdicke am histologischen Präparat.....	27
2.7.2.3.	Digitale Quantifizierung des leukozytären Infiltrats.....	27
2.7.2.4.	Direkte Quantifizierung des Neutrophileninfiltrats.....	27
2.8	Versuchsgruppen.....	28
2.8.1.	Intravitalmikroskopische Analyse der nativen Mikrozirkulation am Ohr der behaarten Maus (C57/B6/SV129) und der haarlosen (SKH- 1 hr) Maus.....	28
2.8.2.	Irritative Kontaktdermatitis (ICD) am Ohr der Maus.....	28
2.8.2.1.	Analyse der mikrozirkulatorischen Parameter bei der ICD durch Croton Öl.....	28
2.8.2.2.	Analyse der Ohrdicke und des leukozytären bzw. neutrophilen Infiltrats mittels Histologie und Immunhistologie.....	28
2.8.3.	Untersuchungen zur Arthus Reaktion.....	29
2.8.3.1.	Einfluss einer Applikation von Volumen ins Mäuseohr auf die Mikrozirkulation.....	29
2.8.3.2.	Evaluierung der RPAR am Mäuseohr.....	29
2.8.3.3.	Evaluierung der Induktion der RPAR durch kontinuierliches Online-Monitoring.....	29
2.8	Statistik.....	30
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1.	Etablierung des Tiermodells.....	32
3.1.1.	Normale Mikrozirkulation des genetischen Hintergrunds C57/B6/SV129 (+/+)......	32
3.1.2.	Unterschiedliche mikrozirkulatorische Parameter zwischen ventralem und dorsalem Ohr.....	35
3.2.	Irritative Kontaktdermatitis (ICD) durch Croton Öl.....	37
3.2.1.	Vergleichenbare mikrozirkulatorische Parameter bei PRTN3/ ELA2-defizienten Mäusen und deren Hintergrund.....	39
3.2.1.1	Kein Unterschied in der Ausprägung der Leakage während der ICD zwischen PRTN3/ ELA2(-/-) und (+/+) Hintergrund.....	39
3.2.1.2.	Kein Unterschied in der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion während der ICD zwischen PRTN3/ELA2(-/-) und (+/+).....	41
3.2.2.	Manuelle und histologische Untersuchungen zur PRTN3/ELA2-defizienten Knockout Maus im Vergleich zum Wildtyp während der ICD mit Croton Öl .....	43
3.2.2.1	Ergebnisse der kontinuierlichen Messung der Ohrdicke während der ICD.. .....	44
3.2.2.2	Ergebnisse der computerassistierten Ohrdickemessung.....	46
3.2.2.3	Vergleich der histologischen und manuellen Messungen der Ohrdicke.....	47
3.2.2.4	Zelluläre Infiltration im Rahmen der ICD zeigt keinen Unterschied zwischen PRTN3/ELA2(-/-) und (+/+).....	48
3.3.	Reverse passive Arthus Reaktion (RPAR).....	50

3.3.1.	Etablierung der RPAR am Modell des Ohrs der Maus.....	50
3.3.2.	Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen zur RPAR.....	54
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>57</b>
4.1	Wahl des Entzündungsreizes und des Untersuchungsmodells.....	58
4.1.1.	Irritative Kontaktdermatitis mit Croton Öl als Modell einer nicht- invasiven, nicht-antikörpervermittelten Entzündungsreaktion.....	58
4.1.2.	Entwicklung eines geeigneten Modells zur Untersuchung der Frühphase von Hautentzündungen an einem Mäusemodell.....	59
4.2.	Diskussion der Untersuchungstechniken.....	60
4.2.1.	Intravitalmikroskopie.....	60
4.2.2.	Mikrozirkulatorische Parameter.....	61
4.2.2.1.	Wahl der Narkose als beeinflussender Parameter auf die Mikrozirkulation.....	61
4.2.2.2.	Auswertung der mikrozirkulatorischen Parameter.....	61
4.2.3.	Spring-loaded Caliper.....	62
4.2.4.	Histologische Untersuchungen.....	62
4.3.	Diskussion der Ergebnisse.....	63
4.3.1.	Evaluation des Tiermodells.....	63
4.3.2.	PRTN3 und ELA2 im Entzündungsprozess.....	64
4.3.2.1.	PRTN3/ELA2-defiziente Mäuse.....	64
4.3.2.2	PRTN3/ELA2-defiziente Mäuse zeigen keine wesentlichen Unterschiede in immunologischen Parametern.....	64
4.3.2.3.	Kein Einfluss von PRTN3 und ELA2 auf die plasmazelluläre Leakage während der ICD durch Croton Öl.....	65
4.3.2.4.	Kein Einfluss von PRTN3 und ELA2 auf die Leukozyten- Endothelzell-Interaktion der ICD durch Croton Öl.....	67
4.3.2.5.	Kein Einfluss von PRTN3 und ELA2 auf die transendotheliale Migration der ICD durch Croton Öl.....	68
4.4.	Etablierung der RPAR am Ohr der Maus.....	71
4.5.	Einfluss der Art des Entzündungsmodells auf die Beteiligung von PRTN3 und ELA2.....	72
5.	Zusammenfassung.....	76
<b>6.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungen.....</b>	<b>94</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>104</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>105</b>
<b>10.</b>	<b>Abbildungs- Diagramm-, und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>106</b>

## Abkürzungsverzeichnis:

mm	=	Millimeter
µm	=	Micrometer
min	=	Minuten
h	=	Stunden
pg	=	picogramm
KG	=	Körpergewicht
i.v.	=	intravenös
D	=	Dalton
kD	=	Kilodalton
ICD	=	Irritative Kontaktdermatitis
RPAR	=	Reverse passive Arthus Reaktion
Ak	=	Antikörper
Ag	=	Antigen
NaCl	=	Natriumchlorid
OVA	=	Ovalbumin
PMA	=	Phorbol-12-myristate-13-aceton
FITC	=	Fluoreszeinisothiocyanat
FI	=	Fluoreszenzindex
COPD	=	Chronic obstructive pulmonary disease
ELA2	=	Neutrophile Elastase
PRTN3	=	Proteinase 3
CathG	=	Cathepsin G
PLS	=	Papillon-Lefèvre-Syndrom
PAF	=	Platelet-activating factor
PSGL-1	=	P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
ESGL-1	=	E-Selectin Glycoprotein Ligand 1
LFA	=	Leukocyte Function Associated Antigen
PECAM	=	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
VCAM	=	Vascular Cell Adhesion Molecule
ICAM	=	Intercellular Cell Adhesion Molecule
GlyCAM	=	Glycosylation Dependent Cell Adhesion Molecule
VE-CAD	=	Vascular Endothelial Cadherin
SLPI	=	Secretory Leukoprotease Inhibitor
IL-	=	Interleukin-
AS	=	Aminosäuren
Ig	=	Immunglobulin
BP	=	Bullöses Pemphigoid
LEI	=	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion
SD	=	Standard Deviation
fMLP	=	N-Formyl-L-Methyl-L-Leucin-L-Phenylalanin
TNF $\alpha$	=	Tumor Nekrose Faktor alpha
AAT	=	Alpha 1-Antitrypsin
ROI	=	Regions of Interest
PBS	=	Phosphate Buffered Saline
PMA	=	Phorbol-12-myristate-13-Acetat
PKC $\alpha$	=	Proteinkinase Calpha

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung

Akute Entzündungen der Haut zeigen sich charakteristischerweise in Form von Rötung, Schwellung, Erwärmung und Schmerz (Galenus). Seit etwa 100 Jahren ist die Emigration von Leukozyten und insbesondere von neutrophilen Granulozyten aus dem Blutkreislauf als entscheidender Schritt in diesem akuten Entzündungsgeschehen akzeptiert [84].

Hauptaufgabe der neutrophilen Granulozyten am Ort der Entzündung ist die Abtötung von Pathogenen und Fremdkörpern wie Bakterien, Pilze oder Parasiten. Sie endozytieren und degradieren diese pathogenen Erreger mit verschiedenen Waffen, wie hochreaktiven Sauerstoffspezies, antimikrobiellen Peptiden und Proteasen wie Proteinase 3, Elastase und Cathepsin G [1].

Erst seit einigen Jahren wird diesen letztgenannten Serinproteasen – neben der Infektabwehr – auch eine Rolle im Rahmen der Emigration zugesprochen. Sie werden dabei schnell während Entzündungsvorgängen aus intrazellulären Speichern auf der Membranoberfläche exprimiert und bleiben hier katalytisch aktiv [45]. Eine Vereinfachung der Emigration durch Serinproteasen ist beispielsweise durch Aufbrechen der interzellulären, endothelialen Kontaktzone, durch Abbau der Basalmembran oder der extrazellulären Matrix denkbar. Dennoch wird trotz internationaler Forschung ihre Beteiligung am Prozess der Emigration kontrovers diskutiert [244].

## 1.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind spezialisierte, phagozytosefähige Zellen und stellen die wichtigste Zelllinie in der angeborenen Immunabwehr dar. Täglich reifen  $10^{11}$  neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark heran und patrouillieren im Blutssystem nach Entzündungsreizen. Im Laufe ihres Reifungsprozesses durchlaufen sie mehrere Stadien, die durch unterschiedliche Expression von Oberflächenantigenen charakterisiert werden.

### 1.2.1 Neutrophile Granula

Auf der Stufe der Myeloblasten/Promyelozytenbildung beginnt die Bildung unterschiedlicher Granula durch das Ablösen von Transportvesikeln aus dem Golgi-Apparat und der anschließenden Fusion mehrerer dieser Vesikel [15]. Die Zusammensetzung und Dichte der Granula entspricht dabei dem Entwicklungsstand des neutrophilen Granulozyten [14]. Lange nach der Entdeckung der neutrophilen Granulozyten durch Paul Ehrlich und der Beschreibung ihrer Granula [64, 65] konnte mittels spezieller Färbetechniken eine Charakterisierung ihrer Funktion erfolgen.

Die heute gültige Klassifizierung unterscheidet primäre (azurophile), peroxidase-positive Granula von sekundären, peroxidase-negativen Granula sowie tertiären (Gelatine-) Granula [35]. Von den genannten Granula werden sekretorische Vesikel abgegrenzt. Sie zeichnen sich insbesondere durch leichte Degranulationsfähigkeit gegenüber Entzündungsmediatoren aus und beinhalten einen mobilen Pool für Oberflächenrezeptoren. Es bestehen strukturelle Ähnlichkeiten zu sekundären Granula [194].

### 1.3 Neutrophile Proteasen („Neutrophil derived proteases“)

Parallel zur Bildung von Granula bilden neutrophile Granulozyten im Laufe der Myelogenese eine Vielzahl an Proteasen. Zu ihnen zählen sekretorische und membrangebundene Metalloproteasen, Serinproteasen, Cysteinproteasen und andere lysosomale Enzyme. Serinproteasen, wie Proteinase 3 (PRTN3), neutrophile Elastase (ELA2) und Cathepsin G (CathG) werden in hohen Konzentrationen während der Myelogenese gebildet und in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert [73] (Abb. 1).

Alle neutrophilen Serinproteasen besitzen ein hohes Maß an Überschneidung in den biologischen Wirkungen. Sie werden in den Granula als inaktive Zymogene gespeichert und durch posttranslationale Abspaltung einer aminoterminalen Dipeptidgruppe durch das Enzym Dipeptidyl-Peptidase I (DPPI-1) aktiviert [2].

## Einleitung

---

Insbesondere PRTN3 und ELA2 teilen sich ein hohes Maß an Homologien, sowohl auf cDNA- als auch auf Proteinebene (Abb.2) [112]. Im Genom liegen ihre codierenden Abschnitte in der terminalen Region des kurzen Arms von Chromosom 19 dicht beieinander und werden durch die Gene des katalytisch-inaktiven Enzyms Azurozidin und vom aktiven Enzym Komplementfaktor D (Adipsin) flankiert [112].

PRTN3 wurde als sogenanntes „Wegener Autoantigen“, dem Hauptantigen bei der Wegenersch'en Granulomatose, berühmt. Der Hauptanteil des synthetisierten Proteins wird in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten und Monozyten gespeichert [80, 174]. Die Konzentrationen von PRTN3 liegen dabei nach Untersuchungen von Campbell et al. beim ausgereiften neutrophilen Granulozyten bei 13,4 mMol [42]. Ein niedriger pH-Wert und die Komplexbildung mit der Proteoglykan-Matrix hält das Enzym dabei in einem inaktiven Zustand, der durch Translokation in ein neutrales Milieu aufgehoben wird [13, 125]. Geringe Mengen PRTN3 werden auch in sekundären Granula und sekretorischen Vesikeln nachgewiesen [85, 239]. Weiterhin wird PRTN3 auch konstitutiv auf der Plasmamembran neutrophiler Granulozyten exprimiert [240].

PRTN3 ist identisch mit dem schon früher entdeckten Myeloblastin [34], einem Wachstumsprotein für hämatopoetische Vorläuferzellen [145].

ELA2 wird aus 267 Aminosäuren (AS) ebenfalls als ein inaktives Zymogen synthetisiert [211]. Das erste Translationsprodukt der ELA2 beträgt 32 kD und wird im endoplasmatischen Retikulum durch mannose-reiche Oligosaccharide erweitert. Durch diese Konversion entsteht eine 34 kD große Variante, die in eine biologisch aktive Form mit 218 AS und einem Molekulargewicht von 31 kD umgewandelt wird [85]. Die intrazelluläre Konzentration von ELA2 wird auf ca. 5 Mmol geschätzt [138].

Bei PRTN3 und ELA2 handelt es sich, trotz ihrer ähnlichen chemischen Struktur (Abb.2), nicht um austauschbare Enzyme. Sie zeigen überlappende biochemische Funktionen, haben aber eine unterschiedliche Substratspezifität.



## Einleitung

---

Ihr Substratspektrum deckt eine große Palette von sekretorischen Produkten, extrazellulären Matrixproteinen und zellulären Membranrezeptoren ab. Weitere Substrate sind lösliche Proteine der extrazellulären Flüssigkeiten, Kollagen, Elastin, Fibrin und Fibronectin sowie verschiedene Rezeptoren der Zelloberfläche [17, 132, 237]. PRTN3 und ELA2 sind darüber hinaus in der Lage Virulenzfaktoren von pathogenen Keimen zu inaktivieren [27, 143] und Thrombozyten zu aktivieren [180]. Die primäre biologische Rolle dieser beiden Serinproteasen wird jedoch in der Abwehr von Bakterien und Pilzen gesehen [28, 41, 73, 112]. Hier wirken sie als Abbauenzyme für aufgenommene Zelltrümmer und Mikroorganismen in den Phagolysosomen der neutrophilen Granulozyten [178]. Ihre besondere Bedeutung in der Erregerabwehr wird durch eine Beobachtung bei der Phagozytose von Bakterien gestützt: Erst durch Fusion von Phagolysosomen mit primären Granula werden, durch Anhebung des pH-Wertes auf neutrale Werte, optimale biologische Bedingungen für PRTN3 und ELA2 geschaffen [178].

CathG, als Dritte der neutrophilen Serinproteasen, unterscheidet sich von PRTN3 und ELA2 durch andere biologische Funktionen wie der Thrombozytenaktivierung [188], der Proteolyse von Gerinnungsfaktoren [218], Generation von Angiotensinogen II [163] und der chemotaktischen Aktivität für Monozyten [48]. CathG aktiviert Progelatinase B in vitro effizienter als PRTN3 und ELA2. Allerdings spaltet CathG seine Substrate deutlich langsamer als PRTN3 und ELA2 [171, 212].

### 1.3.1. Leukozyten-vermittelte lokalisierte Proteolyse

Ende der 90er Jahre wurde bekannt, dass neutrophile Granulozyten nach Stimulation mit bestimmten Entzündungsmediatoren mit einer schnellen Mobilisation und Translokation einer kleinen Fraktion ihrer Serinproteasen, PRTN3, ELA2 und CathG, auf die Zelloberfläche reagieren [40, 56, 161]. Hier binden sie vermutlich an schwach affinen Bindungsstellen [40, 56] und behalten ihre katalytischen Fähigkeiten bei [161]. Während der Transmigration bildet der neutrophile Granulozyt durch die Kontaktfläche mit dem Endothel einen geschützten Raum. Dieses Mikromilieu zwischen adhärennten neutrophilen Granulozyten und der Endothelzellschicht bietet einen optimalen Schutz vor Antiproteasen, da die meisten endogenen Antiproteasen zu groß sind, um diese Region zu penetrieren [124, 161].

Dieser biologische Trick verschiebt das Verhältnis zwischen Proteasen und Antiproteasen zugunsten der Proteasen [124]. Man spricht von Leukozyten-vermittelter lokalisierter Proteolyse [161], einem Prozess, der mit einer erleichterten Transmigration von neutrophilen Granulozyten in Verbindung gebracht wird [124].

### **1.3.2. Neutrophile Proteasen im Entzündungsgeschehen**

Die Komplexität der Serinproteasen im Entzündungsgeschehen lässt sich neben tierexperimentellen Ansätzen auch durch spezielle Krankheiten beschreiben. Zwei wichtige aber seltene Krankheiten stellen dabei das Papillon-Lefèvre-Syndrom (PLS) und das Alpha1-Antitrypsin (AAT)-Mangelsyndrom dar.

#### **1.3.2.1 Papillon-Lefèvre Syndrom (PLS)**

Neutrophile Serinproteasen werden durch das Enzym Dipeptidyl-Peptidase I (DPPI) aus ihren inaktiven Zymogenen aktiviert. Ein Mangel an diesem Enzym ist charakteristisch für das Krankheitsbild des Papillon-Lefèvre Syndroms (PLS).

PLS [83] ist eine seltene autosomal-rezessive Erkrankung mit einer Inzidenz von 4:1 Million [83, 90]. Es ist durch erythematöse, palmoplantare Hyperkeratosen und eine früh einsetzende Paradontitis mit nachfolgendem Zahnverlust charakterisiert. Obwohl nahezu alle PLS-Patienten unter einer starken Paradontitis leiden, sind nur 15-20% anfällig für rekurrende Infektionen wie Pyodermien der Haut und für bakterielle Abszesse der inneren Organe [7].

In einem kürzlich entwickelten Tiermodell mit funktionsloser DDPI kommt es wie beim PLS, durch fehlende Aktivierung zu einem Funktionsausfall für PRTN3, ELA2 und CathG [2].

Diese Tiere zeigen eine normale in-vitro Chemotaxis und in-vivo Akkumulation von neutrophilen Granulozyten während einer sterilen Peritonitis. In einem Modell der akuten Arthritis, durch passiven Transfer von Antikörpern gegen Kollagen II, waren diese Mäuse vor einer Akkumulation von neutrophilen Granulozyten geschützt. Der protektive Effekt korrelierte mit der Inaktivierung von neutrophilen Serinproteasen, da Doppelmutanten für ELA2 und GathG ebenfalls in diesem Modell keine Akkumulation zeigten. Zudem entwickelten diese DPPI-defizienten Mäuse reduzierte Immunkomplex -Reaktionen in einem „air pouch“- Modell [2].

### 1.3.2.2. Alpha-1-Antityrpsin (AAT)-Mangelsyndrom

Im Blutstrom verhindern normalerweise ubiquitär vorkommende Proteaseinhibitoren, dass Proteasen ihr destruktives Potenzial entfalten und biologisch aktiv werden. Neben dem prominentesten Proteaseinhibitor, dem akute-Phase-Protein AAT gibt es des weiteren mehrere zusätzliche Inhibitoren, wie der „Secretory Leukoprotease Inhibitor“ (SLPI),  $\alpha$ 2-Makroglobulin und Eglin C [156]. Sie verhindern einen überschießenden Abbau von gesundem Gewebe durch Proteasen.

Patienten mit einem angeborenen Mangel an AAT, dem wichtigsten Inhibitor von PRTN3, ELA2 und CathG, leiden durch Ungleichgewicht zugunsten der Proteasen an einem kontinuierlichen Abbau des Lungenstützgewebes. An einem Hamstermodell wurde ein vergleichbarer Abbau des Lungengewebes, nach intratracheal applizierter Elastase, beobachtet [107]. Der Abbau von Bindegewebsbestandteilen wird aber nicht nur allein durch AAT kontrolliert, sondern zudem über die Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) gesteuert. MMP-9 wird in den tertiären Granula neutrophiler Granulozyten gespeichert und nach Aktivierung ausgeschüttet [46]. In unmittelbarer Umgebung des neutrophilen Granulozyten ermöglicht MMP-9 die Entfaltung des proteolytischen Potenzials von PRTN3 und ELA2 durch Inaktivierung ihres Inhibitors AAT [142].

Das AAT-Mangelsyndrom unterstreicht durch den klinisch bedeutsamen Rückgang des pulmonalen Stützgerüsts die Fähigkeit der neutrophilen Serinproteasen zum Abbau extrazelluläre Matrix. Ein ähnlicher Befund stellt sich bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) bei Rauchern ein, da Rauchbestandteile als wichtiger Inhibitor des AAT wirken.

### 1.3.2.3. Serinproteasen im Hautmodell

Im Tiermodell wurde der Einfluss von Serinproteasen auf verschiedene experimentelle, antikörpervermittelte Entzündungsreaktionen an der Haut untersucht. Dabei handelte es sich um Studien am Modell des bullösen Pemphigoids und der immunkomplex-vermittelten Arthus Reaktion [141], [168].

Im Model zum bullösen Pemphigoid führen Injektionen von anti-BP180 IgG (Immunglobulin G) bei neonatalen Mäusen unter Beteiligung von Komplementsystem, Immunkomplexen, Mastzellen und neutrophile Granulozyten zur Blasenbildung [137]. Mäuse ohne funktionelle ELA2 zeigten sich in diesem Modell resistent gegenüber Blasenbildung.

## Einleitung

---

Darüber hinaus wurde eine reduzierte Infiltration von neutrophilen Granulozyten 12 h nach Injektion von IgG gegen hemidesmosomale Antigene zwischen ELA2-defiziente Mäusen beobachtet [136].

Die Arthus-Reaktion gehört zu den immunkomplex-vermittelten Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ III nach Gell und Coombs. 1903 wurde von Arthus eine lokale Typ-III Reaktion nach intradermaler Injektion des entsprechenden Antigens bei hyperimmunisierten Tieren beschrieben [12]. Sie ist durch Ödembildung, Neutrophilie, Hämorrhagie und schließlich Gewebenekrose gekennzeichnet. In der reversen passiven Arthus Reaktion (RPAR) wird lokal ein Überschuss an Antikörpern vorgelegt und das entsprechende Antigen intravenös verabreicht. Das resultierende perivaskuläre Depot von Immunkomplexen in der Dermis gewährleistet eine rasche inflammatorische Antwort. Doppelmutanten für PRTN3 und ELA2 zeigten eine verringerte Ödembildung 60 min nach Einleitung der RPAR gegenüber dem Wildtypstamm [168]. Damit konnte gezeigt werden, dass PRTN3 und/oder ELA2 bereits in der Frühphase der dermalen Arthus-Reaktion einen verstärkenden Einfluss ausüben. Auch hämorrhagische Veränderungen waren nach 6 h deutlich ausgeprägter als in PRTN3 /ELA2-defizienten Tieren [168].

Ein Einfluss der neutrophilen Serinproteasen auf verschiedene Entzündungsmodelle der Haut zeigt sich also nicht nur nach 12 h im Modell des bullösen Pemphigoids, sondern spielt auch in der Frühphase der Entzündungsreaktion der RPAR bereits nach 60 min eine Rolle. Beide Modelle stellen dabei einen unterschiedlichen inflammatorischen Prozess dar, teilen aber allgemeine Prinzipien der akuten Entzündungsreaktion. Auf die molekulare Grundlage der akuten Entzündungsreaktion wird daher im nächsten Kapitel speziell eingegangen.

### 1.4. Molekulare Grundlage der Entzündungsreaktion

Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut, über das Endothel der Blutgefäße, ist ein zentrales Ereignis bei der zellulären Antwort des Immunsystems auf entzündliche Reize aller Art [84]. Aufgrund der Bedeutung von neutrophilen Granulozyten und Endothel wird dieser, als Extravasation bezeichnete Begriff, auch als Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (LEI) zusammengefasst. Dieser Prozess findet hauptsächlich in den kleinsten venösen Blutgefäßen, den postkapillären Venolen, statt. Voraussetzung für die Extravasation der Leukozyten ist deren rezeptorvermittelte Adhäsion an der Gefäßwand, die wegen der ineinander greifenden Bindungsschritte als Adhäsionskaskade bezeichnet wird [201].

Dieser Prozess wurde in der Vergangenheit aus didaktischen Gründen in eine Phase der Ödembildung (Leakage) und einer Phase der LEI, mit ihren Schritten Rollings, Sticking und Transmigration, unterteilt [39].

#### 1.4.1 Barrierestörung des Endothels (Leakage)

Die Barrierefunktion des Endothels wird über spezialisierte interzelluläre Kontaktstellen vermittelt. Wird die Integrität dieser Barriere gestört, so kommt es zum Austritt von höhermolekularen Molekülen aus dem Blutstrom und, folgend dem osmotischen Gradienten, zum Austritt von Wasser und somit zum Ödem (Abb. 3). Wichtigste Auslöser für die Barrierestörung (Leakage) sind vasoaktive Substanzen wie Histamin oder Thrombin, die durch Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette zur Kontraktion der Endothelzellen mit nachfolgender Öffnung der Zell-Zell-Kontakte führen [8, 172]. Ein anderer Mechanismus, der die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion steuert, wird durch „Vaskular-Endothelial-Cadherine“ (VE-Cadherin, CD144) vermittelt. VE-Cadherin wird ausschließlich an den „Adherens Junctions“ der Endothelzellen exprimiert und spielt auch bei der Transmigration eine Rolle [8, 52, 225, 226]. Im Gegensatz zur Leakage, die z.T. vor oder parallel zur LEI auftreten kann, sind Rolling, Sticking und Transmigration in der Regel zeitlich aufeinanderfolgende Prozesse.

### 1.4.2. Rolling

Der erste Schritt der LEI ist das Rollen („Rolling“) der neutrophilen Granulozyten entlang der Oberfläche von inflammatorisch veränderten Endothelzellen (Abb. 4). Die Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und Leukozyten werden, während des Kontakts der fließenden Zellen mit dem Endothel, von der Selektin-Familie und ihren Gegenrezeptoren vermittelt. Diese kurzen und reversiblen Bindungen vermitteln das Rollen von neutrophilen Granulozyten auf der Endotheloberfläche.

Selektine sind kohlenhydrat-bindende, auf Zellkontakte spezialisierte Membranproteine. Entsprechend ihres Ursprungs werden sie in L- (Leukozyten), E- (Endothel) und P-Selektine (Plättchen und Endothel) eingeteilt. Alle Selektine binden an komplexe Kohlenhydratverbindungen, die sich durch eine gemeinsame Sialyl-LewisX-Kohlenhydratstruktur (wie z.B. bei GlyCAM [227]) auszeichnen.

### 1.4.3. Sticking

Durch die räumliche Nähe zwischen Leukozyten und Endothelzellen während des Rollings aktivieren Chemokine, wie „Platelet Activating Faktor“ (PAF) oder Interleukin-8 (IL-8) [152], die rollenden Leukozyten mittels G-Protein-gekoppelter Chemokinrezeptoren [20, 131]. Das Chemokin PAF kann z.B. nach Stimulierung von Endothelzellen durch Histamin oder Thrombin, aus sogenannten Weibel-Palade-Körperchen, binnen Minuten an der Zelloberfläche exprimiert werden [237]. Diese Signale führen innerhalb weniger Sekunden zur Expression und Aktivierung sogenannter Integrine (CD11a,b/CD18) auf der Leukozytenoberfläche. Dadurch erhöht sich die Affinität der Leukozyten für die entsprechenden Liganden so stark, dass aus dem „Rolling“ ein vollständiges Anhalten („Sticking“, Abb. 3) wird [201].

Man unterscheidet dabei LFA-1 (CD11a/CD18) von Mac-1 (CD11b/CD18), das in Granulozyten und Monozyten unter Aktivierung aus Speichergranula freigesetzt und an die Oberfläche transportiert wird. LFA-1, welches im ruhenden Zustand an das Zytoskelett gebunden ist, wird nach Aktivierung durch so genannte „inside-out“ Signale freigegeben [221].

## Einleitung

---

Die wichtigsten Liganden von LFA-1 und Mac-1 sind die „Intercellular Adhesion Molecules“ (ICAMs) auf den Endothelzellen, die als ICAM-2 (CD102) und ICAM-3 (CD50) permanent vorhanden sind oder wie ICAM-1 (CD54) durch Zytokine zur Expression aktiviert werden [10, 11, 57, 88]. Die starke integrin-vermittelte Bindung führt zu einer Abflachung der Leukozyten. Die resultierende Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Leukozyt und Endothelzellschicht wirkt wiederum bindungsverstärkend (Abb.5).

### 1.4.4. Transmigration

Der am Endothel fest anhaftende Leukozyt liegt jetzt an einer formbaren Grenzsicht aus Endothelzellen, die untereinander mit zwischenzellulären Kontaktstellen verbunden sind. Um den Prozess der Transmigration zu initiieren, müssen Leukozyten die interendothelialen Verbindungen spalten, um die darunter liegende Basalmembran zu erreichen.

In vielen Studien wurde gezeigt, dass Leukozyten parazellulär, also zwischen benachbarten Endothelzellen transmigrieren können [38, 115] (Abb.6). Diesem Weg wurde allerdings durch ultra-strukturelle Untersuchungen ein weiterer, transzytotischer Weg entgegengesetzt [74]. Heute werden sowohl der parazelluläre, als auch der transzytotische Mechanismus nebeneinander akzeptiert [226].

In letzter Zeit konnte die Beteiligung zweier Adhäsionsmolekülen, dem „Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1“ (PECAM-1) [157, 182, 223] und CD 99 [190] im Prozess der leukozytären Transmigration klar aufgezeigt werden. Beide Moleküle werden sowohl auf neutrophilen Granulozyten als auch in endothelialen Verbindungsstellen exprimiert. Eine wichtige Struktur im Prozess der parazellulären Transmigration scheinen die „Adherens Junctions“ zu sein [31, 128] über die Endothelzellen miteinander verbunden sind. Sie bilden die ersten lateralen Zell-Zell-Kontaktstellen bei der Proliferation von Zellen und sind mitverantwortlich für die Ausbildung von Zell-Polaritäten sowie die Bildung und Stabilisierung von „Tight Junctions“ und „Gap-Junctions“ [86].

Ein Adhäsionsprotein der „Adherens Junctions“ in Endothelzellen ist VE-Cadherin, das über Catenine mit dem Zytoskelett der anliegenden Endothelzellen verbunden ist [1]. Ein Charakteristikum dieser „Adherens Junctions“ ist ihre schnelle und reversibel-dynamische Organisation. Diese Strukturen können sich unter bestimmten Bedingungen innerhalb von Minuten des- und wieder reorganisieren.

Ob die Desorganisation hauptsächlich auf mechanischem Weg, durch Signaltransduktion oder durch lokalisierte Proteolyse der transmigrierenden Zellen, geschieht, ist Gegenstand einer anhaltenden Diskussion [37].

### **1.5. Rolle von PRTN3 und ELA2 im Rahmen der Adhäsionskaskade**

Die Rolle der Serinproteasen im Prozess der LEI ist aufgrund der uneinheitlichen Datenlage noch weitgehend ungeklärt. Inhibitionsstudien mit Antiproteasen zeigten eine reduzierte Infiltration von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe [241, 247]. Da alle Schritte der LEI für eine erfolgreiche Migration notwendig sind [39, 201,] bleibt es unklar auf welcher Stufe der Ausfall von PRTN3 und ELA2 die entscheidende Rolle spielt. Möglicherweise ist die Adhäsionsfähigkeit von neutrophilen Granulozyten gestört. Dies zumindest lassen in-vivo Inhibitionsstudien der Serinproteasen an matrix-beschichteten Oberflächen und an Endothelzellschichten vermuten [44, 59].

Die Relevanz und Rolle von PRTN3 und ELA2 bei der neutrophilen Extravasation, sei es nun im Bereich der „Adherens Junctions“, der darunterliegenden Basalmembran oder der extrazellulären Matrix, ist ebenfalls Gegenstand einer anhaltenden Diskussion [37]. Die Beteiligung von PRTN3 und ELA2 im Prozess der Transmigration ist, insbesondere nach Beschreibung der leukozyten-vermittelten lokalisierten Proteolyse [45], besonders umstritten.

Schon 1999 wurde eine Beteiligung von neutrophilen Proteasen im Prozess der Transmigration durch Cepinkas und Mitarbeiter vermutet [45]. In vitro Untersuchungen an Endothelzell-Kulturen konnten die Fähigkeit von ELA2 aufzeigen, Komponenten von VE-Cadherin während der Adhäsionsphase abzubauen [5, 58]. Der Abbau dieses wichtigen Adhäsionskomplexes im Bereich der Adherens Junctions wurde mit der Formation von Lücken im Endothel assoziiert, durch die neutrophile Granulozyten transmigrieren konnten [93].



## Einleitung

---

Als alternativer Mechanismus der Wirkungsweise neutrophiler Serinproteasen im Transmigrationsgeschehen wurde ein erleichtertes Abkoppeln von vorher gebundenen Strukturen des Endothels und der extrazellulären Matrix vorgeschlagen. ELA2 ist nachweislich in der Lage Adhäsionsmoleküle wie ICAM- 1 und VCAM-1 in vivo zu spalten, die schon während der festen Adhärenz am Endothel (Sticking) und der Transmigration eine Rolle spielen [46, 130].

Andererseits konnten Untersuchungen mit natürlich vorkommenden Serinprotease-Inhibitoren und neuen, kleinen („low-molecular-weight“) Inhibitoren keine Beteiligung der Serinproteasen an der transendothelialen Migration von neutrophilen Granulozyten in vitro [147] als auch an der Aufspaltung der Basalmembran während der Transmigration nachweisen [102].

Unbestritten ist dagegen die Fähigkeit dieser Serinproteasen in vitro zahlreiche Komponenten der extrazellulären Matrix und der Basalmembran zu degradieren [161, 181]. Noch in Gegenwart von hoch effektiven Inhibitoren sind sie in vivo in der Lage Matrixproteine wie Kollagen IV, Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Elastin abzubauen.

Vor einigen Jahren wurden erstmals intravitalmikroskopische Beobachtungen bei einer Evaluationsstudie zu den neutrophilen Serinproteaseinhibitoren L658, 758 und Eglin C vorgestellt. An Venen des Cremastermuskels wurde die Rolle von ELA2 während der Emigration von neutrophilen Granulozyten nach Infundierung von „platelet aggregation factor“ (PAF) und N-Formyl-L-Methyl-L-Leucin-L-Phenylalanin (fMLP) in vivo und online beobachtet. Hier zeigte sich eine Beteiligung von ELA2 an der transendothelialen Migration, aber nicht an der Adhäsionsfähigkeit von Leukozyten am Endothel [241]. Gegensätzliche Ergebnisse zur Beteiligung von ELA2 am Migrationsprozess kamen hauptsächlich von in vitro Studien [6, 72] in denen die Rolle von PRNT3 nicht ausreichend berücksichtigt wurde. Dabei ist PRNT3 wie ELA2 in vitro in der Lage Komponenten der Basalmembran zu spalten [175]. Eine Überlappung der Abbaufunktionen von Basalmembran und Matrixbestandteilen dieser beiden Serinproteasen könnte die Interpretation früherer Studien mit ELA2-defizienten Mäusen oder mit monospezifischen synthetischen Proteaseinhibitoren erschweren.

## Einleitung

---

Obwohl die Rolle von neutrophilen Serinproteasen im Rahmen der Adhäsionskaskade noch nicht verstanden wird, ist die klinische Signifikanz von PRTN3 und ELA2 bei einigen Krankheiten unumstritten. Bei Patienten mit angeborenem AAT-Mangel und im Rahmen der COPD bei Rauchern (Substanzen im Tabakrauch wirken als starke Inhibitoren für AAT) kommt es durch übersteigerten Bindegewebsabbau zur frühzeitigen Entwicklung eines Emphysems. Neuerdings zeigen sich auch in anderen Krankheitsmodellen eine pathophysiologische Beteiligung von Serinproteasen, wie z.B. beim akuten Lungenversagen [118] und in Tiermodellen wie der antikörper-vermittelten Arthritis [2] und des bullösen Pemphigoids [141]. Daher wird schon seit längerem versucht, optimale, proteinbasierte Serinproteaseinhibitoren mit einem kleinen Molekulargewicht für den klinischen Einsatz zu entwickeln.

### 1.6 Untersuchungsziel und Fragestellung

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung der Rolle von PRTN3 und ELA2 im Prozess der Emigration neutrophiler Granulozyten an der entzündeten Haut. Anhand eines genetischen Ansatzes mit Depletion dieser beiden neutrophilen Serinproteasen sollte eine überlappende Kompensation, wie in früheren Monodepletionen möglicherweise stattfindend, vermieden werden.

Dabei dient die akute irritative Kontaktdermatitis mit Croton Öl als nicht antikörpervermitteltes und nicht invasives Entzündungsmodell. Als antikörpervermitteltes Entzündungsmodell wird die RPAR als Standardmodell einer Immunkomplexreaktion gewählt. Die online und in-vivo Dokumentation ermöglicht bereits in einer frühen Phase der Entzündungsreaktion die intravitalmikroskopischen Analyse der mikrozirkulatorischen Veränderungen zwischen Wildtyp und PRTN3/ELA2-defizientem Mäusestamm. Weitere Untersuchungen beleuchten einen möglichen Unterschied zu späteren Zeitpunkten. Dadurch sollen mehrere Fragen beantwortet werden:

- Gibt es Unterschiede in der Ödembildung in der frühen oder der späten Phase von akuten Entzündungsreaktionen durch die Abwesenheit von PRTN3 und ELA2?
- Wirkt sich der Mangel an PRTN3 und ELA2 auf die LEI (Rolling, Sticking, Transmigration) aus?
- Gibt es einen Unterschied dieser Auswirkungen zwischen einem nicht antikörpervermittelten Entzündungsmodell und einer antikörpervermittelten Entzündungsreaktion (Arthus Reaktion)?

Die Klärung dieser Fragen soll einen Beitrag zum Grundverständnis der Rolle von neutrophilen Serinproteasen im akuten Entzündungsgeschehen leisten. Damit soll langfristig dem klinischen Einsatz von Serinproteaseinhibitoren Vorschub geleistet werden.

## 2. Material und Methodik

### 2.1. Verwendete Materialien

Rhodamin 6G (Mr 472,02D, Sigma Chemical Comp., Deisenhofen, Deutschland)  
FITC-Dextran (Mr 150 000D, Sigma Chemicals Comp., Deisenhofen, Deutschland)  
F<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.35, 0.015 L/L Isoflurane (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland)  
Rabbit IgG Fraktion gegen Ovalbumin (Katalognr. 55304 Lotnr. 40352, ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland)  
Laborfutter (18000 IE/kg Vit. A, 1280 IE/kg Vit. D3, 120 mg/kg Vit. E; Spezialdiäten, Soest, Deutschland)  
Plica®med (Willy Rusch Hospital Vertriebs GmbH, Böblingen, Deutschland)  
Hautdesinfektion (Kodan® Tinktur-Forte Spray, Fa. Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland)  
Heparin-Kochsalzlösung (Mischverhältnis 1:1000, Heparin-Natrium, 5.000 IE/ml, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)  
Ovalbumin (Albumin vom Hühnerei) (A2512 Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)  
Croton Oil (C6719, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)  
Ketavet® (Ketaminhydrochlorid, 100mg/ml Injektionsflasche, Pharmacia und Upjohn GmbH, Heppenheim, Hessen)  
Rompun® (Xylazinhydrochlorid 2% Injektionsflasche, Pharmacia und Upjohn GmbH, Heppenheim, Hessen)  
Isotone Natriumchloridlösung 0,9% (50ml, Braun, Kronberg, Deutschland)  
Anti-Rat Link for mouse tissues (Cat. No. AS-2100-16m Bio Genex, San Ramon, USA)  
Super Sensitive Ready-to-use Detection Kit (Cat No QA000-5L, Bio Genex, San Ramon, USA)  
PBS-Stocksolution: 25g Natriumhydrogenphosphat 4,9g Kaliumhydrogenphosphat gelöst in einem Liter Aqua dest. und anschließend 160g NaCl zugeben. pH auf 7,2-7,4 einstellen  
Wasserpuffer: PBS-Stocksolution 1:20 mit Aqua dest. verdünnen (Hausapotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland)  
BSA (ORHD 20/21, Behring, Marburg, Deutschland)  
Puffer für primären Antikörper: PBS/BSA 1%ig (Hausapotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland)  
Purified Rat Anti-Mouse CD45 Cat. No. 550535, 62,5µg/ml BDPharMigen, San Diego, USA)  
Purified Rat Anti-Mouse Ly-6G Cat. No. 551459,0,5µg/ml, BDPharMigen, San Diego, USA)  
Formalin (Hausapotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland)  
Croton Öl-Gemisch (1%iges Croton Öl in Aceton/Olivenöl 4:1)  
Trägeröl (Aceton/Olivenöl 4:1)

### 2.2. Verwendete Geräte

Kleinwaage PB 300 (Mettler ,Gießen, Deutschland)  
Observationsplattform (Effenberger, Pfaffing, Deutschland)  
Haltefäden (Ethibond 5.0®, Ethicon, Norderstedt, Deutschland)  
Seide, geflochten, 5-0 (Pearsalls Sutures, Somerset, England)  
Yarsagil-Klemme (Yarsagil®, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland)  
Mikrochirurgischen Kanüle (FST, Heidelberg, Deutschland)  
Fräsmaschine (Deckel, München, Deutschland)  
Bewegungsführungssystem (THK, Japan)  
Axiotech vario (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)  
Projektionsokular (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)  
CCD-Kamera (charge cubbled device) FK 6990 IQ-S (Lichtempfindlichkeit 0,02 Lux, 699 x 581 Bildpunkte, Fa. Pieper, Schwerte, Deutschland)  
Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100W (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)  
Kaltlichtquelle (Kaltlichtfontäne 485, Fa. Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland)  
Videozeitgenerator (VT 633; Fora Company Ltd., Tokyo, Japan)  
Videorekorder (SvO-9500 MDP, Sony GmbH, Köln, Deutschland)  
VHS Videobändern (Sony GmbH, Köln, Deutschland)  
Videobildschirm (PVM-2043 MD Sony GmbH, Köln, Deutschland)  
Bildverarbeitungseinheit, IP-512 (Imaging Technologie Inc., Woburn, USA)  
Computer (M380 XPI, Olivetti, Italien)  
Videomonitor (PVM-1442QM, Sony GmbH, Deutschland)  
Mikrozirkulations-Analyse-Systems (Cap-Image®, Dr. Zeitl, Heidelberg, Deutschland)  
Auswertesystem KS300®  
Rundstanze (0,7 mm Durchmesser, Baumarkt, Deutschland)  
Pipette 10 µl (Firma Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)  
Pipettenspitzen 10 µl (Firma Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

### 2.3. Untersuchungen

Die im folgenden vorgestellten Untersuchungen wurden in der Zeit von Mai 1999 bis Dezember 2003 mit Genehmigung der zuständigen Behörde der Regierung von Oberbayern (Aktenzeichen: 69/99) am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwigs-Maximilians-Universität durchgeführt. Das tierexperimentelle Protokoll folgte den Vorschriften zum Schutz von Labortieren „Principles of Laboratory Animals“ der National Society for Medical Research (USA), sowie dem „Guide for Care and Use of Laboratory Animals“ der National Academy of Science und dem National Institute of Health (USA) (Publication No. [NHI]86-23, revised 1985). Nach Beendigung der Versuche wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital® (100 mg/kg intraperitoneal) euthanasiert.

#### 2.3.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche Mäuse der Art C57/B6-129SV mit einem Gewicht von 18-24g. Die Tiere stammten aus hauseigener Zucht und wurden im Tierstall des Instituts für chirurgische Forschung (ICF) unter hepatitisfreien Bedingungen bei freiem Zugang zu Wasser und normalem Laborfutter (18000 IE/kg Vit. A, 1280 IE/kg Vit. D3, 120 mg/kg Vit. E; Spezialdiäten, Soest, Deutschland) gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug 24°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50%. Es bestand ein wechselnder Licht-Dunkelrhythmus von 12 h. Vor dem Versuch wurden die Tiere auf einer Kleinwaage gewogen (PB 300, Mettler, Gießen, Deutschland). Die PRTN3/ELA2-Doppelknock-out Mäuse und ihr Hintergrund (weiblich 18-24g) stammen aus einem hepatitisfreien Tierstall des Forschungszentrums für Gesundheit und Umwelt (GSF) in Neuherberg. Sie waren demselben Licht-Dunkelrhythmus, Außenbedingungen und Futterfrequenz unterworfen wie die Tiere aus dem ICF. Die PRTN3/ELA2-Doppelknock-out Mäuse wurde durch homologe Rekombination des mPRTN3 /mELA2 Lokuses durch Inaktivierung beider hintereinander geschalteten Gene für PRTN3 und ELA2 im Rahmen eines Projekts zur Wegenerschen Granulomatose des Max-Planck-Institut für Neurobiologie generiert [168].

### 2.3.2. Generierung der PRNT3/ELA2-Doppelmutanten

Für Kreuzungen wurden in der Regel 2 weibliche Tiere mit einem Männchen gekreuzt. Die Nachkommen wurden nach ca. 3 Wochen von den Eltern getrennt und gleichgeschlechtliche Tiere desselben Wurfes in Gruppen bis höchstens 5 bzw. 15 Tieren (je nach Käfiggröße) gehalten. Stichprobenartig wurden den Mäusen Schwanzbiopsien entnommen und mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genetisch charakterisiert. Um PRNT3/ELA2-defiziente Mäuse von Wildtyp-Tieren zu unterscheiden, wurde genomische DNA mittels PCR unter Verwendung geeigneter Sonden hinsichtlich des PRNT3/ELA2-Lokus analysiert (Abb. 7).

### 2.3.3. Narkosen

Zur intravitalmikroskopischen Untersuchung wurden die Mäuse durch Inhalation von Isoflurane (FiO<sub>2</sub> 0.35, 0.015 L/L Isofluran, Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden, Germany) betäubt, und nach Beendigung der Versuche unter laufender Narkose mit einer Überdosis Phentobarbital intraperitoneal getötet. Zur Depilation wurden die Versuchstiere mit einer intramuskulären Gabe einer Ketavet® und Rompun® (0,3 ml Ketavet, 0,3 ml Rompum und 0,4 ml NaCl 0,9%; 20-30 µl) narkotisiert.

Während der Präparationen wurden die Mäuse auf einer geheizten Observationsplattform gelagert um die Körpertemperatur bei 37,0° C aufrechtzuerhalten. Zur Applikation des Croton Öls auf das Ohr wurde eine Kurznarkose mit Äther durchgeführt.

## 2.4. Tiermodell der intravitalmikroskopischen Analyse

### 2.4.1. Anatomie des Ohrs

Das Ohr der Maus misst ungefähr 12x12 mm bei Dicke von ca. 300 µm (Abb.8) [23]. Dieses letzte Charakteristikum ist wichtig, da es eine intravitale Transillumination und eine direkte Visualisierung der Mikrozirkulation des Ohrs ermöglicht. Das Ohr besteht aus zwei voll ausgebildeten Hautschichten, die durch eine zentral liegende Knorpelschicht voneinander getrennt werden. Jede Schicht ist durch eine dünne Epidermis und eine tiefe Dermis charakterisiert und auf beiden Seiten nur schwach mit dem Knorpel fixiert [22].

Das Ohr wird von drei großen, an der Basis eintretenden, Gefäßnervenbündeln versorgt, die in der Peripherie durch bogenförmige Arkaden miteinander in Verbindung stehen [69].

Ein Gefäßnervenbündel beinhaltet jeweils eine Arterie (50-60  $\mu\text{m}$ ), eine Vene (50-400  $\mu\text{m}$ ) und einen Nerv zur neurovaskulären Versorgung des Ohrs. Aus diesen Bündeln entspringen Arterien und Venen abnehmender Ordnung. Anderen mikrovaskulären Netzwerken entsprechend, verzweigen sich die Arteriolen (15-60  $\mu\text{m}$ ), die parallel den größeren Venolen (20-50  $\mu\text{m}$ ) verlaufen (Abb. 8), in 4-8  $\mu\text{m}$  Kapillaren.

Die ersten 3 Ordnungen der Blutgefäße verlaufen auf beiden Seiten des Knorpels tief in der Dermis und der Epidermis und sind gelegentlich durch irregulär geformte Löcher in der Knorpelschicht verbunden [21].

### 2.4.2. Depilierung des Mäuseohrs

Drei Tage vor dem Versuchsbeginn wird das linke Ohr der behaarten Mäuse unter einer intramuskulären Ketavet/Rompum-Narkose (0,3 ml Ketavet, 0,3 ml Rompum und 0,4 ml NaCl 0,9%; Injektion von 20-30  $\mu\text{l}$ ) mit einer Enthaarungscreme (Plicamed, Willy Rusch Hospital Vertriebs GmbH, Böblingen, Deutschland) depiliert. Der zeitliche Vorlauf ist nötig um eine Einflussnahme der Enthaarungscreme auf die Mikrozirkulation des Ohrs zu minimieren. Das Ohr muss nach der Prozedur mit NaCl (0,9%) gespült werden, da Mäuse aggressiv auf den Geruch reagieren und sich mitunter im Käfig gegenseitig die Ohren abbeißen.

### 2.4.3. Präparation des Ohrs

Unter einem Operationsmikroskop (Wild, Heerbrug, Schweiz) wird das Mäuseohr mit 3 sehr kleinen Halteschlaufen (Ethibond 9.0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) in 3-, 6- und 9 Uhr - Position versehen. Zum Ausspannen des Ohrs werden diese Schlaufen mit Haltefäden (Ethibond 5.0, Ethicon, Norderstedt) angeschlungen und an der Plexiglasbühne mit Klebeband fixiert. Diese Lagerung erlaubt ein flaches Anliegen des Ohres auf der Plexiglasbühne ohne Beeinflussung der Mikrozirkulation [33].

### 2.4.4. Implantation des Dauerkatheters

Die Implantation des Katheters bei Mäusen der Versuchsreihe 4 wurde etwa 1 h vor Versuchsstart unter sterilen Bedingungen und gleicher Anästhesie durchgeführt. Hierfür wurde die Halsregion mit der Enthaarungscreme (Plicamed, Willy Rusch Hospital Vertriebs GmbH, Böblingen, Deutschland) enthaart und das Tier fixiert in Rückenlage gebracht.



Nach einer zweiminütigen Hautdesinfektion (Kodan Tinktur-Forte Spray, Fa. Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) wurde die Haut paramedian mit einem ca. 1 cm langen Schnitt vom rechten Unterkiefer bis zur rechten Clavicula eröffnet.

Mit zwei spitzen chirurgischen Pinzetten wurde das subkutane Fettgewebe frei präpariert und anschließend die Vena jugularis dargestellt. Um die Vena jugularis wurden kaudal zwei, sowie kranial eine Ligatur zur Schlinge gelegt. Nach dem Zuziehen der kranialen Schlinge wurde neben den kaudalen Ligaturen eine Yarsagil-Klemme angelegt. Die Vene wurde dann mit einer spitzen Pinzette gefasst und mit einer Gefäßschere eröffnet. Nach Durchspülen des Katheters mit einer Heparin-Kochsalzlösung (Mischverhältnis 1:1000) wurde dieser in dem Gefäß platziert und bis zur Yarsagil-Klemme vorgeschoben, sodass die, den Katheter sichernden, Ligaturen zugezogen werden konnten. Die Yarsagil-Klemme wurde anschließend entfernt und der Katheter um weitere ca. 15 mm vorgeschoben. Sobald die Durchgängigkeit des Katheters und somit seine intravasale Lage gesichert war, wurden die Ligaturen endgültig chirurgisch verknotet und der Katheter ebenfalls durch Knoten verschlossen. Der venöse Katheter wurde in gleicher Weise implantiert. Die Hautwunde wurde mit 4-5 Einzelkopfnähten verschlossen.

## 2.5. Entzündungsmodelle

### 2.5.1. Irritative Dermatitis mit Croton Öl (ICD)

Zum Auslösen der akuten irritativen Kontaktdermatitis wurde das nicht-sensibilisierende Irritanz Croton Öl (Sigma 1%) [217], ein Öl der mexikanischen Pflanzen *Croton tiglium*, das zu einem starken neutrophilen Infiltrat führt, verwendet. Mit Hilfe einer Mikropipette wurde 10 µl 1%iges Croton Öl (in Aceton/Olivenöl 4:1) auf der ventrale Seite des Ohres gleichmäßig aufgetragen.

### 2.5.2. Reverse passive Arthus Reaktion (RPAR)

Mit der Hilfe einer speziellen mikrochirurgischen Kanüle (FST, Heidelberg, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von ca. 0,2 mm wurde 5 µl des Antikörper (Kanninchen IgG Fraktion gegen Ovalbumin; Katalognr. 55304 Lotnr. 40352, ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland) in einer 1:8 Verdünnung mit NaCl unter mikroskopischer Kontrolle in den rechten oberen Quadranten appliziert.

Die Reaktion wurde dann durch intravasale Injektion des Antigen Ovalbumin (20mg/kg/KG) in die Schwanzvene der Maus gestartet [100]. Anschließend wurde im betroffenen Areal mehrere „Regions of interest“ (ROI) mit dem Intravitalmikroskop untersucht.

## 2.6. Intravitalmikroskopie

### 2.6.1. Aufbau der intravitalmikroskopischen Messeinheit

In Abb. 9 ist ein Bild des Intravitalmikroskops (IVM) zu sehen. Um vibrationsfreies Arbeiten zu garantieren, wurde das IVM auf dem Grundsockel einer Fräsmaschine installiert. Ein Stahltisch trägt eine Untersuchungsplattform, die, bewegt durch zwei Motoren in X-Y-Ebene horizontal bewegt werden kann. Auf der Untersuchungsplattform wurde die Plexiglasbühne befestigt, auf der das Versuchstier fixiert wurde [90]. Das Mikroskop selbst läuft an zwei vertikalen Bewegungsführungssystemen, und erlaubt durch einen angeschlossenen Motor die vertikale Z-Achsen Bewegung. Auf der linken Seite des Arbeitsplatzes wurde ein S-VHS Videorekorder, ein Videomonitor und eine Kontrolleinheit für die Bewegungsmotoren angebracht. Auf der rechten Seite befand sich ein Personalcomputer und ein Monitor.

Die Ausgangsposition der Plexiglasplatte war zu Beginn jedes Versuchs stets identisch. Da der Nullpunkt als Bezugspunkt für alle Veränderungen bei allen Versuchen einheitlich war, gelang es über diese Fixierung die Untersuchungsplattform vom Mikroskopiertisch zu entfernen und die korrekte Ausgangsposition später wieder zu finden.. Schlussendlich bot diese Vorrichtung die Möglichkeit innerhalb des Ohres verschiedene Beobachtungsfelder exakt zu reproduzieren.

### 2.6.2. Lichtquelle zur Anregung der Fluoreszenz

Das Mikroskop Axiotech vario (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) war mit einem Projektionsokular mit 1,25fachem Vergrößerungsfaktor ausgestattet. Zur Analyse der intravitalem mikrozirkulatorischen Aufnahmebilder wurde ein 20 x/0,5 W Archoplan Immersionsobjektiv (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Durch diese optische Anordnung der Objektive wurde eine 533fache Gesamtvergrößerung erreicht. Auf einer CCDKamera FK 6990 IQ-S konnten unter Verwendung eines FSA-Tubus-GW die intravitalmikroskopischen Bilder aufgezeichnet werden.

Als Lichtquellen dienten eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100W (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) für die Aufnahmen mit Rhodamin 6G und eine stufenlos regulierbare Halogenlampe 12V, 100W (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) für die Aufnahmen mit FITC-Dextran. Die entsprechenden Bandpassfilter (FITC-Dextran, Anregungsbereich blau und Rhodamin 6G, Anregungsbereich grün) wurden mittels eines Fluoreszenzfilterschiebers für den jeweiligen Fluoreszenzmarker eingesetzt. Über einen Videozeitgenerator (VT 633; Fora Company Ltd., Tokyo, Japan) wurden Datum und Uhrzeit in das Bild eingeblendet und dem Videorekorder zugeführt. Mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde wurden die Videobilder auf S-VHS-Videobändern aufgezeichnet und während der Versuche zur Beobachtung und Kontrolle online auf einen Videobildschirm projiziert.

### 2.6.3. Positionierung der Versuchstiere unter der Messeinheit und Aufnahme der Gefäßabschnitte

Die narkotisierten Versuchstiere wurden auf der Plexiglasbühne auf dem X-Y-Tischs des Intravitalmikroskops fixiert (Abb.10). Das flach ausgespannte Ohr der Maus wurde mit Hilfe eines Tropfens 36°C warmen Wassers, das zwischen Ohr und Plexiglas eingebracht und mit einem kleinen Baumwollschwamm an der Seite wieder abgesaugt wurde, in bestmöglichen Kontakt zum Glas gebracht. Dies ermöglichte eine optimale Lichtpenetration und verbesserte das mikroskopische Bild. Zur Orientierung und zum Auffinden geeigneter postkapillärer Venolen wurde eine Schemazeichnung der Gefäßarchitektur unter Zuhilfenahme einer Übersichtsaufnahme in kleiner Vergrößerung angefertigt.

Die Umgebung des Areal, in dem die Antikörper appliziert worden waren, wurde einmal in FITC- und einmal in Rhodamin 6G adaptierten Licht betrachtet. Mittels eines Videogerätes wurden in gewissen Zeitabständen Aufnahmen gemacht und später offline ausgewertet.

### **2.6.4. Analyse der Mikrozirkulation**

#### **2.6.4.1. Auswerteeinheit**

Im offline Verfahren, also nach Beendigung der Versuche, wurden die Videobänder mittels eines computerunterstützten Mikrozirkulations-Analyse-Systems (Cap-Image®, Dr. Zeitl, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet [121].

#### **2.6.4.2. Mikrozirkulatorische Parameter**

Als mikrohäodynamische Parameter wurden die folgenden intravitalmikroskopischen Parameter quantitativ erfasst:

- 1. Gefäßdurchmesser**
- 2. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion**
- 3. Extravasation von Plasmamarker (Leakage)**

#### **2.6.4.3. Kontrast verbessernde Maßnahmen**

Bei Durchlichtaufnahmen wurde zur Kontrastverbesserung ein 443 nm Filter verwendet, der vornehmlich für Licht mit einer Wellenlänge im Absorptionsbereich von Hämoglobin durchlässig ist. Der Einsatz dieses Filters beschränkte sich auf die Auswahl geeigneter Gefäßabschnitte für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen. Ziel war es so wenig Licht wie möglich auf das mit Fluoreszenzmarkern behandelte Gewebe zu bringen, um phototoxische Reaktion gering zu halten [81, 153].

Für die Bearbeitung und Auswertung der intravitalmikroskopischen Parameter wurden zwei verschiedene Fluoreszenzmarker eingesetzt: Rhodamin 6G und FITC-Dextran (150.000 D). Rhodamin 6G dient der intravitalen Markierung von Leukozyten. Es wurde in einer Dosis von 0,15 mg/kg/KG intravenös verabreicht. Diese Dosierung schließt eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung durch Rhodamin 6G sicher aus [82].

FITC-Dextran (Fluoreszeinisothiocyanat gekoppelt an Dextran), ist ein hochmolekularer Plasmamarker. Wird dieser Plasmamarker mit einer Wellenlänge von 500 nm (Exzitationsmaximum 490 nm) angeregt, so emittiert er ein weiß-gelbliches Licht mit einer Wellenlänge von 525 nm. Dies bewirkt einen deutlichen Kontrastunterschied der durch Plasma angefärbten, hellen Gefäßen und des restlichen, dunkel erscheinenden Gewebes. FITC-Dextran dient somit der Bestimmung des Gefäßdurchmessers und der Extravasation von Plasmamarker (Leakage). Die Dosierung betrug intravenös 0.06 mg/kg/KG.

#### 2.6.4.4. Bestimmung des Gefäßdurchmessers

Zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers wurde die nicht-automatische Methode der Gefäßdurchmesserbestimmung des Cap-Image®-Systems benutzt [245].

#### 2.6.4.5. Bestimmung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (LEI)

Um die Leukozyten innerhalb eines Gefäßsegmentes zu zählen, wurde der betreffende Abschnitt 30 Sekunden lang online auf Videoband aufgenommen.

Bei der Auswertung wurden je nach LEI die Leukozyten in drei verschiedene Klassen eingeteilt (Abb. 11):

- **Nicht adhaerente Leukozyten**, also Zellen, die im zentralen Blutstrom ohne Kontakt mit dem mikrovaskulären Endothel an der Gefäßwand entlang fließen.
- **Rollende Leukozyten** sind im Randstrom fließende Zellen, die sich am mikrovaskulären Endothel mit deutlich geringerer Geschwindigkeit bewegen als der zentrale Blutstrom. Sie wurden qualifiziert als diejenigen Zellen, die pro Minute ein definiertes Gefäßsegment passierten. (Zelle/min).
- **Adhärenente Leukozyten** sind definiert als die Zellen, die sich während in dem zuvor gekennzeichneten 200µm langen Gefäßabschnitt nicht von Endothel lösten. Sie werden als Zellen pro mm<sup>2</sup> Endotheloberfläche angegeben (Zellen/mm<sup>2</sup>).

Die Anzahl der adhaerenten Leukozyten pro  $\text{mm}^2$  Endotheloberfläche (F) kann aus dem Gefäßdurchmesser (D), der Länge des untersuchten Gefäßabschnittes ( $100\mu\text{m}$ )(L), der Anzahl adhaerenter Leukozyten (N) und der Kreiskonstante  $\pi$  wie folgt berechnet werden:

$$F = (N \times 10^6) / (D \times \pi \times L)$$

1. F = Anzahl der adhaerenten Leukozyten pro  $\text{mm}^2$  Endotheloberfläche
2. D = Gefäßdurchmesser in  $\mu\text{m}$
3. L = Länge des Gefäßabschnittes ( $100\mu\text{m}$ )
4. N = Anzahl adhärenter Leukozyten
5.  $\pi$  = Kreiskonstante (3,1415)

### 2.6.4.6. Bestimmung der Extravasation (Leakage)

Schröder et al. beschrieben 1976, dass unter physiologischen Bedingungen das mikrovaskuläre Endothel für FITC-Dextran 150 000 D geringfügig permeabel ist [193]. Kommt es jedoch zu einer Störung der Endothelschrankenfunktion, führt dies zu einer Extravasation des Fluoreszenzmarkers in das perivaskuläre Gewebe. Dieser Austritt des hochmolekularen Plasmaparkers in das Interstitium führt zu einer Kontrastveränderung zwischen Gefäßen und Gewebe und wird als Parameter für die Permeabilitätsänderung densitometrisch gemessen und berechnet. Im offline Modus wurde mit Hilfe von Cap-Image® der entsprechende Fluoreszenzintensitätsquotient ( $I_a/I_i$ ) berechnet.  $I_a$  beschreibt die Fluoreszenzintensität außerhalb,  $I_i$  die Fluoreszenzintensität innerhalb des definierten Gefäßsegments (Abb.12). Der Gefäßdurchmesser wurde zur digitalen Dickemessung manuell eingezeichnet. Die Werte wurden als dimensionslose Zahlen angegeben.

## 2.7. Weitere Parameter

Um die späte Phase der Entzündungsreaktion zu beobachten, wurden Dickemessungen sowie histologische und immunhistologische Untersuchungen durchgeführt.

### 2.7.1. Atraumatische Ohrdickemessung

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Ohrdicken als Maß für die Ödembildung mittels eines „Spring Loaded Calipers“ (Abb.13) atraumatisch am äußeren unbehaarten Drittel des Ohrs, der sogenannten Pinna, ermittelt.

### 2.7.2. Histologische Untersuchungen

Zu festgelegten Zeitpunkten wurden mit Hilfe einer Rundstanze (0,7 mm Durchmesser, Baumarkt, Deutschland) Hautproben aus den proximalen Anteilen beider Mäuseohren (Reaktionsohr und Kontrollohr) entnommen. Dann wurden die Hautproben zur weiteren Verarbeitung nach mehrmaligem Waschen mit Phosphate Buffered Saline (PBS) in 4%igem Formalin eingelegt. Die Hautproben wurden daraufhin in zwei Abfolgen zu je 3x4 µm dicken Hautscheiben, jeweils im Abstand von 100 µm geschnitten (Abb.14).

#### 2.7.2.1. Histologische Färbungen

Die histologische Aufarbeitung der Gewebeproben erfolgte mittels Hämatoxylin/Eosin-, Giemsa- und immunhistologischer Färbung (CD 45-, Ly-6G-Antikörper).

##### 2.7.2.1.1. Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Die Objekte wurden in saurem Hämatoxylin nach Ehrlich gefärbt. Dies erfolgte in fließendem Leitungswasser oder in 0,25% Natriumhydrogencarbonatlösung, gefolgt von einer Spülung mit Aqua dest. Anschließend wurde das Präparat in Eosinlösung (Eosin in Aqua dest 1:10) für 5-10 min eingelegt und wieder mit Aqua dest. abgespült.

##### 2.7.2.1.2. CD 45 und Ly-6G Färbungen

Nach Herstellung der Antikörperverdünnungen (CD 45 1:40 und 1:80; Ly-6G 1:25 und 1:50) wurden diese auf die Schnitte aufgetragen und für 90 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Im zweiten Schritt wurde der „Anti-Rat Link“ aufgetragen und für 20 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Im dritten Schritt wurde das „Label“ (Alkaline Phosphatase, konjugiertes Streptavidin) aufgetragen und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jedem der drei ersten Arbeitsschritte wurden die Präparate für jeweils 10 min in PBS unter einmaligem Wechsel des Puffers gewaschen.

In einem letzten Schritt wurde das Substrat aufgetropft und für 15 min in einer feuchten Kammer inkubiert.

### **2.7.2.2. Digitale Messung der Ohrdicke am histologischen Präparat**

Die digitale Auswertung der Ohrdicke und des leukozytären Entzündungsinfiltrats erfolgte im Institut für Allergie und Umwelt (München, Deutschland) mit Hilfe einer selbst entwickelten elektronischen Auswertematrix im Auswertesystem KS300. Hierzu wurden die histologischen Präparate mittels eines Mikroskops vergrößert und die Bilder in digitalisierter Form einem angeschlossenen Computer zugeleitet. Das Messareal wurde mittels zweier parallel eingezeichneter Balken, am äußersten Rand des eingescannten histologischen Präparats, definiert (Abb. 15). Anschließend wurde mit Hilfe einer speziellen Messfunktion des Auswerteprogramms die Länge des Messareals durch Vermessung der Länge des Knorpels ermittelt. Eine andere Funktion berechnete die Fläche, des Messareals nach computergestützter Markierung des Areal. Die mittlere Dicke des Areal als Maß für die stattgefundene Ödembildung ergibt sich dann durch den Quotienten zwischen Fläche und Länge.

### **2.7.2.3. Digitale Quantifizierung des leukozytären Infiltrats**

Das digitalisierte Bild der CD45 Färbung wurde mit einem speziellen Farbfilter des Analysesystems auf das Emissionsspektrum des Antikörpers analysiert. Es ergab sich ein Bild mit Fluoreszenzpunkten an Orten mit hoher Antikörperdichte, entsprechend der gefärbten eingewanderten Leukozyten. Die Fläche aller ermittelten Fluoreszenzpunkte ließ sich computergestützt ermitteln und bildete, geteilt durch die Fläche des Beobachtungsfelds, den Fluoreszenz-Index als vergleichbares Maß für die allgemeine Infiltration von Leukozyten in das Gewebe (Abb. 16, Abb.17).

### **2.7.2.4. Direkte Quantifizierung des Neutrophileninfiltrats**

Die direkte Quantifizierung des Infiltrats an polymorphen neutrophilen Granulozyten (PMN) erfolgte durch direkte Auszählung der mit dem für Mäuse-PMN spezifischen Antikörpermarker Ly6-G gefärbten Zellen innerhalb eines vordefinierten Areal (Abb.17). Das Beobachtungsareal wurde definierte als das gesamte, sichtbare Objektivfeld bei 20-facher Vergrößerung, dass sich links und rechts der Mitte des Ohrschnitts anschloss. Zu diesem Zweck wurde die Mitte anhand einer Schemazeichnung festgehalten. Bei Artefakten (Überlagerungen, Einrisse im Präparat usw.) wurde das Beobachtungsfeld jeweils weiter nach rechts beziehungsweise nach links verschoben.



### **2.8. Versuchsgruppen**

#### **2.8.1. Intravitalmikroskopische Analyse der nativen Mikrozirkulation an Ohr der behaarten Maus (C57/B6/SV129) und der haarlosen (SKH- 1 hr/hr) Maus**

Die Mikrozirkulation von 4 haarlosen (SKH-1 hr/hr) und 6 behaarten (C57/B6/SV 129) Mäusen wurde ermittelt, um Qualität und die Reproduzierbarkeit unseres Modells garantieren zu können. Die Analyse der mikrozirkulatorischen Parameter (Leakage und LEI) wurden nach intravenöser Gabe der Fluoreszenzfarbstoffe durchgeführt.

#### **2.8.2. Irritative Kontaktdermatitis (ICD) am Ohr der Maus**

##### **2.8.2.1. Analyse der mikrozirkulatorischen Parameter bei der ICD durch Croton Öl**

Die irritative Dermatitis mit Croton Öl 1% (in Aceton:Olivenöl 1:4) wurde an 3 Wildtypen und PRTN3/ELA2-Doppel-Knockout nach Aufnahme der Basisparameter der Mikrozirkulation, wie oben beschrieben, ausgelöst. 3 Wildtypen und 4 PRTN3/ELA2-Doppel-Knockout dienten als Kontrollgruppe und wurden nur mit dem Trägergemisch (Aceton:Olivenöl 1:4) behandelt. Anschließend wurden Leakage und LEI in vordefinierten Arealen 2,5 und 5 h nach Induktion der Reaktion ermittelt.

##### **2.8.2.2. Analyse der Ohrdicke und des leukozytären bzw. des neutrophilen Infiltrats mittels Histologie und Immunhistologie**

Für diesen Versuch wurde die irritative Dermatitis mit 1%-igem Croton Öl (in Aceton:Olivenöl 1:4) am linken Ohr von 5 Wildtypen und 5 PRTN3/ELA2-Doppel-knockout wie oben beschrieben ausgelöst. Die rechten Ohren dienten als Kontrollohren und wurden nur mit dem Trägergemisch (Aceton:Olivenöl 1:4) behandelt.

Knockout und Wildtyp wurden verblindet in zwei Gruppen, eine Gruppe mit 8 h und eine mit 24 h Reaktionszeit, eingeteilt. Zu den Zeitpunkten 0, 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 h wurde die Dicke beider Ohren mechanisch mittels „Spring-loaded Caliper“ gemessen. Nach der definierten Reaktionszeit wurden sowohl Reaktions- als auch Kontrollohr entnommen und für Histologie und Immunhistologie wie in 2.6.2. beschrieben präpariert.

### **2.8.3. Untersuchungen zur Arthus Reaktion**

#### **2.8.3.1. Untersuchungen des Einfluss der Applikation von Volumen ins Mäuseohr auf die Mikrozirkulation**

Jeweils 3 Wildtyp Mäuse (C57/B6/129SV) wurde sofort, 4 h und 6 h nach Applikation von 5  $\mu\text{g}$  H<sub>2</sub>O ins Ohr intravitalmikroskopisch untersucht und die plasmazelluläre Leakage mittels FITC-Dextran analysiert, um einen möglichen Effekt der Applikation auf die Mikrozirkulation ausschließen zu können.

#### **2.8.3.2. Evaluierung der reversen passiven Arthus Reaktion**

5  $\mu\text{l}$  Antikörper gegen Ovalbumin (Rabbit IgG gegen Ovalbumin, Katalognr. 55304 Lotnr. 40352, ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland) wurde wie beschrieben anstatt NaCl in Ohr injiziert. Nach 6 Stunden wurde die Arthus Reaktion wie beschrieben gestartet. Hiernach wurde die Mikrozirkulation bei Wildtyp Mäusen im Entzündungsgebiet aufgezeichnet.

#### **2.8.3.3. Evaluierung der Induktion der Reversen Passiven Arthus Reaktion (RPAR) durch kontinuierliches Online-Monitoring**

5  $\mu\text{l}$  Antikörper gegen Ovalbumin (Rabbit IgG gegen Ovalbumin, Katalognr. 55304 Lotnr. 40352, ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland) wurde wie beschrieben anstatt NaCl in Ohr injiziert. Das Anlegen eines Jugularvenenkatheters ermöglichte vor intravitalmikroskopischer Beobachtung die RPAR eine Aufzeichnung der Baseline-Konditionen. Die Mikrozirkulation im Verlauf der Arthus Reaktion wurde dann nach Gabe des Antigens (Ovalbumin, A2512 Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) online direkt nach dem Start ( $t=0$  -  $t=1\text{h}$ ) und zu einem späteren Zeitpunkt ( $t=1\text{h}$  -  $t=2\text{h}$ ) erhoben.

### 2.8 Statistik

Die Bestimmung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels der Testverfahren „ANOVA on RANKS“ gefolgt vom Standard-Newman-Keuls-Test. Zum Vergleich mehrerer Zeitpunkte innerhalb einer Gruppen wurde der RM-ANOVA-Tests und im Anschluss der Standard-Newman-Keuls-Test als post hoc Test verwendet. Die Angaben sämtlicher Werte erfolgten, soweit nicht anders angegeben, als Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ). Das Signifikanzniveau wurde bei  $p > 0.05$  angesetzt.

### 3. Ergebnisse

Studien implizieren eine Beteiligung der neutrophilen Serinproteasen PRTN3 und ELA2 beim Einwandern von Neutrophilen Granulozyten aufgrund vielfältiger inflammatorischer Reize [44, 56, 241, 247]. Andere Untersuchungen, insbesondere mit defizienten Mäusestämmen konnten keine Unterschiede im Emigrationsverhalten von Neutrophilen Granulozyten feststellen [6, 28].

Ein neu charakterisierter, defizienter Mäusestamm für die neutrophile Elastase und Proteinase 3 sollte zur Aufklärung dieser Widersprüche beitragen. Mit Hilfe dieser doppelten Defizienz können Überlappungseffekte der beiden Serinproteasen verhindert werden.

Dieser Knockout-Stamm entwickelte im Modell der immunkomplex-vermittelten reversen passiven Arthus Reaktion (RPAR) in eigenen Vorversuchen bereits nach 1 h ein geringeres Ödem und nach 6 h eine reduzierte Hämorrhagie im Vergleich zum genetischen Hintergrund. Schon bei Elastase-defizienten Tieren beobachtete Liu und Mitarbeiter in einem Hautmodell des bullösen Pemphigoids [141] einen neutrophilen Emigrationsdefekt.

Um erstmals eine Beteiligung der neutrophilen Serinproteasen PR3 und ELA2 an der Emigration von neutrophilen Granulozyten an der Haut in vivo beobachten zu können, wurde ein bestehendes Modell zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Mikrozirkulation gewählt und nach unserer Fragestellung hin angepasst.

### 3.1. Etablierung des Tiermodells

Das Modell der haarlosen Maus als Versuchstier für in-vivo Studien der Hautmikrozirkulation wurde von Eriksson und Mitarbeitern [69] erstmals eingeführt. Es wurde von Barker und Mitarbeitern am Ohr der haarlosen (SKH-1) Maus modifiziert [21] und stellt ein an unserem Institut etabliertes Modell dar. Dieses Tiermodell erlaubt chronisch-mikrozirkulatorische Untersuchungen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Die notwendigen mikrochirurgischen Eingriffe sind wenig invasiv und führen zu keiner wesentlichen Traumatisierung des zu untersuchenden Hautareals.

#### 3.1.1. Normale Mikrozirkulation des genetischen Hintergrunds C57/B6/SV129 (+/+)

Zur Etablierung unseres Modells wurde erstmals die Mikrozirkulation des etablierten Modells der haarlosen Maus dokumentiert und mit Literaturangaben verglichen. Hierfür wurden 6 Tiere (haarlose SHK-1 Mäuse) zur Intravitalmikroskopie vorbereitet und, wie in Abschnitt 2.6 beschrieben, analysiert.

In einem nächsten Schritt wurde die Mikrozirkulation des depillierten, behaarten Mäusestamms (n=5), der den genetischen Hintergrund unserer Knock-out Mäuse darstellte, mit den vorliegenden Daten verglichen.

Nolte et al. beobachtete die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in 6 haarlosen Mäusen in je 4-6 Blutgefäßsegmenten [158]. Für die Berechnung der adhärenenten Leukozyten pro Endotheloberfläche nutzte er mit 200 µm ein doppelt so großes Gefäßsegment wie in unseren Experimenten. Dementsprechend wurden seine Daten umgerechnet\* (Tab.1). Vergleichswerte zur Extravasation vom Plasmamarker (Leakage) wurde jüngst im Rahmen von Untersuchungen zur Beeinflussung des C-Peptids bei diabetischen, haarlosen Mäusen publiziert [130].

## Ergebnisse

---

Die modifizierten Ergebnisse von Nolte et al. und Langer et al. sind in Tabelle 1 unseren Ergebnissen gegenübergestellt:

Mikrozirkulatorische Parameter +/- SEM	C57/B6/Sv129 Mäuse (n=6)	Haarlose (SKH-1 hr) Mäuse (n=5)	Haarlose (SKH-1 hr) Mäuse [130, 158]
Leakage (Ie/Ii)	0,27+/-0,04	0,27+/-0,07	0,27+/-0,02 [130]
Rolling (n/s)	0,42+/-0,10	0,38+/- 0,02	0,4+/-0,2 (SD) [158]*
Sticking (n/100µm/min)	17,6+/-5,67	14,6+/-0,415	12+/- 6 (SD) [158]*

Tabelle 1: Mikrozirkulatorische Parameter von 6 depilierten (C57/B6/SV129) Mäusen und 5 haarlosen (SKH-1 hr) werden mit den Resultaten von Nolte et al. (6 haarlose Mäuse und jeweils 4-6 Gefäßsegmente) verglichen.

Die Mikrozirkulation der Hautgefäße der haarlosen SKH-1 hr Mäuse zeigte im direkten Vergleich der Untersuchungen von Nolte sowie Langer und Mitarbeitern erhobenen Basiswerten keinen signifikanten Unterschied:

Unsere Beobachtungen der LEI postkapillärer Venolen von SKH-1 (hr/hr) Mäuse ergaben eine Fraktion rollender Leukozyten von 0,38+/-0,02 n/s und eine Fraktion fest adhärenter Leukozyten von 14,6+/-0,415 n/100µm/min. In den Experimenten von Nolte und Mitarbeitern zeigten sich mit einer Fraktion rollender Leukozyten mit 0,4+/-0,2 (SD) und fest adhärenter Leukozyten mit 12+/-6 (SD) n/100µm/min vergleichbare Werte [158].

Auch die basale Extravasation von Plasmamarker (Leakage) unserer haarlosen Mäuse zeigte keinen Unterschied zu Literaturangaben (0,27+/-0,07 versus 0,27+/-0,02) (Tab.1) [130].

Damit konnte eine vergleichbare Durchführung und Etablierung des Modells sichergestellt werden.

Obwohl das Modell der haarlosen Maus zur Untersuchung der Hautmikrozirkulation das etabliertere Modell darstellt, ist in unserer Studie die Erhebung der Mikrozirkulation eines behaarten Mäusestamms notwendig, da dieser den genetischen Hintergrund für die Vergleichsstudien mit den PRTN3/ELA2-Knockout Mäusen darstellt.

## Ergebnisse

---

Bei der gezeigten Übersichtsaufnahme der flach ausgelagerten Ohren einer haarlosen und einer depilierten C57/B6/SV Maus fällt nur eine dezent dunklere Hautfarbe und eine etwas verwaschenerere Gefäßzeichnung auf. Die darunter abgebildeten Aufnahmen der Mikrozirkulation beider Mäusestämme zeigen jeweils ein gut dargestelltes Gefäßbündel mit einer Arteriole und einer Venole mit abführenden Gefäßen vergleichbarer Qualität.

So konnten auch erwartungsgemäß unsere vergleichenden intravitalmikroskopischen Messungen zwischen dem haarlosen Mäusestamm (SHK-1 hr/hr) (n=5) und dem depiliertem Hintergrundstamm (C57/B6/SV129) (n=6) keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Integrität der Gefäßbarriere und auf der Ebene der LEI aufzeigt werden (Tab.1).

Im direkten Vergleich fällt die prominentere Darstellung peripherer, perfundierter, Kapillarschlingen in der Aufnahme der haarlosen Maus auf. Dieser Mäusestamm wird daher häufig für Studien zur Messung der funktionellen Kapillardichte als Maß für die Gewebeporosität verwendet [130, 158]. Für unsere Untersuchungen ist dies allerdings nicht notwendig.

Zur Beobachtung der ICD durch Croton Öl am Ohr der Maus wurde ein Modell eingesetzt, das bereits an der Universität Frankfurt zur Intravitalmikroskopie des Mäuseohrs eingesetzt wird. Dieses Modell zur intravitalmikroskopischen Beobachtung der ventralen Gefäßarchitektur und Mikrozirkulation [144] wurde allerdings leicht modifiziert (Abb.17).

### 3.1.2. Unterschiedliche mikrozirkulatorische Parameter zwischen ventralem und dorsalem Ohr

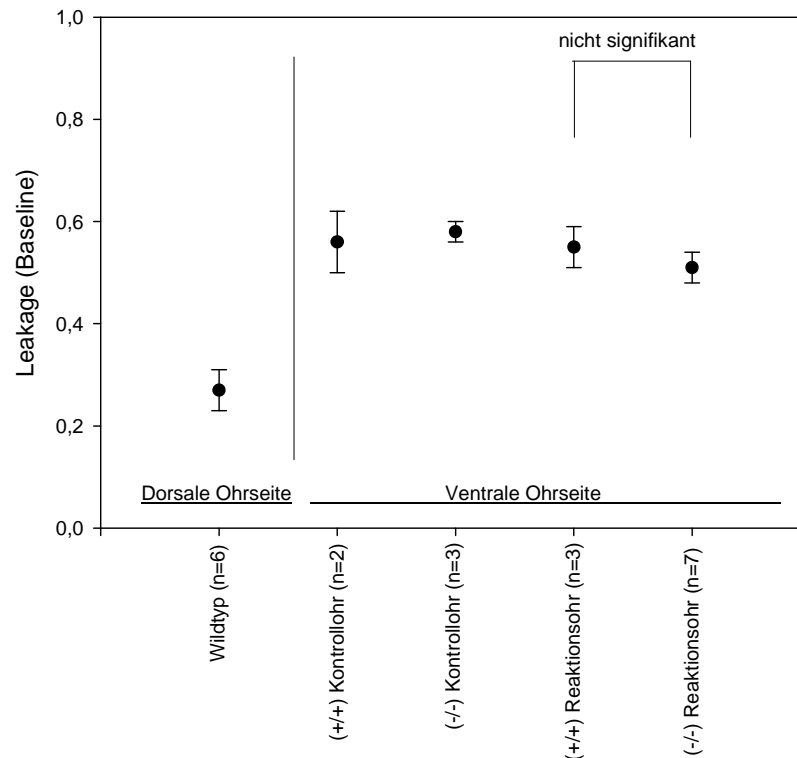


Diagramm 1: Extravasation des Plasmamarkers FITC-Dextran zwischen der dorsalen Ohrseite des Wildtypstamms und der ventralen Ohrseite vor Applikation von Croton Öl.

1. In der dorsalen Mikrozirkulation wird eine deutlich niedrigere Leakage festgestellt (0,27 versus 0,55 Mittelwert ventral).
2. Die Basiswerte der Leakage der verschiedenen Gruppen vor der ICD mit Croton Öl zeigen keine Unterschiede im Vergleich zwischen PRTN3/ELA2 (-/-)- und (+/+)-Gruppe.

Wie aus den Diagrammen 1-3 ersichtlich wird, können zwischen der Extravasation von Plasmamarker (FITC-Dextran) (Abb. 12) und der Anzahl rollender Leukozyten (Abb.11) Unterschiede erhoben werden. So zeigt sich an der ventralen Ohrseite eine etwa doppelt so hohe Baselineleakage wie an der dorsalen Seite (Mittelwert 0,55 versus 0,27). Grund hierfür ist sicherlich die deutlich geringere Pigmentierung der ventralen Ohrseite, was zu höheren natürlichen extravaskulären Fluoreszenzindizes (FI) führt. Da sich die Leakage als Quotient zwischen extravasalem und intravasalem FI berechnet, ergeben sich für die ventrale Ohrseite höhere Fluoreszenzindizes.



## Ergebnisse

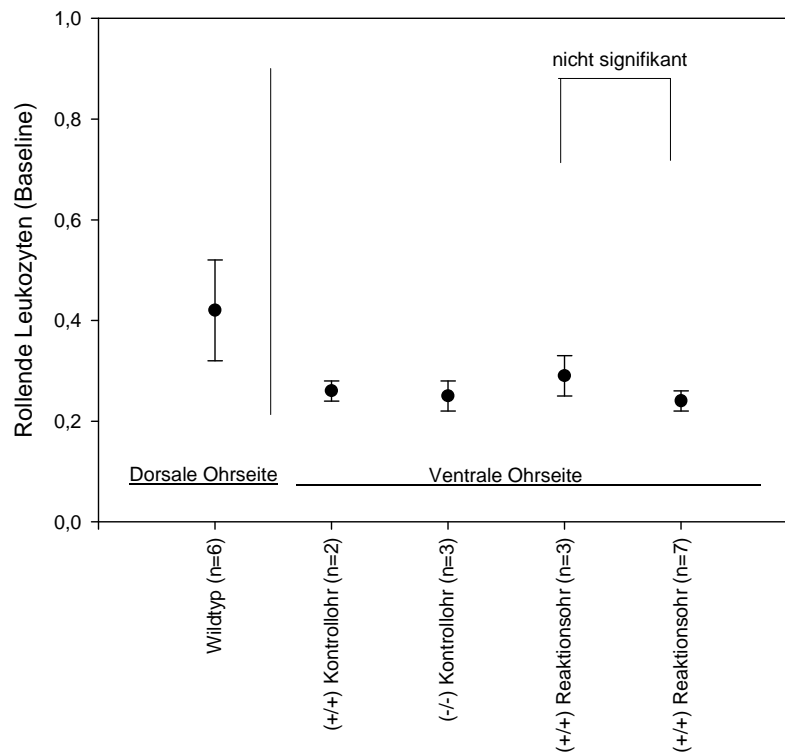


Diagramm 2: Anzahl rollender Leukozyten am Gefäßendothel an der dorsalen Ohrseite (Wildtyp) und an der ventralen Ohrseite der Gruppen vor Applikation von Croton Öl (Baseline)

1. Die Anzahl rollender Leukozyten ist auf der dorsalen Ohrseite erhöht. Dieser Effekt wird den größeren Gefäßdurchmessern auf dorsaler Seite zugeschrieben.
2. Die Baseline-Anzahl rollender Leukozyten der verschiedenen Gruppen vor der ICD mit Croton Öl zeigen keine Unterschiede im Vergleich zwischen PRTN3/ELA2 (-/-) und (+/+)-Gruppe.

Die höhere Anzahl rollender Leukozyten an der dorsalen Ohrseite (Diagramm 2) ist am ehesten als ein Begleiteffekt der durchschnittlich höheren Gefäßdurchmesser im Gegensatz zur ventralen Seite aufzufassen. Der proportionale Zusammenhang zwischen Gefäßdurchmesser und Anzahl von rollenden Leukozyten pro 100  $\mu\text{m}$  ist in der Mikrozirkulationsforschung bekannt [108]. Der deutlich höhere Schwankungsgrad kann dabei ebenfalls auf größere Schwankungen der Gefäßdurchmesser der dorsalen Ohrseite zurückzuführen sein.

Dagegen zeigten sich keine Unterschiede in der Anzahl adhärenter neutrophiler Granulozyten zwischen der dorsalen und ventralen Ohrseite.

## Ergebnisse

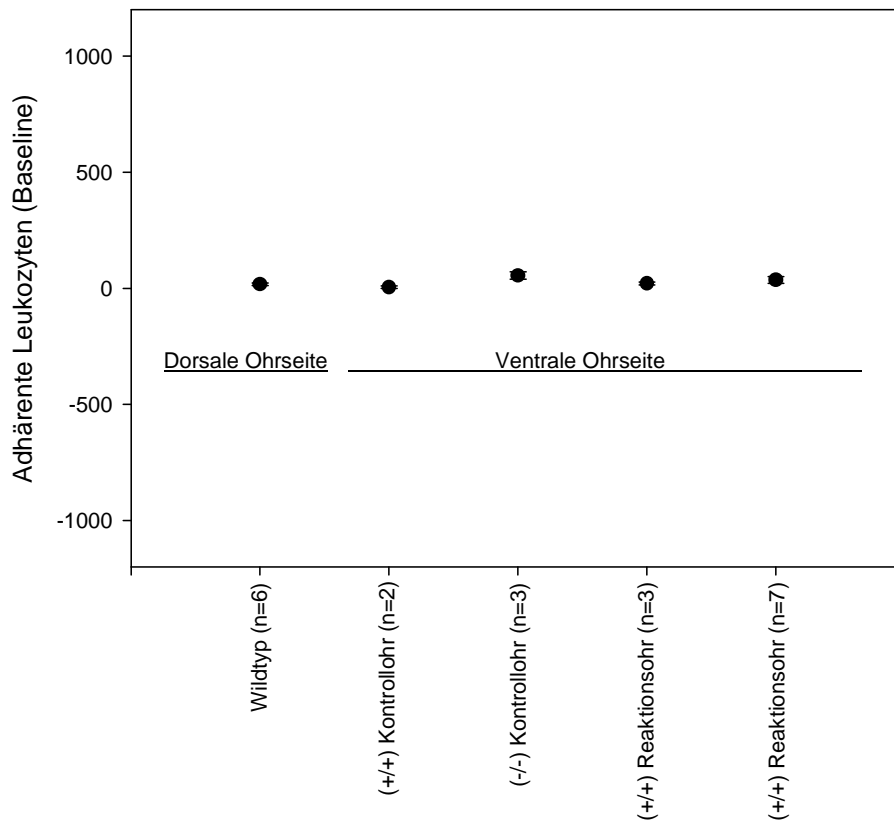


Diagramm 3: Anzahl der adhärenen Leukozyten zwischen der dorsalen Ohrseite des Wildtypstamms und der ventralen Ohrseite vor Applikation von Croton Öl.

1. Es zeigen sich keine Unterschiede in der basalen Anzahl adhärenter Leukozyten zwischen dorsaler und ventraler Mikrozirkulation.
2. und im Vergleich zwischen PRTN3/ELA2 (-/-) und (+/+)-Gruppe.

### 3.2. Irritative Kontaktdermatitis (ICD) durch Croton Öl

Die akute irritative Kontaktdermatitis (ICD) mit Croton Öl stellt in der pharmakologischen Entzündungsforschung ein weit verbreitetes Modell dar [78]. Es besteht durch einfache Handhabung und Reproduzierbarkeit und ist durch eine starke neutrophilen Infiltration und Ödembildung charakterisiert.

## Ergebnisse

---

In den folgenden Diagrammen sind die mikrozirkulatorischen Parameter Leakage, Rolling und Sticking von insgesamt 4 Gruppen zu drei verschiedenen Zeitpunkten aufgeführt (Baseline, 2,5 und 5h nach Applikation von Croton Öl). Die ersten zwei Gruppen dienen als Kontrollgruppen. Wildtypen (Gruppe 1) und Knockout-Mäuse (Gruppe 2) wurden zur Kontrolle ausschließlich mit dem Trägergemisch (Aceton: Olivenöl 4:1) behandelt. Die Reaktionsgruppen unterteilen sich in eine Wildtypgruppe (Gruppe 3) und eine Knock-out-Gruppe (Gruppe 4). Beide Gruppen wurden mit 10µl einer 1%-igen Croton Öl in Aceton:Olivenöl 4:1 konfrontiert (Tab. 2, Abb. 18).

	<b>Reaktionsgruppen (Croton Öl+Trägergemisch)</b>	<b>Kontrollgruppen (Trägergemisch)</b>
<b>Wildtyp (PRTN3/ELA2) +/+</b>	Gruppe 1	Gruppe 2
<b>Knock-out( PRTN3/ELA2) -/-</b>	Gruppe 3	Gruppe 4

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der intravitalmikroskopischen Beobachtung der Croton-Öl induzierten akuten Kontaktdermatitis

### **3.2.1. Vergleichbare mikrozirkulatorische Parameter bei PRTN3/ELA2-defizienten Mäusen und deren Hintergrund**

Mäuse vom Wildtyp sind von PRTN3/ELA2-defizienten Mäusen hinsichtlich Entwicklung, Verhalten, Fertilität und Infektanfälligkeit nicht zu unterscheiden [76]. Ebenso zeigten Untersuchungen der neutrophilen Granulozyten in peripherem Blut von PRTN3/ELA2-defizienten Mäusen und vom Wildtyp in Vorversuchen keine Unterschiede. Dies zeigte sich neben der relativen und absoluten Zellzahl der Leukozyten auch in der Reife der Zellen (fluoreszenzzytometrische Identifikation). Darüber hinaus ließen sich keine morphologischen Anomalien PRTN3/ELA2-defizienter Granulozyten im Lichtmikroskop erkennen [174].

Im Rahmen unserer Studie ist neben der Anzahl, Reife und Morphologie die Vergleichbarkeit der mikrozirkulatorischen Parameter zwischen PRTN3/ELA2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp von entscheidender Wichtigkeit.

Rückschlüsse über mögliche Unterschiede zwischen mikrozirkulatorischen Parametern bei PRTN3/ELA2-defizienten Mäusen und deren Hintergrund werden aus den Diagrammen 1-3 ersichtlich: Alle mikrozirkulatorischen Parameter (Leakage, Rollende und adhärente Leukozyten) zeigen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der intravitalmikroskopischen Baselinewerte von Knockout und Kontrolle.

Zusammenfassend zeigen PRTN3/ELA2-defiziente Mäuse eine normale Mikrozirkulation.

#### **3.2.1.1 Kein Unterschied in der Ausprägung der Leakage während der ICD zwischen PRTN3/ELA2 (-/-) und (+/+) Hintergrund**

Intravitalmikroskopisch ließ sich im Verlauf der Croton Öl induzierten ICD eine stetige und gegenüber der Kontrollgruppe signifikante Steigerung der plasmazellulären Leakage nachweisen. Signifikante Unterschiede zwischen den PRTN3/ELA2-defizienten Gruppe und der Kontrollgruppe zeigten sich nicht. Da die Dynamik, sowohl der Reaktions- als auch der Kontrollgruppen einen nahezu parallelen Verlauf aufzeigt war eine unterschiedliche Entwicklung der Leakage an diesem Modell nicht nachzuweisen.

## Ergebnisse

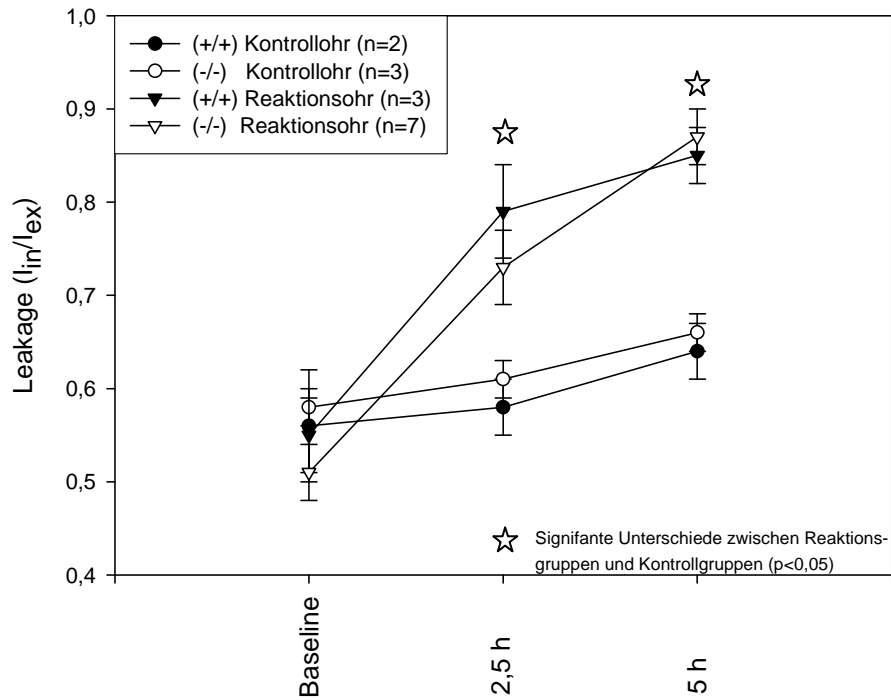


Diagramm 4: Extravasation des Plasmamarkers (FITC-Dextran) bei vier verschiedenen Gruppen vor (Baseline), 2,5 h und 5 h nach der ICD mit Croton Öl.

1. Die beiden Kontrollgruppen zeigen einen nicht-signifikanten Unterschied in den Leakagewerten zueinander zu allen drei Zeitpunkten.
2. Beide Reaktionsgruppen reagieren mit einer signifikanten Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit gegenüber dem eigenen Ausgangswert und gegenüber den Kontrollgruppen als Ausdruck der Entzündungsreaktion durch Croton Öl. Zwischen den Reaktionsgruppen zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Der auch hier zu beobachtende parallele Verlauf der beiden Kurven spricht, wie für die Kontrollgruppen, für eine noch vergleichbarere Änderung gegenüber den jeweiligen Ursprungswerten.

Auch in der Kontrollgruppe ließ sich ein dezenter Anstieg der Leakage beobachten. Dabei wurde die Kontrollgruppe mit dem Trägergemisch Aceton in Olivenöl topisch behandelt. Aceton ist in diesem Zusammenhang für eine leichte, vorübergehende Erhöhung der Plasmaleakage bekannt.

### 3.2.1.2. Kein Unterschied in der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion während der ICD zwischen PRTN3/ELA2 (-/-) und (+/+)

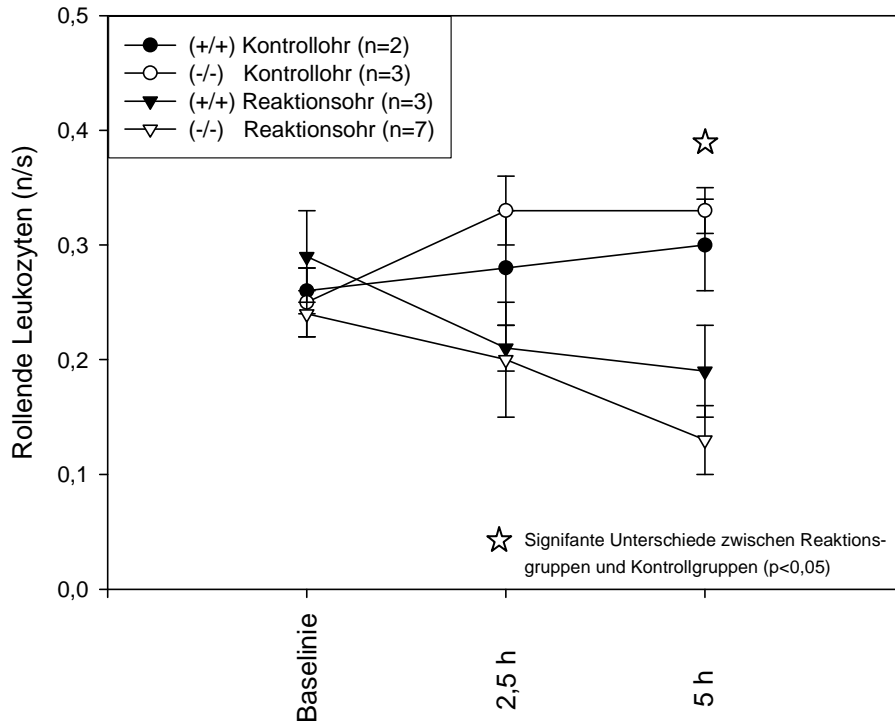


Diagramm 5: Anzahl rollender Rodamin 6G fluoreszenzmarkierter Leukozyten am Gefäßendothel bei vier verschiedenen Gruppen vor (Baseline), 2,5 h und 5 h nach der ICD mit Croton Öl.

1. Die beiden Kontrollgruppen zeigen keinen signifikanten Unterschied in den Leakagewerten zueinander zu allen drei Zeitpunkten. Mittelung der beiden Kurvenverläufe lässt auf eine dezente Zunahme der am Endothel rollenden Leukozyten schließen.
2. Ebenfalls ohne signifikanten Unterschied zueinander zeichnen sich die beiden Reaktionsgruppen durch eine deutliche Reduzierung rollender Leukozyten aus. Im Vergleich zum Ausgangswert war diese Abnahme zum Zeitpunkt 5 h für beide Reaktionsgruppen signifikant.

Infolge der ICD werden intravitalmikroskopisch eine Abnahme von rollenden Leukozyten beobachtet. Dieser Effekt war nach 2,5 h erstmals zu sehen und verstärkte sich zum Beobachtungszeitpunkt 5 h. Hier war der Unterschied statistisch signifikant. Im Gegensatz dazu nimmt die Anzahl fest adhärenter Leukozyten indirekt proportional zu. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe war zum Zeitpunkt 5 h zu beobachten.

Dahingegen zeigten sich keinerlei statistisch signifikante Unterschiede bei der Anzahl rollender und fest adhärenter Leukozyten zwischen PRTN3/ELA2-defizienten Mäusen und

## Ergebnisse

deren Hintergrund. Aus dem Verlauf der fest adhärenen Leukozyten kann man eine protrahierten Dynamik der defizienten Mause zum Zeitpunkt 2,5 h deuten. Dieser Effekt scheint aber nach 5 h wieder ausgeglichen und ist aufgrund der Schwankungsbreite der Messergebnisse schwer zu interpretieren.

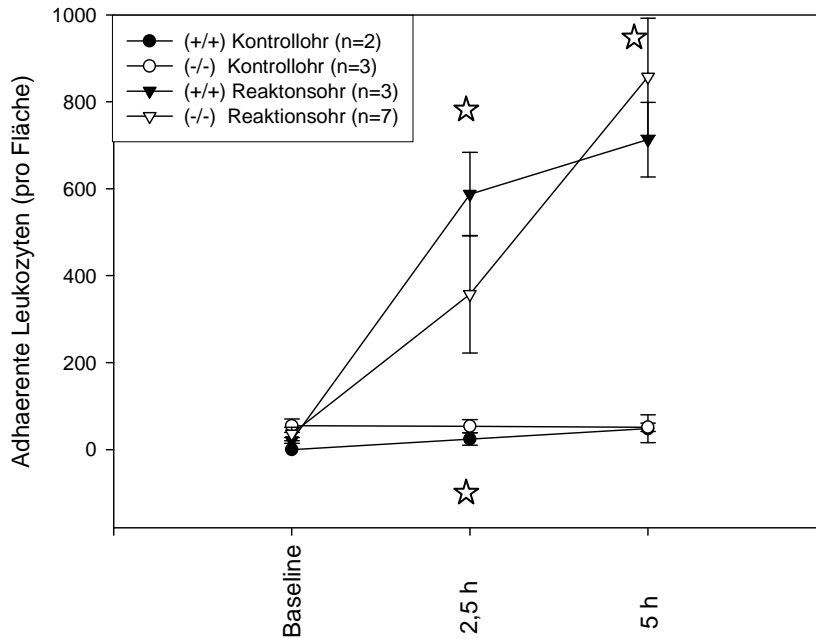


Diagramm 6: Anzahl adhärenter Rodamin 6G-markierter Leukozyten am Gefäßendothel von vier verschiedenen Gruppen vor (Baseline), 2,5 h und 5 h nach der ICD mit Croton Öl.

1. Die beiden Kontrollgruppen zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl beobachteter adhärenter Leukozyten zueinander zu allen drei Zeitpunkten und keine Veränderungen über die Zeit.
2. 2,5 h nach der Induktion der ICD wurde ein sprunghafter signifikanter Anstieg von adhärenen Leukozyten beobachtet. Diese Beobachtung war 5 h nach der Induktion der ICD (Croton) sogar noch stärker ausgeprägt. Obwohl es statistisch keine Signifikanzen zwischen der PRTN3/ELA2-defizienten-Gruppe und der Wildtyp Gruppe zu ermittel gab, so scheint der Verlauf der Reaktion in der defizienten Gruppe bis zum Zeitpunkt 2,5 h im Gegensatz zur (+/+)-Gruppe protrahiert und nachfolgend (zwischen 2,5 und 5 h) verstärkt abzulaufen.

### 3.2.2. Manuelle und histologische Untersuchungen zur PRTN3/ELA2-defizienten Knock-out Maus im Vergleich zum Wildtyp während der ICD mit Croton Öl

In den folgenden Diagrammen werden die Daten von weibliche PRTN3/ELA2 (-/-)- Mäuse (n=5) und deren Hintergrund (n=5) 8, beziehungsweise 24 Stunden nach Induktion der Croton Öl induzierten, irritativen Kontaktdermatitis aufgeführt. In allen Gruppen wurden vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion der ICD manuelle Dickemessungen mithilfe des „Spring loaded Calipers“ durchgeführt. Nach Gewinnung der histologischen Gewebeproben wurden histologische Dickemessungen und eine immunhistochemischen Analyse des Infiltrates vorgenommen.

	<b>Reaktionsgruppen (Croton Öl+Trärgemisch)</b>	<b>Kontrollgruppen (Trärgemisch)</b>
<b>Wildtyp (PRTN3/ELA2 +/+)</b>	Gruppe 1	Gruppe 2
<b>Knock-out (PRTN3/ELA2 -/-)</b>	Gruppe 3	Gruppe 4

Tabelle 3: Gruppeneinteilung der ICD für die manuelle Ohrdickemessung und histologischer Aufarbeitung



### 3.2.2.1 Ergebnisse der kontinuierlichen Messung der Ohrdicke während der ICD

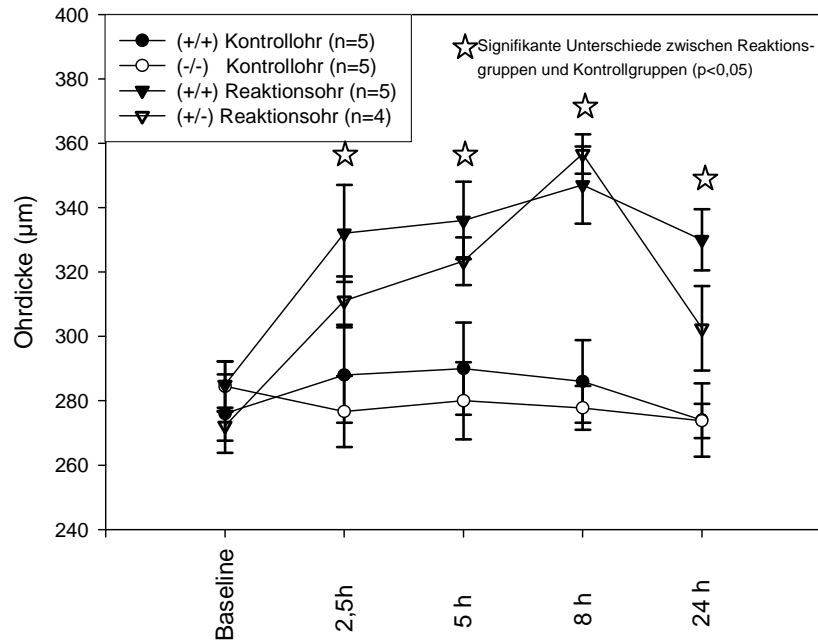


Diagramm 7: Ohrdicke (Spring loaded caliper) in  $\mu\text{m}$  von 4 verschiedenen Gruppen zu 5 Zeitpunkten (Baseline, 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 Stunden)

1. Die Kontrollgruppen zeigen keine Änderung der Ohrdicken im Verlauf.
2. Die Reaktionsgruppen zeigen einen parallelen, gegenüber dem Ausgangswert und zur Kontrollgruppe signifikanten, Anstieg der Ohrdicke als allgemeines Maß für die Ödembildung und Infiltration. Im Vergleich PRTN3/ELA2 (-/-)-Gruppe mit (+/+)-Gruppe konnten keine signifikanten Unterschiede erhoben werden.

Unsere Kontrolltiere zeigen nach dem Auftragen des Trägergemisches aus Aceton und Olivenöl keine Änderungen in der gemessenen Ohrdicke als Maß für die allgemeine Ödembildung und Infiltration während einer Entzündungsreaktion. Dahingegen kam es zu allen Zeitpunkten zu einem signifikanten Anstieg der Ohrdicke in den Croton Öl konfrontierten Reaktionsgruppen. Der parallele Verlauf der Ohrdicke in den ersten 5 h, in denen auch die Ergebnisse der intravitalmikroskopisch gemessenen Leakage vorliegen, zeigt eine beeindruckende Übereinstimmung mit der Entwicklung der Leakage zum gleichen Zeitpunkten. Der durch die Leakage bedingte Einstrom von plasmazellulären Bestandteilen und in Folge auch von Wasser führt zu einem direkt messbaren Ödem.

## Ergebnisse

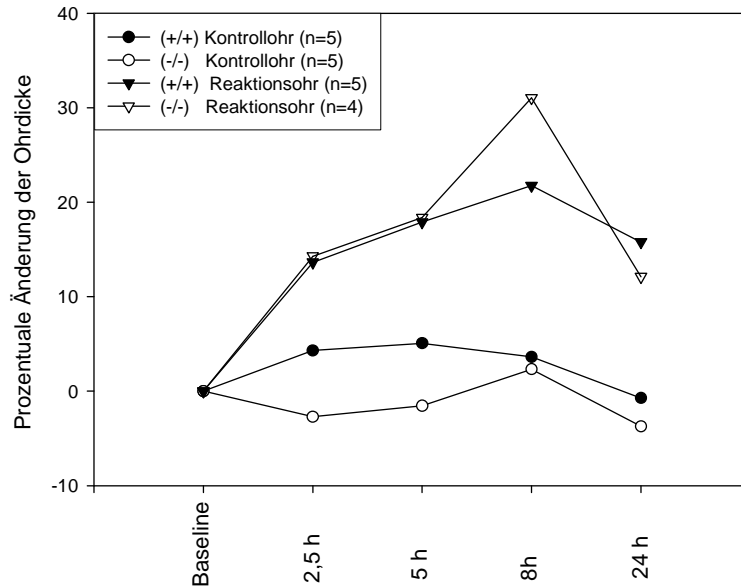


Diagramm 8: Prozentuale Änderung der Ohrdicke (Spring loaded caliper) in 4 verschiedenen Gruppen zu 5 Zeitpunkten (Baseline, 2,5; 5; 8; und 24 Stunden)

1. Die Kontrollgruppen zeigen keine wesentlichen Veränderungen zur Ursprungsdicke.
2. Die beiden Reaktionskurven der PRTN3/ELA2 (-/-)-Gruppe mit (+/+)-Gruppe verlaufen bis zum Messzeitpunkt 5 Stunden parallel und differieren kurzzeitig zum Zeitpunkt 8 Stunden.

Ähnlich wie bei der Analyse der Leakage verläuft die Erhöhung der Ohrdicke zumindest in den Reaktionsgruppen sehr parallel. Dies zeigt sich eindrucksvoll wenn man die prozentuale Änderung der Ohrdicke zum Ausgangswert errechnet und in ein Diagramm überträgt. Erst nach 8 Stunden erscheint die Zunahme der Ohrdicke in der Wildtypgruppe, auch wenn nicht statistisch signifikant stärker ausgeprägt als in der PRTN3/ELA2 (-/-) Gruppe. Dieser Trend kehrte sich in der Messung nach 24 Stunden wieder um.

### 3.2.2.2 Ergebnisse der computerassistierten Ohrdickemessung

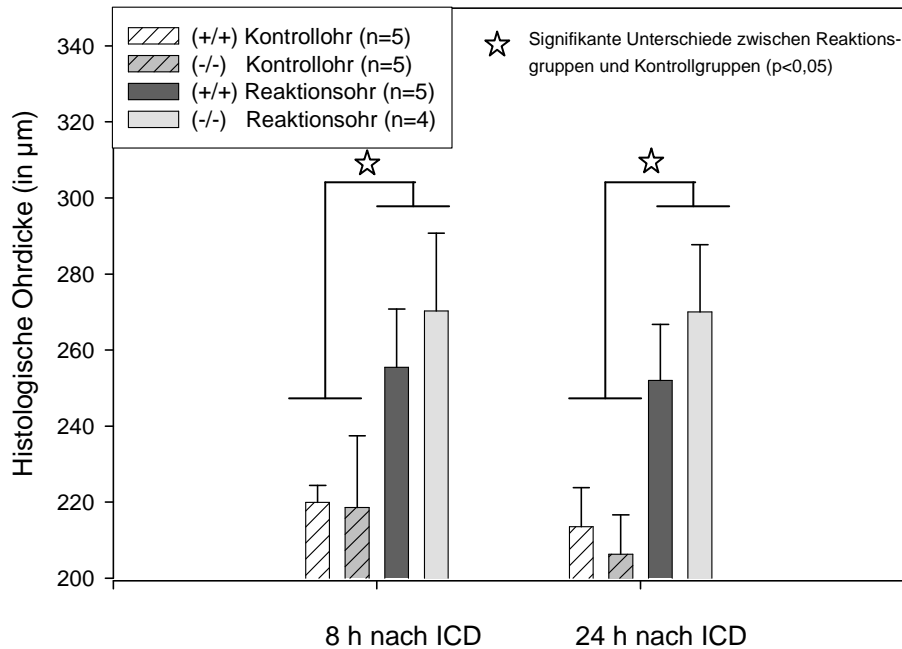


Diagramm 9: Histologisch gemessene Ohrdicke in 4 verschiedenen Gruppen 8 und 24 h nach Induktion der ICD mit Croton Öl

1. Die Kontrollgruppen zeigen keine wesentliche Veränderung zum Zeitpunkt 8 h und 24 h nach ICD
2. Zu beiden Zeitpunkten ließ sich ein statistischer Unterschied zwischen Kontrollohren und Reaktionsohren feststellen.
3. Zudem zeigte sich, gemessen am histologischen Präparat, sowohl nach 8 h als auch nach 24 h sich eine höhere Ausprägung der Ohrdicke in der PRTN3/ELA2 (-/-) - Gruppe im Vergleich mit der (+/+) - Gruppe, (253+/-14,3 versus 270,0+/-17,0 und 219,9+/-4,5 versus 270,3+/-20,4). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

Wir analysierten die Dicke der histologischen Präparate mit einem computergestützten Methode (siehe 2.7.1.), um die Ergebnisse der manuellen Ohrdickemessung zu den Zeitpunkten 8h und 24h zu verifizieren. Auch hier waren die ermittelten Ohrdicken im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant höher. Im direkten Vergleich der PRTN3/ELA2 (-/-) und (+/+) zeigte sich interessanterweise sowohl zum Zeitpunkt 8 h als auch zu Zeitpunkt 24 h eine erkennbare höhere Ohrdicke im Vergleich zum Wildtyp. Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant.

### 3.2.2.3 Vergleich der histologischen und manuellen Messungen der Ohrdicken

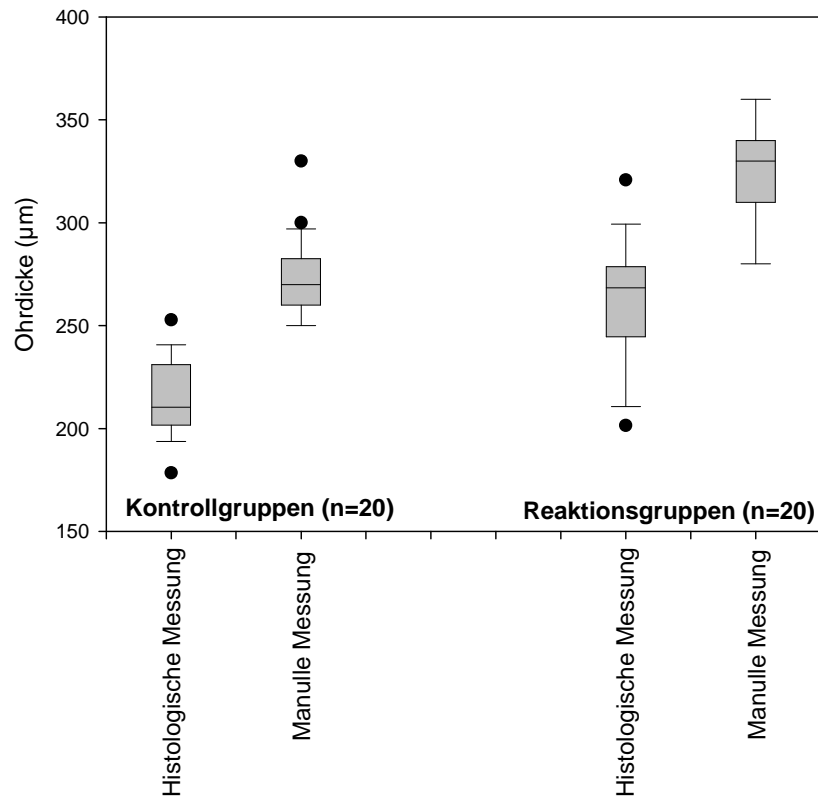


Diagramm 10: Vergleich zwischen der histologischen und der manuellen Messung der Ohrdicke in  $\mu\text{m}$

1. Beide Messmethoden ermitteln Werte mit vergleichbarer Streuung der Einzelwerte.
2. Die Werte der manuellen Messungen weichen im Durchschnitt um 25% von den histologischen Ohrdickemessungen ab. Dies ist wahrscheinlich auf eine allgemeine formalinbedingte Schrumpfung des Gewebes zurückzuführen.

Eine Zusammenstellung der Messergebnisse aller Reaktions- und Kontrolltiere zeigte im Schnitt den gleichen Anstieg von 8 h bis 24 h im Verlauf der ICD. Die Messergebnisse der histologischen Messungen waren im Gegensatz zu der manuellen Messungen im Schnitt um 25% niedriger, was vermutlich auf einen Formalin-induzierte Gewebeschrumpfung im histologischen Vorbereitungsprozess zurückzuführen ist.

### 3.2.2.4 Die zelluläre Infiltration im Rahmen der ICD zeigt keinen Unterschied zwischen PRTN3/ELA2 (-/-) und (+/+)

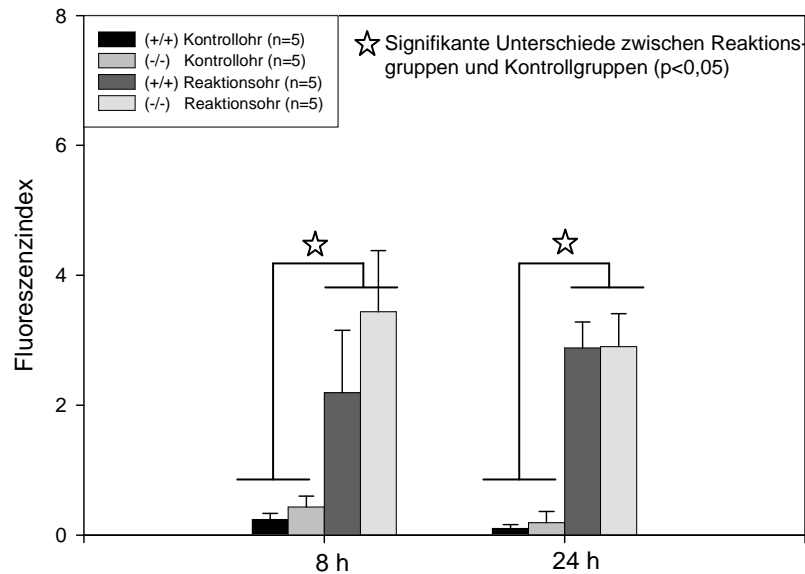


Diagramm 11: CD45 computerassistierte Messung des Fluoreszenzindex im Beobachtungsfeld (Unterseite des Ohrs) als Maß für die totale Leukozyten-Infiltration zum Zeitpunkt 8 h und 24 h nach Induktion der ICD

1. Kontrollgruppen zeigen zu beiden Zeitpunkten eine geringe Fluoreszenz innerhalb des histologischen Schnitts des Ohrs.
2. Alle Reaktionsgruppen zeigen zur Kontrollgruppe signifikant höhere Fluoreszenzparameter als Maß für eine signifikant höhere Infiltration von Leukozyten. 8 h nach der Induktion der ICD (Croton) wurde in der PRTN3/ELA2-defizienten Gruppe eine höhere Fluoreszenz gemessen (2,4 +/-0,09 versus 3,44 +/-0,94). Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant.

In allen Reaktionsgruppen wurde eine signifikante Zunahme aller Leukozyten (CD45) und auch neutrophiler Granulozyten (Ly-6G) beobachtet. In den histologischen Präparaten der Kontrollgruppen dagegen zeigten sich kaum Infiltrate. Sowohl 8 h als auch 24 h nach der ICD lassen sich in der Messung des panleukozytären Infiltrats und der spezifischen Auszählung neutrophiler Granulozyten keine signifikanten Unterschiede zwischen PRTN3/ELA2-defizienten Mäusen und +/+ Mäusen erheben.

Im Rahmen der ICD mit Croton Öl kommt es zu einer starken Infiltration von neutrophilen Granulozyten ins Gewebe mit einem Maximum nach 24 Stunden [29]. Ein Anstieg bis zu diesem Zeitpunkt konnte ebenfalls beobachtet werden. PRTN3/ELA2-defiziente Tiere entwickeln nach 8 h eine leicht-, aber nicht signifikant-, höhere Infiltration von neutrophilen Granulozyten im Gegensatz zur Kontrollgruppe.

## Ergebnisse

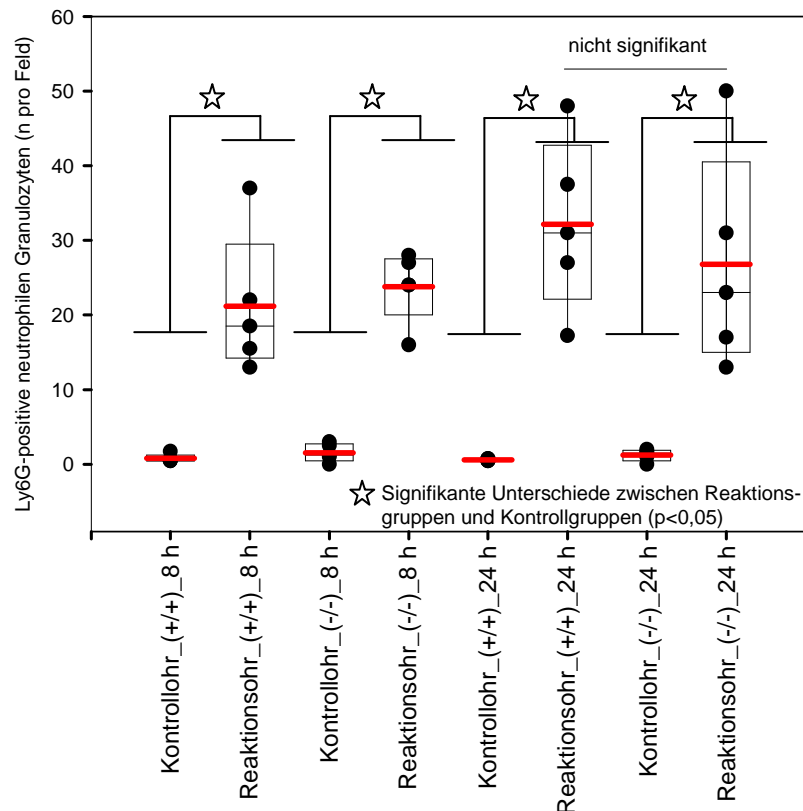


Diagramm 12: Anzahl von Ly-6G-positiven neutrophilen Granulozyten pro Beobachtungsfeld (ventrale Ohrseite)

1. In allen Kontrollgruppen fanden sich kaum neutrophile Granulozyten.
2. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen konnte in allen Reaktionsgruppen eine signifikant erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Dabei lagen die Werte 24 Stunden im Mittel höher als nach 8 Stunden nach Induktion der ICD (Croton). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den PRTN3/ELA2 (-/-) und (+/+) ergaben sich nicht.

Dieser Unterschied lässt sich durch Messung der panleukozytären Infiltration mit CD45 beobachten, ohne dass eine Signifikanz erhoben werden kann. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Untersuchungen von Young und Mitarbeitern [244] an ELA2-defizienten Mäusen. In einem TNFalpha und Il-1β basierten Entzündungsmodell am Modell des Cremastermuskels beobachtete diese Gruppe nach 4 h eine nicht signifikante Erhöhung der Anzahl infiltrierender neutrophiler Granulozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. 24 h nach Einleitung der gleichen Reaktion dagegen fiel die Infiltration der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe eher schwächer aus [244].

### 3.3. Reverse passive Arthus Reaktion

#### 3.3.1. Etablierung der Arthus Reaktion am Modell des Ohrs der Maus

Zur Induktion der Arthus Reaktion ist eine Deposition von Antikörper an dem zu untersuchte Areal notwendig. In der Peritonealhöhle stellt dies ein einfaches Verfahren dar, wird aber komplexer, wenn es sich bei dem Beobachtungsareal um ein so dünnes und verletzliches Areal wie dem Mäuseohr handelt.

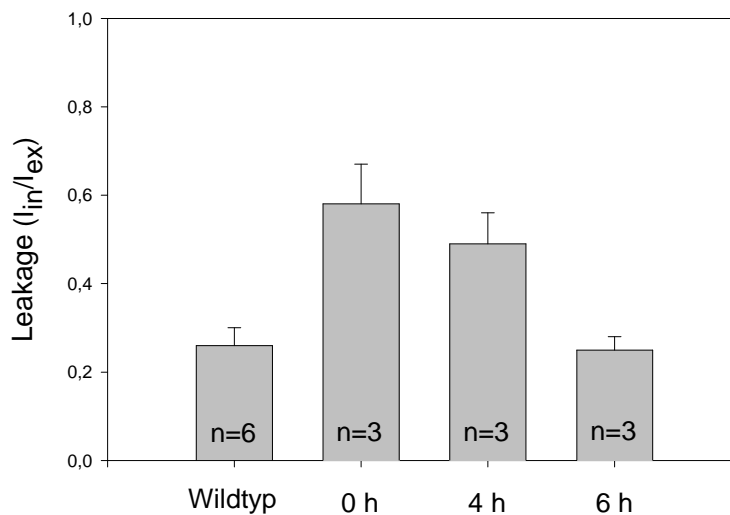


Diagramm 13: Leakage nach vor (Wildtyp), 0h, 4h und 6h nach Applikation von 10µl NaCl in das subdermale Kompartiment der dorsalen Ohrseite mithilfe einer speziellen Mikronadel.

1. Durch die Applikation von Volumen (NaCl) ins Ohr stieg die Leakage um mehr das Doppelte an.
2. Nach einer Latenzzeit von 4h nach Applikation nahm die Leakage wieder ab, erreichte aber erst nach 6h das Niveau des Wildtyps.

Dieses intravitalmikroskopische Modell ist so sensibel, dass eine applizierte Menge an Flüssigkeit schon Messwerte beeinflussen kann. Nach der Injektion von NaCl (10µl) in das subdermale Kompartiment des Mäuseohrs zeigte sich mehr als eine Verdopplung der plasmazellulären Leakage.

## Ergebnisse

---

Erst durch längere Pausen nach Applikation der Flüssigkeit nimmt die gemessene Leakage wieder ab und erreicht erst nach 6 h wieder den Baselinewert.

In Folge wurden nach der Installation von Antikörper in das Ohr eine Latenzzeit von 6 h festgehalten.

<b>Gruppe</b>	<b>Antigen</b>	<b>Antikörper</b>
<b>Kontrolle 1</b>	--	--
<b>Kontrolle 2</b>	NaCl	1:8
<b>Kontrolle 3</b>	1:1	NaCl
<b>Arthus-Reaktion 1</b>	1:1	1:8
<b>Arthus-Reaktion 2</b>	1:1	1:16
<b>Arthus-Reaktion 3</b>	1:1	1:64

Tabelle 4: Gruppeneinteilung der Untersuchungen zur Arthus Reaktion



## Ergebnisse

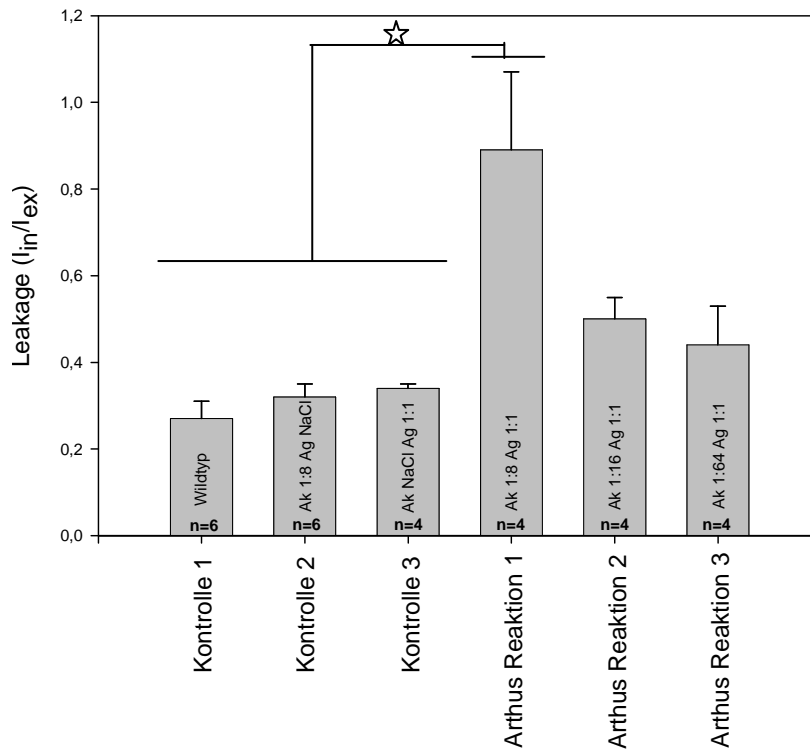


Diagramm. 14: Plasmazelluläre Leakage in 3 Kontrollgruppen und 3 Arthus-Reaktion Gruppen mit absteigender Verdünnung des Antikörpers.

1. Im Vergleich zu der Wildtyp Gruppe war die Leakage der Kontrollgruppen (Ak 1:1; Ag NaCl und Ak NaCl Ag 1:1) 6 h nach Injektion ins Ohr leicht erhöht.
2. Nach dem Start der Reaktion 6 h nach Injektion von 10µl Antikörper (Kanninchen-Anti-OVA-Antikörper 1:8) wurde die Reaktion durch intravenöse Gabe von Antigen (Chicken Ovalbumin) gestartet und die Leakage gemessen. Unmittelbar nach dem Start der Arthus Reaktion wurde ein sprunghafter Anstieg in der Gefäßpermeabilität mittels der Leakagemessung beobachtet. Dieser Anstieg war zu allen Kontrollgruppen signifikant.
3. Durch weitere Verdünnung des Antikörpers wurde die Zunahme Austritt von Fluoreszenzfarbstoff ins Gewebe deutlich abgeschwächt.

In einer ersten Versuchsreihe zur Arthus Reaktion wurden bei einer relativ kleinen Fallzahl 6 Stunden nach Applikation von Kanninchen-Anti-OVA-Antikörper die Reaktion durch intravenöse Gabe von Antigen (Hühner-Ovalbumin) initiiert. Die mikrozirkulatorischen Aufnahmen wurden direkt nach den Start der Reaktion aufgezeichnet (Tab. 4, Abb. 34).

## Ergebnisse

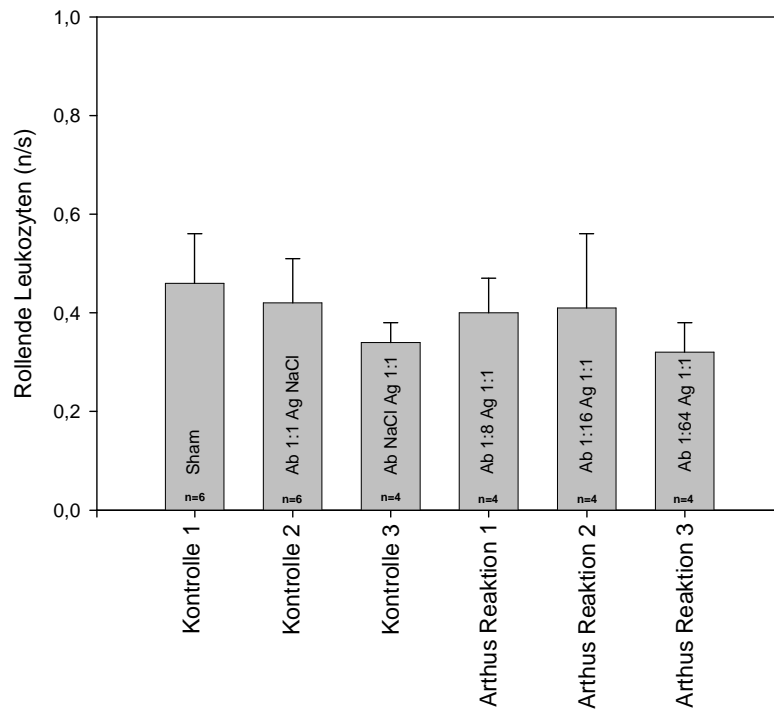


Diagramm 15: Anzahl der rollenden Leukozyten pro sec in 3 Kontrollgruppen und 3 Arthus-Reaktion Gruppen mit absteigender Verdünnung des Antikörpers.

1. Es zeigten sich in allen Gruppen keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl am Endothel entlangrollender neutrophiler Granulozyten.

Hierbei zeigte sich ein sprunghafter Anstieg der Leakage und der Anzahl adhärenter Leukozyten nach Induktion der Arthus Reaktion wobei Kontrollgruppen unauffällige Parameter aufweisen. Diese Effekte nahmen in den Gruppen mit stärkerer Verdünnung wieder ab. Bemerkenswerterweise waren keine Veränderung in der Anzahl rollender Leukozyten zu verzeichnen.

Verwunderlicherweise zeigten in der Gruppe der Arthus Reaktion (1:8) nur einige Tiere dieser Gruppe extrem hohe Werte in Leakage und Anzahl adhärenter Leukozyten. Daher wurde ein neuer Versuch zur Klärung dieses Sachverhalts und zur Etablierung dieses Modells entwickelt.

## Ergebnisse

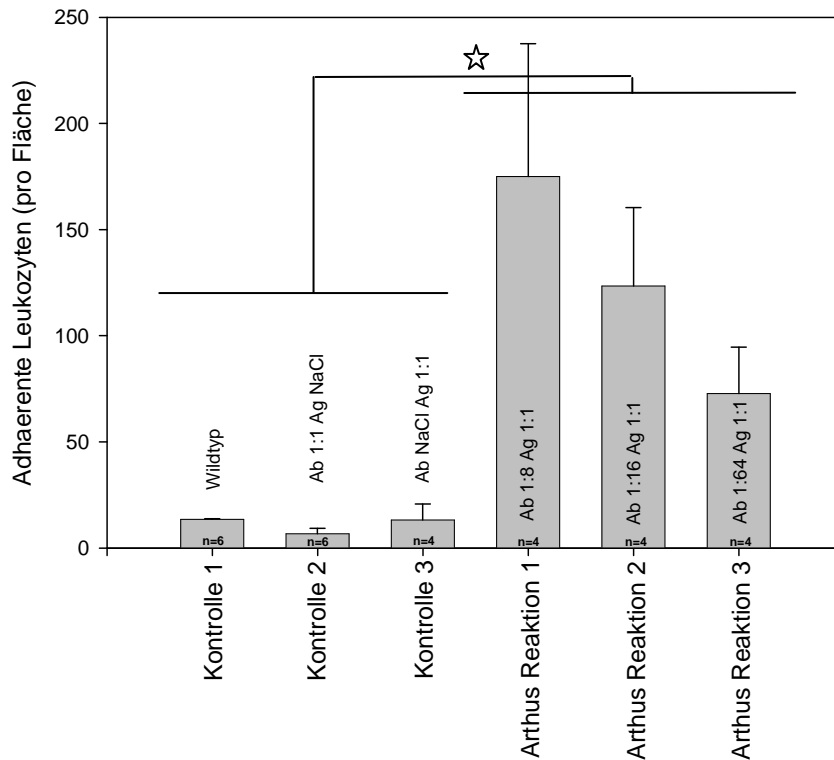


Diagramm 16: Anzahl adhärenter neutrophiler Granulozyten in 3 Kontrollgruppen und 3 Arthus-Reaktion Gruppen mit absteigender Verdünnung des Antikörpers.

1. Innerhalb der Kontrollgruppen wurden nahezu keine adhärenenten neutrophilen Granulozyten gefunden.
2. Nach dem Start der Reaktion 6 Stunden nach Injektion von 10µl Antikörper wurde die Reaktion durch intravenöse Gabe von Antigen gestartet und die Anzahl der am Endothel fest anhaftender Leukozyten ausgezählt. Auch hier konnte unmittelbar nach dem Start der Arthus Reaktion ein gegenüber den Kontrollgruppen signifikanter Anstieg adhärenter Leukozyten beobachtet werden.
3. Die Verdünnung des Antikörpers ging mit einer Reduzierung der Anzahl adhärenter Leukozyten einher.

### 3.3.2. Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen zur Arthus-Reaktion

Das Protokoll zur Arthus Reaktion wurde zur Überprüfung dieser Ergebnisse nochmal modifiziert: Mit Hilfe des Venendauerkatheters konnte durch die alleinige Gabe von Farbstoffen die Aufnahme unauffälliger Baselinewerte an mehreren vordefinierten „regions of interest (ROI)“ erfolgen. Die Arthus Reaktion konnte nun unabhängig durch die separate Gabe von Ovalbumin über Katheter gestartet werden.

## Ergebnisse

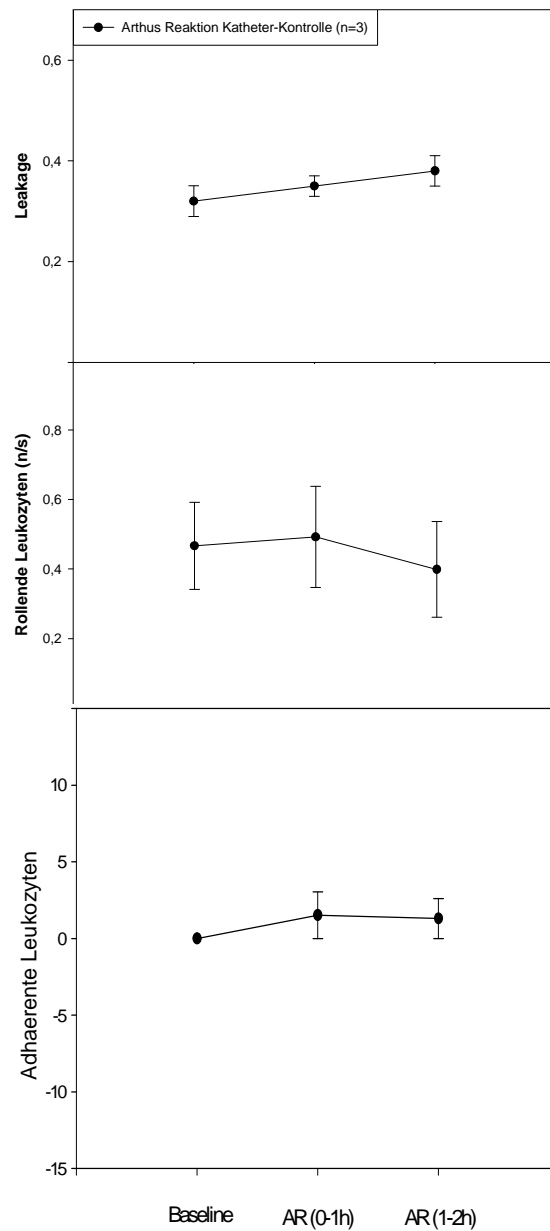


Diagramm. 17: Kontrolluntersuchung zur Arthusreaktion: 6 h nach Injektion von 10 $\mu$ l des Antikörpers wurde erst Fluoreszenzmarker i.v. injiziert und von Stichkanal entfernte Gefäßabschnitte mit unauffälliger Mikrozirkulation aufgenommen und als Regions of interest (ROI) definiert. Anschließend die Arthus-Reaktion gestartet und die definierten ROIs mehrfach in der ersten Stunde (0-1h) und der zweiten Stunde aufgenommen.

## Ergebnisse

---

1. Sowohl in dem ersten (0-1h) als auch in dem zweiten Beobachtungszeitraum (1-2h) nach dem Start der Arthus Reaktion stiegen Leakage und die Anzahl der adhärenenten Leukozyten wider Erwarten im Gegensatz zu den ersten Versuchen zur Arthus Reaktion nicht an.
2. Die Anzahl der rollenden Leukozyten zeigte in diesen Untersuchungen wie in den ersten Versuchen zur Arthus Reaktion keine wesentlichen Veränderungen. Die höhere Schwankungsbreite der Messwerte die in diesem Versuch ist auf das zusätzliche Trauma der Implantation eines venösen Dauerkatheters zurückzuführen.
3. Der dezent Anstieg der Leakage im Zeitverlauf ist mit dem Anstieg der Leakage der Baselinegruppe der Croton Öl induzierten irritativen Kontaktdermatitis vergleichbar. Über die Zeit reichert sich der Plasmamarker im extravasalen Gewebe an führt über einen höheren durchschnittlichen Fluoreszenzindex zu dem scheinbaren Anstieg der Leakage

Die oben gezeigten Diagramme zeigen eine unauffällige Mikrozirkulation (Baseline) an Gefäßabschnitten wodurch Defekte durch die Nadelstichapplikation des Antikörpers ausgeschlossen werden konnten. Durch die Gabe von Antigen (Ovalbumin) gegen den 6 h zuvor eingespritzten Antikörper (Konzentration 1:8) wurde die Arthus Reaktion online gestartet. Es resultierte keine wesentliche Veränderung der Mikrozirkulation. In unserem ersten Modell kam es, vermeintlich durch die Arthus Reaktion, zur stark erhöhten Leakage-Werten und stark erhöhter Anzahl adhärenenten Leukozyten.

### 4. Diskussion

Die neutrophilen Serinproteasen PRTN3 und ELA2 sind an zahlreichen immunologischen Vorgängen beteiligt. Zahlreiche Studien belegen ihre Fähigkeit aufgrund ihres lysogenen Potenzials an Gewebe- und Organschädigungen synergistisch beteiligt zu sein [16, 117]. Darüber hinaus wirken sie modulierend auf verschiedene inflammatorische Prozesse [18, 19, 50, 55, 133, 165, 179, 183].

Mittlerweise konnte an einem Hautmodell eine Beteiligung der Protasen an antikörpervermittelten Erkrankungen, wie dem bullösen Pemphigoid aufgezeigt werden [141]. Weiterhin konnte eine wichtige Rolle der Serinproteasen in einem anderen antikörpervermittelten Entzündungsmodell, der immunkomplex-vermittelten RPAR, nachgewiesen werden [168]. Dabei wurden bereits in einem frühen Stadium Defekte im Entzündungsgeschehen beobachtet.

Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung der Rolle der neutrophilen Serinproteasen PRTN3 und ELA2 an einem nicht-invasiven und nicht-antikörpervermittelten sowie an einem invasiven, antikörpervermittelten Entzündungsmodell. Dabei sollte neben etablierten Parametern der späten Phase insbesondere der inflammatorische Prozess auf Ebene der Leakage und der LEI während der frühen Phase der Entzündungsreaktion untersucht werden. Weitere Erkenntnisse sollte der direkte Vergleich zwischen unspezifischer nicht-antikörpervermittelter und antikörpervermittelter Reaktion liefern.

Zur Beantwortung dieser Fragenstellung mussten vorab die folgenden Grundlagen definiert werden:

- Wahl eines geeigneten nicht-invasiven, nicht-antikörpervermittelten, neutrophilen Entzündungsreizes an der Haut.
- Entwicklung und Etablierung eines geeigneten Hautmodells zur Untersuchung molekularer Entzündungsparameter (Leakage, LEI) der frühen Phase anhand des gewählten nicht-invasiven Entzündungsreizes.
- Wahl eines geeigneten invasiven, antikörpervermittelten Entzündungsreizes an der Haut und Etablierung am dafür entwickelten Hautmodell.

### 4.1 Wahl der Entzündungsreize und des Untersuchungsmodells

#### 4.1.1 Irritative Kontaktdermatitis mit Croton Öl (ICD) als Modell einer nicht-invasiven, nicht-antikörpervermittelten neutrophilen Entzündungsreaktion

Die atraumatische Induktion einer neutrophilen Entzündungsreaktion wurde durch die Wahl einer topisch applizierbaren Substanz gelöst. Der Mechanismus sollte dabei nicht über eine Kontaktsensibilisierung erfolgen, da diese über T-Zellen mediiert wird und einer Sensibilisierungsphase bedarf. Daher wurde als unspezifisches Irritans das etablierte Croton Öl [78] zur Induktion einer akuten, irritativen, neutrophilen Dermatitis gewählt.

Croton Öl (Oleum Tiglii) wird aus den Samen der mexikanischen Pflanze Croton Tiglium hergestellt. Dieses Öl führt, nach dem Auftragen auf die Haut, ähnlich dem Ablauf der RPAR, zu einer schnellen Ödembildung mit einem Maximum bei 6-8 h und zu einer starken Infiltration von neutrophilen Granulozyten mit einem Maximum nach 24 h (Abb.22) [29].



Croton Tiglium

Die Croton Öl induzierte ICD stellt ein verbreitetes Entzündungsmodell zur Untersuchung von neuen, antiinflammatorischen Substanzen dar. Es wird am Ohr der Maus durchgeführt und steht repräsentativ für eine Vielzahl von akuten, neutrophilen Entzündungsreaktionen. Im Gegensatz zu in-vitro Ansätzen werden hier nicht nur einzelne Funktionen analysiert, sondern in-vivo eine komplexe, immunologische Reaktion induziert [78]. Neben der leichten Handhabung ermöglicht dieses Modell einen atraumatischen, gut charakterisierten, nicht-antikörpervermittelten Entzündungsreiz zu untersuchen. Pathophysiologisch ist die Entzündungsreaktion auf Croton Öl noch nicht klar definiert. Als der biologisch aktivste Inhaltsstoff von Croton Öl gilt das Phorbol-12-myristate-13-Acetat (PMA), welches direkt die Proteinkinase C  $\alpha$  aktiviert [30]. Untersuchungen mit blockierenden Antikörpern konnten ferner eine zentrale Beteiligung des Entzündungsmediators TNF $\alpha$  im Rahmen der ICD nachweisen [123].

Meist wird zur Induktion einer Croton Öl vermittelten Entzündungsreaktion mit 20 $\mu$ l 1%-2,5%igem Croton Öl gearbeitet, um einen starken Entzündungsreiz zu erzeugen [87, 160].

Wir wählten aus zwei Gründen einen geringen Entzündungsreiz mit 10 µl 1%igem Croton Öl:

- Erstens lässt sich der Brennpunkt des Mikroskops im dicker werdenden Gewebe nicht ausreichend auf die Gefäße fokussieren. Da aber ein stärker Entzündungsreiz eine stärkere Ödementwicklung hervorruft, wird das intravitalmikroskopische Bild so zunehmend unschärfer. Dies ist schon anderen Arbeitsgruppen, wie der von Andrian [129], aufgefallen.
- Zweitens helfen schwache Entzündungsreize auch dezente Unterschiede im Rahmen der LEI, zwischen PRTN3/ELA2 (-/-) und (+/+) Mäusen, aufzudecken, die bei stärkeren Reizen möglicherweise durch unspezifische Effekte überdeckt werden.

### **4.1.2. Entwicklung eines geeigneten Modells zur Untersuchung der Frühphase von Hautentzündungen an einem Mäusemodell**

In der Vergangenheit konnten verschiedene in-vitro Modelle, durch den Einsatz von Protease-Inhibitoren, eine Beteiligung von Serinproteasen am Entzündungsgeschehen nachweisen [5, 148]. Da aber in diesen Modellen weder der Blutstrom, noch die Scherrate, oder die Inhomogenität der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen berücksichtigt wird [68], wurde im Bereich der Mikrozirkulationsforschung nach einem geeigneten in-vivo Modell zur Beobachtung der Leakage und der LEI gesucht.

Dabei sollten mehrere Kriterien erfüllt sein:

- Es sollte atraumatisch, d.h. ohne größere chirurgische Manipulation, durchführbar sein.
- Es sollte repetitive Messungen inflammatorischer Parameter der Haut in-vivo und online ermöglichen.
- Es sollte die Möglichkeit bieten auch die Frühphase der Entzündungsreaktion zu beobachten.



Die Auswahl geeigneter tierexperimenteller Modelle zur Untersuchung am Mäuseohr in-vivo ist gering. Erst Entwicklungen im Bereich der Mikrozirkulationsforschung eröffnen heute diese Möglichkeiten:

1852 eröffnete Jones mit der ersten direkten Beobachtungen kleinster Blutgefäße die mikrozirkulatorische Forschung [116]. 80 Jahre später entwickelten Sandison und Mitarbeitern das erste transparente Kammermodell an einem Hasenohr [189], welches später von Algie und Mitarbeitern auf die Rückenhautfalte der Maus übertragen wurde [4]. 1980 stellte dann Eriksson sein Hautmikrozirkulations-Modell der haarlosen Maus vor das erstmals eine atraumatische Analyse der Mikrozirkulation der Haut ermöglichte [69].

Dieses Modell wurde von Bondar und Mitarbeitern für intravitalmikroskopische Untersuchungen zur Wundheilung weiterentwickelt und stellt auch für unsere Arbeitsgruppe ein etabliertes Modell dar [22, 23, 33]. Es erlaubt stetige Untersuchungen der kutanen Mikrozirkulation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen [23]. Daneben erlaubt das Modell die Anfertigung histologischer Schnitte für immunhistochemische Untersuchungen und kann durch Verwendung gentechnologisch veränderter Mäuse modifiziert werden [186].

Damit erfüllt dieses Modell alle von uns geforderten Eigenschaften.

## 4.2. Diskussion der Untersuchungstechniken

### 4.2.1. Intravitalmikroskopie

Mitte der 50-iger Jahre wurde durch die Einführung neuer, quantitativer intravitalmikroskopischer Methoden zur Analyse der Mikrozirkulation [105, 114] und deren Kombination mit der Videotechnik [103,104] der Grundstein für detaillierte Analysen der Mikrozirkulation gelegt. Die neuen Methoden eröffneten die Möglichkeit einer kontinuierlichen, quantitativen Analyse der Mikrozirkulation und waren damit der älteren, integralen Durchblutungsmessverfahren (z.B. der Mikrosphären-Technik) [95, 99] klar überlegen.

Die Intravitalmikroskopie erlaubt durch den Einsatz spezieller Fluoreszenzfarbstoffe die zuverlässige, objektive und schnelle Erfassung funktioneller Parameter, wie der Leakage und

der LEI [121]. Die Gefahr einer Überblendung bzw. Überkontrastierung beim Einsatz der Fluoreszenzfarbstoffe wird durch Reduktion der absoluten Lichtmenge durch Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur erreicht [94]. Durch den Einsatz von hoch empfindlichen Kameras kann die benötigte Lichtmenge weiter reduziert werden. So ermöglicht eine lichtempfindliche Kamera mit einer Lichtintensität von 0,01 Lux die Reduktion der Gesamtlichtmenge um den Faktor 40 [187].

Intravitalmikroskopische Aufnahmen wurden nur an Tieren durchgeführt, die die Kriterien der Präparation voll erfüllen. Insbesondere Tiere mit Ödemen und Entzündungszeichen im Bereich des Ohrs (z.B. durch Kratzen der Maus nach Depilierung) wurden vom Versuch ausgeschlossen.

### **4.2.2. Mikrozirkulatorische Parameter**

#### **4.2.2.1. Wahl der Narkose als beeinflussender Parameter auf die Mikrozirkulation**

Als Narkose wird das Inhalationsgas Isofluran verwendet, das sich schon in der Vergangenheit bei der Durchführung von intravitalmikroskopischen Modellen bewährt hat [210]. Es zeichnet sich durch einen geringeren Einfluss auf die Mikrozirkulation als z.B. Fentanyl [108]. Das Modell wurde ursprünglich für die wache, demobilisierte Maus beschrieben [69]. Eine solche Demobilisation im Wachzustand führt jedoch zu einer starken Stressreaktion, wobei die Mikrozirkulation und Immunität der Haut durch Aktivierung der sogenannten HPA-Achse (Hypothalamo-Hypophysär-Adrenergen Achse) beeinflusst wird [9, 246]. Deshalb wurden Versuche in Narkose bevorzugt.

#### **4.2.2.2. Auswertung der mikrozirkulatorischen Parameter**

Die quantitative Offline-Analyse der Messdaten erfordert ein hohes Maß an Konzentration und Erfahrung seitens des Untersuchers. Eine Trainingsphase ist nötig, um sich in die technisch anspruchsvolle Auswerteeinheit einzuarbeiten und die zur Verfügung stehenden Methoden richtig anzuwenden. Nur so ist die Auswertung der Ergebnisse standardisierbar und aussagekräftig. Eine hausinterne Versuchsauswertung (ICF-München) gleicher Aufnahmen durch den gleichen Untersucher an verschiedenen Tagen zeigten eine Varianz von +/-10% [245].

Um diese interindividuelle als auch intraindividuelle Schwankungen zu verhindern wurden Versuchsaufnahmen immer nur von einer Person und in einem möglichst kurzen Zeitraum ausgewertet.

### **4.2.3. „Spring-loaded Caliper“**

Früher wurde in Entzündungsmodellen am Ohr der Maus Ödembildung und Infiltration von Leukozyten durch Wiegen des abgetrennten Ohrs quantifiziert. Heute ermöglicht die Dickemessung des Ohres durch einen abgefederten, mechanischen Mess-Schieber („Spring-Loaded Caliper“) die repetitive Ohrdickemessung in-vivo. Dabei sollte die einzelne Messung schnell erfolgen, da der Stempel des Messgeräts bei längerer Messdauer Wasser aus dem Gewebe presst und damit das Messergebnis verfälscht [51].

### **4.2.4. Histologische Untersuchungen**

Histologische Schnitte wurden mittels den Fluoreszenzmarkern für Ly-6G und CD45 gefärbt. Während es sich bei Ly-6G um ein spezifischen Antigen für neutrophile Granulozyten handelt [127, 135], werden durch CD45 Antikörper membranständige Oberflächenmoleküle markiert, die wahrscheinlich als Rezeptoren, mit Tyrosinkinase-Aktivität, fungieren. Für die immunhistologische Differenzialdiagnostik hat dieses Protein eine herausragende Bedeutung, da es viele Blutzellen verlässlich markiert und als Pan-Leukozytenmarker fungiert (Abb.22).

### 4.3. Diskussion der Ergebnisse

#### 4.3.1. Evaluation des Tiermodells

Zur intravitalmikroskopischen Analyse wurde das ursprüngliche Modell der haarlosen Maus von Eriksson modifiziert. Wir übertrugen das von Eriksson etablierte Modell (SHK-1 hr/hr Stamm) auf den Mäusestamm C57/BL6 129SV, der den genetischen Hintergrund für unsere gentechnologisch veränderten Mäuse bildet.

Zur Etablierung unseres Modells wird die Mikrozirkulation des etablierten Modells der haarlosen Maus intravitalmikroskopisch analysiert (SHK-1 hr/hr Mäuse n=6) und mit Literaturangaben verglichen. Die ermittelten mikrozirkulatorischen Parameter haarloser SHK-1 hr/hr Mäuse aus eigener Aufzucht zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen der SHK-1 hr/hr Mäusen anderer Arbeitsgruppen [130, 158].

In einem nächsten Schritt wurde die Mikrozirkulation des depilierten, behaarten Mäusestamms (C57/B6/129 SV n=5) analysiert, der den genetischen Hintergrund unserer Knock-out Mäuse darstellt und mit den Parametern der SHK-1 hr/hr Mäusen verglichen [130, 158]. Unsere intravitalmikroskopischen Untersuchungen mit depilierten C57/B6/129SV Mäusen zeigten dabei ähnliche Ergebnisse in der Mikrozirkulation (Leakage und LEI) im Vergleich zu dem haarlosen Mäusestamm (SHK-1 hr/hr) sowie mit bereits publizierten Daten [130, 158].

Eine korrekte Durchführung des Modells war somit gegeben.

Als Nebeneffekt dieser Evaluation konnten wir eine Beobachtung von Mayrovitz und Janssen bestätigen: In ungereizten Hautgefäßen fanden sie, im Gegensatz zu den Gefäßen anderer Organen, eine Fraktion rollender Leukozyten. Auch in vorliegender Arbeit patrouillierte eine permanente Fraktion von Leukozyten am Endothel ungereizter Haut [108, 150]. Diese basale Fraktion rollender Leukozyten ist z.T. auf die Inhalationsnarkose mit Isofluran zurückzuführen [108], wurde aber auch schon ohne Narkose in der wachen Maus beobachtet [146] und als permanent verfügbarer Pool von Leukozyten im Gefäßbett der Haut interpretiert.

### 4.3.2. PRTN3/ELA2-defiziente Mäuse im Entzündungsprozess

#### 4.3.2.1. PRTN3/ELA2-defiziente Mäuse

Obwohl eine Fülle von Studien eine Beteiligung der neutrophilen Serinproteasen PRTN3/ELA2 bei der Einwanderung neutrophiler Granulozyten auf inflammatorische Reize implizieren [44, 59, 241] und insbesondere Inhibitionsstudien mit Serinproteaseinhibitoren von einer reduzierten Infiltration berichten, [241, 247] zeigen Untersuchungen mit ELA2-monodefizienten Mäuse keine spezifische Hemmung der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten [6, 28, 244].

Verschiedene neutrophile Serinproteasen, die sich in Substratspezifität und Reaktionsgeschwindigkeit unterscheiden, haben eine hohe Anzahl überlappender Funktionen. Bei Nullmutanten mit einem Verlust von nur einer neutrophilen Serinprotease ist immer ein Kompensationsmechanismus der jeweils anderen Serinprotease möglich. Unter Verwendung von PRTN3/ELA2-doppelt-defizienten Mäusen lassen sich Kompensationseffekte von PRTN3 und ELA2 vermeiden. Weitergehende Charakterisierungen mit einer genetischen Defizienz für alle drei Proteasen PRTN3, ELA2 und CathG sind in der Literatur nicht dokumentiert.

#### 4.3.2.2. PRTN3/ELA2-defiziente Mäuse zeigen keine wesentlichen Unterschiede in basalen immunologischen Parametern

Immunologische Basisparameter wie Anzahl und Grundfunktion der neutrophilen Granulozyten sind eine Voraussetzung für die Untersuchung von spezifischen Unterschieden zwischen PRTN3/ELA2 (-/-) und (+/+). Da PRTN3 und ELA2 an der Proliferationsregulation granulopoetischer Vorläuferzellen beteiligt sind [199] und die erbliche, zyklische Neutropenie beim Menschen mit einem Defekt des Neutrophilen-Elastase-Gens assoziiert ist [101], wäre eine veränderte Granulopoese in PRTN3/ELA2-defizienten Mäusen zu erwarten. Untersuchungen von Pfister ergeben allerdings weder eine veränderte Variation der Anzahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut, noch weichen die Durchschnittswerte von denen des Wildtyp-Mausstammes ab [168]. Darüber hinaus zeigen beide Stämme ein unverändertes Phagozytoseverhalten neutrophiler Granulozyten [168].

### 4.3.2.3. Kein Einfluss von PRTN3 und ELA2 auf die plasmazelluläre Leakage während der ICD durch Croton Öl

Eine Herabsetzung der Barrierefunktion des Endothels führt zum Ausstrom von höhermolekularen Plasmaproteinen und damit zum interstitiellen Ödem. Dieser Prozess wird als Leakage bezeichnet [62, 204]. Experimentelle Entzündungsreaktionen führen über exogene und endogene Mediatoren, über eine Interaktion mit dem kontraktilen aktinfilamentären-Zytoskelett der Endothelzellen, zur Ausbildung von interzellulären Spalten (Gaps) [62, 98, 101, 204]. Eine Zunahme der parazellulären Permeabilität kann dabei einerseits durch Phosphorylierung junctionaler Bindungsproteine [67], andererseits über eine Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase erfolgen [122, 139]. Auch aktivierte, neutrophile Granulozyten können durch Ausschüttung von Elastase [171, 205, 214] und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [205, 213] ebenfalls eine Zunahme der Leakage bewirken. Während die Rolle von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gut charakterisiert ist [208, 234] ist die Wirkung von Elastase auf die endotheliale Permeabilität noch weitgehend ungeklärt.

Die Rolle der neutrophilen Elastase im Hinblick auf die Permeabilität wurde in der Vergangenheit primär am Modell der pulmonalen Endothelzelllinien untersucht:

An einem in-vitro Modell zur Messung der endothelialen Permeabilität pulmonaler Endothelzellen beobachteten Suttrop und Mitarbeiter nach Konfrontation mit gereinigter Elastase eine Zunahme von interzellulären Gaps und eine erhöhte endotheliale Permeabilität [204].

In unserem in-vivo Modell der intravitalmikroskopischen Bestimmung der plasmazellulären Leakage können wir keinen signifikanten Unterschied zwischen PRTN3/ ELA2-defizienten Tieren beobachten. In der Frühphase der irritativen Kontaktdermatitis durch Croton-Öl ist weder nach 2,5 h noch nach 5 h eine signifikant unterschiedliche Ausprägung der Leakage intravitalmikroskopisch zu beobachten. Die Dickemessungen des Mäuseohrs mittels „Spring-loaded Caliper“ ergaben ebenfalls keine unterschiedliche Diczunahme zwischen PRTN3/ELA2 (-/-) und (+/+) zu diesen (2,5 h und 5 h) sowie zu späteren Zeitpunkten (8 h und 24 h).

Dieser Unterschied zur Literatur lässt sich durch folgende Punkte begründen:

- Der Einfluss neutrophiler Elastase auf die Ausbildung der Leakage wurde besonders im Hinblick auf das akute Lungenversagen [154] untersucht. Dabei wurden die meisten Untersuchungen an pulmonalen Endothelzelllinien [199, 204, 205] durchgeführt. Diese unterscheiden sich grundlegend in Aufbau und Funktion und sind so mit dermalen Endothelien nur bedingt zu vergleichen [120, 195].
- Der Einfluss von Elastase auf die Permeabilitätssteigerung der Haut wurde bisher selten untersucht. 1991 konnten Kawabata und Mitarbeiter vom japanischen Minase Research Institute durch intravenöse Gabe von ELA2 eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität der Haut von Schweinen beobachten, die durch den spezifischen Elastase-Inhibitor ONO-5046 wieder aufgehoben werden konnte [118]. In diesem Versuch wurde die Veränderung der dermalen Kapillarpermeabilität durch intravenöse Gabe von ELA2 ausgelöst. Dieser unphysiologische Reiz ist nicht mit der Dynamik der ICD mit Croton Öl an der Haut zu vergleichen. Nach schweren Herzoperationen weisen manche Patienten eine pathophysiologisch erhöhte Konzentration von ELA2 im Serum auf. Dennoch waren diese Seren nicht in der Lage, die Permeabilität von kultivierten Endothelzellen zu erhöhen [192]. So sind höhere Mengen von ELA2, wie sie unter pathophysiologischen Bedingungen auftreten, wohl nicht, oder nur im Ausnahmefall (wie beim akuten Lungenversagen) in der Lage, die Leakage zu beeinflussen.

Vorversuche unserer Arbeitsgruppe konnten am Modell RPAR an der Bauchhaut von PRTN3/ELA2-defizienten Tieren eine deutliche Reduktion der vaskulären Permeabilität, gemessen am Austritt des Farbstoffs „Evans blau“, beobachten [168]. Dabei wurde derselbe Mäusestamm aus derselben Anzucht verwendet. Dies steht im Gegensatz zu unseren Beobachtungen zur ICD mit Croton Öl.

Die ICD und die RPAR zeigen große Unterschiede in ihren pathophysiologischen Entzündungsabläufen. Während die ICD mit Croton Öl durch die direkte Aktivierung von Effektorzellen zu einem starken Neutrophileninfiltrat führt, wird die RPAR über die Interaktion zwischen Immunkomplexen und Fc $\gamma$ -Rezeptoren vermittelt (177). Inwieweit sich dadurch unsere Beobachtungen begründen lassen wird in einem eigenen Kapitel diskutiert.

### 4.3.2.4. Kein Einfluss von PRTN3 und ELA2 auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im Model der ICD durch Croton Öl

Der Einfluss neutrophiler Serinproteasen auf den Migrationsprozess von neutrophilen Granulozyten wird schon länger vermutet. Zum einen konnte in vitro die Spaltung von wichtigen Adhäsionsmolekülen im Prozess des Rolling [79], des Sticking [46, 134] und der transendothelialen Migration [134] durch neutrophile Serinproteasen gezeigt werden. Zum anderen beobachtete man an Endothelzellkulturen einen Einfluss neutrophiler Serinproteasen auf das Transmigrationsverhalten gegenüber verschiedenen Reizen [5, 148]. Als Mechanismus wurde die lokale Freisetzung von gespeicherten neutrophilen Serinproteasen mit anschließender Membranbindung, am migrierenden Zellpol neutrophiler Granulozyten, unter dem Namen „limitierte Proteolyse“ diskutiert [161].

Der Einfluss von PRTN3 und ELA2 auf den Prozess der LEI wurde bisher nur wenig untersucht. Beobachtungen von Moser et al. an dem gleichen PRTN3/ELA2-defizienten Mäusestamm konnten in einem intravitalmikroskopischen Modell am Cremaster-Muskels der Maus keinen Unterschied in der Fraktion rollender Leukozyten und adhärenter Leukozyten auf PAF und fMLP nachweisen [155]. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den hier aufgeführten Untersuchungen. Hier zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Rollverhalten von Leukozyten im postarteriellen venösen Strombett zwischen PRTN3/ELA2 (+/+) und (-/-). Dies betraf sowohl die basale Mikrozirkulation als auch die Anzahl am Endothel rollender Leukozyten (Rolling) 2,5h und 5h nach der Konfrontation der Ohrhaut mit Croton Öl.

Das Rollen von Leukozyten am Endothel wird durch Selektine und deren Gegenrezeptoren vermittelt. Dabei spielt die Interaktion zwischen P-Selektin und dem wichtigsten Gegenrezeptor auf neutrophilen Granulozyten, dem P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), eine wichtige Rolle in der Vermittlung des Rollings in normalen und entzündeten Hautgefäßen dar [159, 235]. 2001 identifizierten Gardinger und Mitarbeiter ELA2 und CathG als PSGL-1-degradierende Enzyme und folgerten einen möglichen Mechanismus durch ausgeschüttete Serinproteasen in der Überleitung von Rolling in die feste Adhärenz [79].



In der vorliegenden Arbeit konnte am PRTN3/ELA2-defizienten Mäusestamm, in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Moser [155] keine Veränderung der Anzahl rollender Leukozyten aufgezeigt werden, weder unter normalen Bedingungen noch unter einem nicht-antikörpervermittelten Entzündungsreiz (ICD).

In-vitro Untersuchungen lassen vermutet, dass sich transmigrierende neutrophilen Granulozyten, nach der festen Bindung mit ICAM-1 oder VCAM-1, durch eine Spaltung dieser Bindung mittels ausgeschütteter ELA2 befreien können [46, 134]. In unserem Mäusestamm hätte eine erhöhte Anzahl adhärenter neutrophiler Granulozyten unter Basalbedingungen zur Folge gehabt. Dieser Effekt hätte sich unter Entzündungsbedingungen sogar noch verstärken müssen. Aber weder in unseren Untersuchungen, noch bei den Versuchen von Moser und Mitarbeitern desselben Mäusestammes am Cremastermuskels [155], zeigte sich dieser erwartete Effekt. Die Anzahl der adhärenter neutrophilen Granulozyten waren im Vergleich Doppel-Mutant zu Wildtyp zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich.

Zusammenfassend zeigten unsere Untersuchungen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Moser et al. [155] an einem nicht-antikörpervermittelten intravitalmikroskopischen Entzündungsmodell keine Veränderungen auf der Ebene des Rollings und des Stickings. Möglicherweise konnte der Defekt in PRTN3/ELA2-defizienten Tieren durch CathG kompensiert werden, das ebenfalls wie ELA2 in der Lage ist eine Spaltung der Bindung P-Selektin/PDGL-1 [79] zu bewirken. Außerdem kann CathG Isoformen von ICAM-1 [184] und unter bestimmten Bedingungen auch VCAM-1 spalten [134]. Eine vollständig erhaltene Funktion von Cathepsin G konnte grundsätzlich zumindest bei ELA2-monodefizienten Tieren nachgewiesen werden [93].

#### **4.3.2.5. Kein Einfluss von PRTN3 und ELA2 auf die transendotheliale Migration im Model der ICD durch Croton Öl**

Die Rolle der neutrophilen Serinproteasen im Prozess der nachfolgenden transendothelialen Migration ist ebenfalls noch unklar. ELA2 stellt in diesem Zusammenhang die am besten untersuchte Serinprotease dar. Die Studienlage bietet dennoch ein sehr kontroverses Bild: Eine Reihe von in-vitro und in-vivo Studien mit pharmakologischen Inhibitoren der ELA2 zur

## Diskussion

---

Migration von Leukozyten, unterstützen oder widersprechen einem Zusammenwirken in diesem Prozess [45, 77, 102, 147, 202, 241].

Untersuchungen an ELA2-defizienten Tieren deckten zwar die wichtige Rolle in der Immunregulation von ELA2 auf, wie z.B. in der Abwehr Gram-negativer Bakterien [6, 28, 213] und gegenüber Endotoxinen [213], konnten aber keinen Defekt in der Migration von neutrophilen Granulozyten beobachten [6, 28, 213].

Als nächster logischer Schritt zur Aufklärung der funktionellen Rolle von ELA2, in dem Prozess wurden intravitalmikroskopische Studien am Cremastermuskel, zur Beobachtung der einzelnen Migrationsprozesse in-vivo durchgeführt. An diesem Modell konnten Young und Mitarbeiter keine Beteiligung an der transendothialen Migration 4 h nach Stimulation mit TNF $\alpha$  und Il-1 $\beta$  beobachten. Allerdings zeigte sich eine signifikante Abnahme der Migration in einem Entzündungsmodell durch Zymosanpartikel. Diese letztere Abnahme wurde allerdings auf eine verminderte Produktion von proinflammatorischen Mediatoren und nicht auf eine direkte Beteiligung der ELA2 am Transmigrationsprozess zurückgeführt [244]. Dagegen konnte die gleiche Arbeitsgruppe durch die topische Applikation von Leukotrien-B4 (LTB4), einem potenten Aktivator für die Ausschüttung von Elastase, eine Reduzierung der Transmigrationsrate um 66% feststellen, nachdem die Tiere mit dem Elastaseinhibitor ONO-5046 vorbehandelt worden waren. ELA2-defiziente Tiere (-/-) zeigten in diesem Modell dagegen keine Veränderung im Transmigrationsverhalten.

Da ELA2-monodefiziente Tiere möglichen Kompensationsmechanismen durch andere Serinproteasen unterliegen, wurde versucht mit Hilfe von Doppel-Mutanten (PRTN3/ELA2 (-/-)) eine gegenseitige Kompensation dieser beiden Proteasen im Transmigrationsprozess auszuschließen. So gelang am Modell des entzündeten Cremastermuskels der Arbeitsgruppe um Moser und Mitarbeitern die Beobachtung einer reduzierten Infiltration von Leukozyten vier Stunden nach Konfrontation mit fMLP und PAF. Allerdings wurde dies auf eine reduzierte Migrationsgeschwindigkeit im extrazellulären Gewebe zurückgeführt [155].

Im Einklang mit diesen Ergebnissen führte die ICD mit Croton Öl in unseren Untersuchungen zu nicht zu einer Abschwächung der Infiltration von neutrophilen Granulozyten (gemessen am histologischen Infiltrat CD45-positiver Leukozyten im Allgemeinen und Ly-6G positiver neutrophiler Granulozyten im Speziellen, Abb. 22).

## Diskussion

---

Unsere Ergebnisse sind darüber hinaus zu früheren in-vivo Untersuchungen konsistent, die eine normale Infiltration von neutrophilen Granulozyten, sowohl bei intraperitonealer Konfrontation mit Gram-negativen Bakterien [28] als auch gegenüber dem unspezifischen Entzündungsstimulus Thioglycolate [2] bei Elastase-monodefizienten Mäusen beobachteten.

Wie schon oben angeführt, wird in verschiedenen Entzündungsmodellen auf den Kompensationsmechanismus Serinprotease-defizienter Tieren hingewiesen [244]. In unserem PRTN3/ELA2(-/-)-defizienten Tierstamm ist möglicherweise das verbliebene CathG, unabhängig von PRTN3 und ELA2, in der Lage die Transmigration allein zu bewerkstelligen. Der vollständige Erhalt der biologischen Funktionen von Cathepsin G konnte in diesem Zusammenhang bereits früher anhand eines ELA2-defizienten Mäusestammes gezeigt werden [146]. Hermant et al. konnte in einem HUVEC-Modell die Transmigration von neutrophilen Granulozyten nur hemmen, wenn sowohl ELA2 als auch CathG inhibiert wurde. Eine solche Überschneidung in der biologischen Funktion könnte auch erklären, warum neutrophile Granulozyten, in Gegenwart von spezifischen Elastaseinhibitoren und in ELA2-defizienten Mäusen, keine Einschränkung in der Transmigrationsfähigkeit zeigen [93].

Beim Menschen führt ein Defekt der Dipeptidyl-Peptidase I, welche für die Aktivierung von PRTN3, ELA2 und CathG notwendig ist, zum sogenannten Papillon-Lefèvre-Syndrom. Neutrophile Granulozyten dieser Patienten zeigen, trotz Mangels an funktionsfähigen Proteasen, keine Fehlleistung bei der Abtötung von *Escherichia coli* und Staphylokokken [170]. So scheint es auch hier alternative Mechanismen zu geben, diesen Defekt in-vivo zu kompensieren.

### 4.4. Etablierung der RPAR am Ohr der Maus

Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen am nicht antikörpervermittelten Entzündungsmodell der ICD mit Croton Öl beobachteten Pfister et al. am selben PRTN3/ELA2-defizienten Mäusestamm, aber bei einem antikörper-vermittelten Entzündungsmodell (RPAR), eine deutliche Reduktion der Ödembildung und der Neutrophileninfiltration. Die Art des Entzündungsreizes scheint dabei einen besonderen Einfluss auf die Beteiligung der Serinproteasen zu haben. Aus diesem Grund wurde im Verlauf unserer Untersuchungen versucht, das invasive Entzündungsmodell der reversen passiven Arthus Reaktion auf das intravitalmikroskopische Modell zu übertragen.

Das invasive Modell der RPAR benötigt die subkutane Applikation eines spezifischen Antikörpers. Um vorab eine Veränderung unspezifischer mikrozirkulatorischer Parameter auszuschließen, wurde ein Volumen von 10µl Kochsalzlösung subkutan injiziert. Es resultierte eine starke Erhöhung der Leakage initial nach dem Applikationsereignis, die aber nach 4 h deutlich rückläufig war. Wir interpretierten diesen Effekt als traumatisch bedingte Reaktion auf den Nadelstich zum einen und zum anderen als artifiziellen Effekt, basierend auf druckbedingter Degranulation von Mastzellen und paralleler Freisetzung von Histamin.

In den ersten Untersuchungen zur Arthus-Reaktion kam es zu einer Erhöhung der Ödembildung bzw. Leakage im Gegensatz zu den Kontrollgruppen. Diese waren schon Minuten nach dem Start der RPAR zu beobachten. Interessanterweise blieb die Zahl der rollenden Leukozyten während der Reaktion in etwa konstant. Dagegen konnte innerhalb von Minuten nach der Gabe von Antigen - ungewöhnlicherweise - eine Vielzahl adhärenter Leukozyten beobachtet werden. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse führten wir bei drei Mäusen zur Kontrolle ein modifiziertes Protokoll durch. Hierbei legten wir im Vorfeld der Analysen einen venösen Dauerkatheter und injizierten, 6 h nach Applikation des Antikörpers, die Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran und Rhodamine 6G. Die erste Messung diente als Basiswertbestimmung der Mikrozirkulation. Erst in Folge sollte die Reaktion durch die Gabe des Antigens gestartet und die mikrozirkulatorischen Änderungen an Gefäßen, mit vorher unauffälliger Mikrozirkulation, gemessen werden.

Dieses Setup wurde erst durch den Dauerkatheter möglich, da eine wiederholte Injektion von Flüssigkeiten in die Schwanzvene der behaarten, dunklen Maus ein sehr schwieriges Verfahren darstellt, das häufig zu letalen Embolieereignissen führt.

In dem verfeinerten Versuchsdesign konnten keine Änderungen zwischen Baseline und Reaktion herausgearbeitet werden. Als Grund für die Divergenz des ersten und des zweiten Arthus Versuchs nehmen wir die unvorhersehbare, traumatische Schädigung der Blutgefäße durch die ins Ohr vorgeschobene Mikrokanüle an, durch die der Antikörper eingebracht wurde. Unsere Analyse zum Einfluss von injizierter Flüssigkeit ins Ohr verzichtete auf Beobachtung der LEI, sodass eine, vereinzelt auftretende, traumatisch bedingte Entzündungsreaktion nach dem Nadelstich hier übersehen worden sein könnte. Das ungewöhnlich schnelle Auftreten von adhärenenten Leukozyten lässt sich unter diesem Blickwinkel jedoch auch anders interpretieren. Möglicherweise wurden bereits adhärente, aber noch nicht sichtbare, Leukozyten erst durch das anflutende Rhodamine 6G nach einigen Minuten sichtbar. Die Übertragung der invasiven RPAR scheint aufgrund der Empfindlichkeit dieses Modells nicht möglich zu sein.

### **4.5. Einfluss der Art des Entzündungsmodells auf die Beteiligung von PRTN3 und ELA2**

Mögliche Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse Elastase-, oder PRTN3/ELA2-defizienter Mäusestämme sind mannigfaltig. Experimentelle Entzündungsreize an verschiedenen Spezies (Schwein versus Maus) und verschiedenen Organsystemen (z.B. Haut versus Lunge versus Peritoneum) auf molekularer Ebene weisen Unterschiede auf, wie pathophysiologische Untersuchungen zur Arthus Reaktion klar aufzeigen [24, 209]. Es wurden aber auch voneinander abweichende Entzündungsverläufe zwischen unterschiedlichen Mäusestämmen beobachtet [203].

In unserem Modell der ICD mit Croton Öl zeigten sich keine Hinweise auf eine Beteiligung der beiden neutrophilen Serinproteasen im Entzündungsgeschehen. Allerdings konnte in Vorversuchen, an einem Modell der Arthus Reaktion an der Bauchhaut, Effekte dieser beiden Serinproteasen, sowohl bei der Infiltration von neutrophilen Granulozyten, als auch bei der Ödembildung nachgewiesen werden [167].

## Diskussion

---

Die divergierenden Ergebnisse lassen sich im Hinblick auf die unterschiedlichen Entzündungsreize diskutieren:

Als der biologisch aktivste Inhaltsstoff von Croton Öl gilt das Phorbol-12-myristate 13-Acetat (PMA), welches direkt die PKC $\alpha$  aktiviert [30]. Während die spätere Entzündungsphase von Croton Öl vermutlich durch die Neusynthese proinflammatorischer Mediatoren, aus aktivierten Keratinozyten vermittelt wird [238], werden frühe Effekte im Entzündungsgeschehen durch Aktivierung von Zellen mit präformierten Entzündungsmediatoren, wie z.B. dermalen Mastzellen, getragen. PMA vermittelt dabei durch die Aktivierung der PKC $\alpha$  die Ausschüttung des präformierten Cytokins TNF $\alpha$  aus Mastzellen [96]. Möglicherweise trägt sogar eine direkte Aktivierung der PKC von neutrophilen Granulozyten zu ersten Effekten der Croton-Öl vermittelten Entzündungsreaktion bei. Eine direkte Aktivierung führte aber in-vitro nur zu einer selektiven Ausschüttung spezifischer Vesikel [126, 151]. Die Serinproteasen PRTN3 und ELA2 werden allerdings fast ausschließlich in den azurophilen (primären) Granula gespeichert [35]. Auch TNF $\alpha$  führte bei neutrophilen Granulozyten nicht zur Ausschüttung von azurophilen Granula [88].

Möglicherweise ist die Art des Entzündungsreizes ausschlaggebend für die Beteiligung von PRTN3 und ELA2 an der Entzündungsreaktion. Diese Hypothese würde bedeuten: Je höher die Potenz des Entzündungsreizes zur Mobilisation der azurophile Granula aus neutrophilen Granulozyten, desto wahrscheinlicher die Beteiligung der Serinproteasen am Entzündungsgeschehen. Dass unterschiedliche Reize am Cremastermodell zur unterschiedlichen Hemmung der Transmigration durch einen Serinproteaseinhibitor führen, konnte jüngst von Young und Mitarbeitern festgestellt werden [244]. Diese Gruppe identifizierte IL-1 $\beta$  als potentesten Mediator der ELA2- Ausschüttung [244]. In-vitro gelingt es fMLP in Abwesenheit von Cytochalasin B kaum neutrophile Granulozyten zur Ausschüttung ihrer azurophilen Granula anzuregen [126]. Dagegen bewirken Immunkomplexe in-vitro eine Ausschüttung von azurophilen Granula von neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit vom Verhältnis aktivierender und inhibierender Fc $\gamma$ RII (Fc $\gamma$ RIIa/Fc $\gamma$ RIIb2 mRNA ratio). Bei einem Verhältnis 4:1 resultierte eine vergleichbare Ausschüttung wie nach Stimulation mit fMLP/Cytochalsin B [222].

## Diskussion

---

Neben diesen Vermutungen kann auch die unterschiedliche pathophysiologische Dynamik für ein verschieden starkes Ansprechen von PRTN3 und ELA2 in den beiden Modellen der RPAR und der ICD verantwortlich sein:

Während die ICD mit Croton Öl durch direkte Aktivierung von Zellen zu einem neutrophilen Infiltrat führt, ist die Arthus Reaktion eine experimentelle Immunkomplexreaktion, die durch Aktivierung des Komplementsystems und durch Interaktionen mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren, auf Effektorzellen vermittelt wird [25].

Die Komplementabhängigkeit zum Einen und die Interaktion zwischen Immunkomplexen mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren zum Anderen könnten bei der Beteiligung von PRTN3 und ELA2 am Entzündungsprozess der RPAR die entscheidende Rolle spielen.

Eine Aktivierung von Komplementfaktoren durch eine von ELA2 vermittelte Spaltung ist zumindest bekannt [228]. Dafür sprechen auch Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Pham et al. [2]: Mäuse ohne aktive neutrophile Serinproteasen waren gegenüber einer experimentellen Arthritisreaktion (passiven Transfer von Collagen II, die ebenfalls wie die RPAR stark von einer Komplementaktivierung abhängt, ) resistent [2, 230, 233]. Im selben Tierstamm wurden ebenso abgeschwächte Entzündungsreaktionen in der komplement-abhängigen Entzündung auf Zymogen beobachtet [2]. Dagegen zeigten dieser Mausstamm keinen Defekt der neutrophilen Infiltration nach Induktion einer sterilen Peritonitis mit Thiglycollate ohne Komplementbeteiligung [2].

Dagegen beobachteten Liu. et al an einem komplementvermittelten Modell des experimentellen bullösen Pemphigoids an der Haut an Elastase-defizienten Mäusen, 12 h nach Induktion der Reaktion, eine reduzierte Anzahl migrierter neutrophiler Granulozyten [141].

Die Interaktion zwischen Immunkomplexen mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren ist ein weiterer ein guter Ansatzpunkt zur Erklärung der unterschiedlichen Beteiligung von PRTN3 und ELA2 am Entzündungsprozess bei der ICD und der RPAR. Neuste Untersuchungen zeigen eine dominierende Rolle von Fc $\gamma$ R bei der Ausprägung von Immunkomplexreaktionen [177] wie der RPAR.

## Diskussion

---

PRTN3 und ELA2 defiziente, isolierte neutrophile Granulozyten produzieren nach Aktivierung mit Immunkomplexen 30-40% weniger radikale Sauerstoffspezies als Aktivierungsmarker im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten des Wildtyps. Dagegen zeigte sich nach der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten mit Phorbol Ester kein Unterschied [119]. Dieselbe Arbeitsgruppe verglich in einer aktuellen Studie das Emigrationsverhalten neutrophiler Granulozyten an unserem PRTN3 und ELA2 defizienten Mausstamm mit dem Wildtyp anhand der ICD mit Croton Öl und der RPAR an der Haut. Dabei wurde eine deutliche Reduktion infiltrierter neutrophiler Granulozyten im Modell der RPAR beobachtet. Im Modell der ICD mit Croton Öl zeigte sich im Einklang mit unseren Ergebnissen kein Unterschied. Die Autoren folgerten aus ihren Ergebnissen die besondere Bedeutung von PRTN3 und ELA2 bei immunkomplex-vermittelten Entzündungsreaktionen [119]. Dabei bestätigten sie ebenfalls aktuelle Studien zur Wichtigkeit von Serinproteasen, speziell in der Pathogenese von Immunkomplexerkrankungen [176].

Ein möglicher Interaktionspunkt zwischen PRTN3 und ELA2 während immunkomplex-vermittelten Entzündungen stellt Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) dar [196]. uPA [26] ist wie ICAM-1 [46] VCAM-1 [134] ein wichtiges Adhäsionsmolekül im Migrationsprozess im extrazellulären Gewebe und kann wie ICAM-1 und VCAM-1 durch neutrophile Serinproteasen gespalten werden [32, 137]. Ferner ist die Aktivierung von uPA auf Effektorzellen Voraussetzung für einen adäquaten C5a Rezeptorsignalweg und moduliert die Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren. Dies stellt den entscheidenden Schritt in Verlauf von Immunkomplexerkrankungen dar [196, 197].



### 4.6. Zusammenfassung

Auf akute Entzündungsreize hin verlassen neutrophile Granulozyten das Gefäßsystem durch eine Abfolge von Bewegungsmustern, genannt Rolling, feste Adhärenz und Transmigration. Die Rolle der drei neutrophilen Serinproteasen, PRTN3, ELA2 und CathG in dieser Adhäsionskaskade mit anschließender Migration ins Gewebe ist noch nicht vollständig geklärt.

In der vorliegenden Studie wurde, in einem intravitalmikroskopischen Ohrhautmodell der Maus, der Einfluss der beiden Serinproteasen PRTN3 und ELA2, an der nicht-invasiven, nicht-antikörpervermittelten ICD mit Croton Öl und an der invasiven, antikörpervermittelten RPAR untersucht.

Die Untersuchungen zeigten erstmals in-vivo normale mikrozirkulatorische Parameter (Leakage, Rolling, Adhärenz) der Hautgefäße bei PRTN3/ELA2(-/-)-doppelt-defizienten Mäusestamm. Nach Stimulation der Haut mit Croton Öl hin konnten keine Unterschiede in der LEI in der frühen Phase zwischen PRTN3/ELA2 (-/-) und (+/+), beobachtet werden. Ferner zeigten histologische Untersuchungen in der späten Phase der Entzündungsreaktion keine Unterschiede in der Infiltration neutrophiler Granulozyten.

Zur Untersuchung eines Immunkomplexmodell wurde versucht die reverse passive Arthus Reaktion auf das entwickelte Modell zu übertragen. Dabei erwies sich das Ohr der Maus, als intravitalmikroskopisches in-vivo Modell der Haut, aufgrund der leichten Verletzbarkeit der Blutgefäße als zu anfällig für dieses invasive Entzündungsmodell.

Unsere Studie zeigt damit erstmals die Unabhängigkeit des Entzündungsverlauf einer nicht-antikörpervermittelten, neutrophilen Entzündungsreaktion von PRTN3 und ELA2 an einem in-vivo Modell der Haut.

## Literatur

---

1. Aberle H, Schwartz H, Kemler R (1996)  
Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 61: 514-523
2. Adkison AM, Raptis SZ, Kelley DG, Pham CTN (2002)  
Dipeptidyl peptidase I activated neutrophil-derived serin proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. *J Clin Invest* 109: 363-371
3. Albelda SM, Smith, CW, Ward PA (1994)  
Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB* 8: 504-512
4. Algire GH (1943)  
An adaptation of the transparent-chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4: 1-11
5. Allport JR, Lim YC, Shipley JM, Senior RM, Shapiro SD, Matsuyoshi N, Vestweber D, Luscinskas FW (2002)  
Neutrophils from MMP-9-or neutrophil elastase deficient mice show no defect in transendothelial migration under flow in vitro. *J Leukoc Biol* 71: 821-828
6. Allport JR, Ding H, Collins T, Gerritsen ME, Luscinskas FW (1997)  
Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions. *J Exp Med* 186: 517-527
7. Almuneef M., S Al Khenazan, S Al Ajaji, A. Al-Anazi (2003)  
Pyogenic liver abscess and Papillon-Lefèvre syndrome: not a rare association. *Pediatrics* 111: 85-88
8. Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E (1999)  
Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherence junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2286-2297
9. Arck PC, Slominski A, Theoharides TC, Peters EM, Paus R (2006)  
Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. *J Invest Dermatol* 126: 1697-1704
10. Arnaout MA (1990)  
Structure and function of the leukocyte adhesion molecule CD11/CD18. *Blood* 75: 1037-1050
11. Arnaout MA, Lanier LL, Faller DV (1988)  
Relative contribution of the leukocyte adhesion molecule Mac-1, LFA-1 and p150, 95 (LeuM5) in adhesion of granulocytes and monocytes to vascular endothelium is tissue and stimulus-specific. *J Cell Physiol* 137: 305-309
12. Arthus M (1903) Injections répétées de sèrum de cheval chez le lapin. *C R Soc Biol* 55: 817-825
13. Baici A, Szedlacsek SE, Früh H, Michel BA (1996)  
pH-dependent hysteretic behaviour of human myeloblastin (leucocyte proteinase 3). *J Biochem* 317: 901-905
14. Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG (1971)  
The development of neutrophilic polymorphnuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 134: 907-934
15. Bainton DF, Farquhar MG (1966)  
Origin of granules in polymorphnuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the golgi complex in developing granulocytes. *J Cell Biol* 28: 277-301
16. Ballieux BE, Hiemstra PS, Klar-Mohamad N, Hagen EC, van Es LA, van der Woude FJ, Daha MR, (1994)  
Detachment and cytolysis of human endothelial cells by proteinase 3. *Eur J Immunol* 24: 3211-3215

## Literatur

---

17. Bank U, Ansorge S (2001)  
More than destructive: neutrophil-derived proteases in cytokine bioactivity control.  
*J Leukoc Biol* 69: 197-206
18. Bank U, Küpper B, Reinhold D, Hoffman T, Ansorge S (1999a)  
Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation. *FEBS Lett* 46: 235-240
19. Bank, U., Reinhold, D., Schneemilch, C., Kunz, D., Synowitz, H. J., Ansorge, S. (1999b)  
Selective proteolytic cleavage of IL-2 receptor and IL-6 receptor ligand binding chains by neutrophil-derived serine proteases at foci of inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 19: 1277-1287
20. Bargatze RF, Butcher EC (1993)  
Rapid G protein-regulation activation event involved in lymphocyte binding to high endothelial venules. *J Exp Med* 178: 367-372
21. Barker JH, Frank J, Bidiwala SB, Stengel CK, Carrol SM, Carrol CM, van Aalst V (1999)  
An animal model to study microcirculation changes associated with vascular delay. *British Journal of Plastic Surgery* 52: 133-142
22. Barker JH, Hammersen F, Bondar I, Galla TJ, Menger MD, Messmer K (1989a)  
The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation. *Plast Reconstr Surg* 83: 948-959
23. Barker JH, Hammersen F, Bondar I, Galla TJ, Menger MD, Gross W, Messmer K (1989b)  
Direct monitoring of nutritive blood flow in a failing skin flap: the hairless mouse ear skin-flap model. *Plast Reconstr Surg* 84: 303-313
24. Baumann U, Köhl J, Tschernig T, Schwerter-Strumpf K, Verbeek JS., Schmidt R E, Gessner JE (2000)  
A codominant role of Fc $\gamma$ RI/III and C5aR in the reverse Arthus reaction. *J Immunol* 164: 1065
25. Baumann U, Chouchakova N, Gewecke B, Kohl J, Carroll MC, Schmidt RE, Gessner JE (1999)  
Distinct tissue site-specific requirements of mast cells and complement components C3/C5a receptor in IgG immune complex-induced injury of skin and lung. *Mol Immunol* 36: 893-903
26. Beaufort N, Leduc D, Rousselle JC, Magdolen V, Luther T, Namane A, Chignard M, Pidard D (2004b)  
Proteolytic regulation of the urokinase receptor/CD87 on monocytic cells by neutrophil elastase and cathepsin G. *J Immunol*. 172: 540-549
27. Belaouaj A, Kim KS, Shapiro SD (2000)  
Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 289: 1185-1188
28. Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN, Shapiro SD (1998)  
Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med* 4: 615-618
29. Berg DJ, Leach MW, Kühn R, Rajewsky K, Müller W, Davidson NJ, Rennick D (1995)  
Interleukin-10, but not Interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory response. *J Exp Med* 182: 99-108
30. Bertolini TM, Giorgione J, Harvey DF, Newton AC (2003)  
Protein Kinase C Translocation by Modified Phorbol Esters with Functionalized Lipophilic Regions. *J Org Chem* 68: 5028-5036
31. Bianchi E, Bender JR, Blasi F, Pardi R (1997)  
Through and beyond the wall: late steps in leukocyte transendothelial migration. *Immunol Today* 18: 586-591

## Literatur

---

32. Binder BR, Mihaly J, Prager GW (2007)  
uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost* 97: 336-342
33. Bondar I, Uhl E, Barker JH, Galla TJ, Hammersen F and Messmer K (1991)  
A new model for studying microcirculatory changes during dermal wound healing. *Res Exp Med* 191: 379-388
34. Bories D, Raynal MC, Solomon D H, Darzynkiewicz Z, Cayre YE (1989)  
Down-regulation of a serineprotease, Myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cell* 59: 959-968
35. Borregaard N, Cowland JB (1997)  
Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89: 3503-3521
36. Bosse R, Vestweber D (1994)  
Only simultaneous blocking of the L-and P-Selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. *Eur J Immunol* 24: 3019-3024
37. Burns AR, Smith CW, Walker DC (2003)  
Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol Rev* 83: 309-336
38. Burns AR, Walker DC, Brown ES, Thurmon LT, Bowden RA, Keese CR, Simon SI, Entman ML, Smith CW (1997)  
Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J Immunol* 159: 2893-2903
39. Butcher EC (1991)  
Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036
40. Cai TQ, Wright SD (1996)  
Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha M beta 2) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. *J Exp Med* 184: 1213-1223
41. Campanelli D, Detmers PA, Nathan CF, Gabay JE (1990)  
Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *J Clin Invest* 85: 904-915
42. Campbell EJ, Campbell MA, Owen CA (2000)  
Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: quantification, catalytic activity, and susceptibility to inhibition. *J Immunol* 165:3366-3374
43. Carman CV, Springer TA (2004)  
A transmigratory cup in leucocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 167: 377-388
44. Carney DF, Jagels MA, Hugli TE, Sands H, Rubin H (1998)  
Alpha-1-proteinase inhibitor, anti-chymotrypsin, and a recombinant hybrid mutant of anti-chymotrypsin (LEX-032) modulate neutrophil adhesion interactions. *J Leukoc Biol* 63: 75-82
45. Cepinskas GM, Sandig P, Kvietys R (1999)  
PAF-induced elastase-dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front. *J Cell Sci* 112: 1937-1945
46. Chakrabarti S, Zee JM, Patel KD (2006)  
Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *J Leukoc Biol* 79: 214-222

## Literatur

---

47. Champagne B, Tremblay P, Cantin A, St Pierre Y (1998)  
Proteolytic cleavage of ICAM- 1 by human neutrophil elastase. *J Immunol* 161: 6398-6405
48. Chertov O, Ueda H Xu LL Tani K, Murphy WJ Wang JM, Howard O, Sayers TJ and oppenheim JJ (1997)  
Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med* 186: 739-747
49. Claudy A (1998)  
Pathogenesis of leukocytoclastic vasculitis. *Eur J Dermatol* 8: 75-9
50. Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wieczorek M, Kroona H, Leimer AH, Cheronis J (1999)  
Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor and IL-1 from stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6261-6266
51. Colorado A, Slama JT, Stavinoha WB (1991)  
A new method for measuring auricular inflammation in the mouse. *J Pharmacol Methods* 26: 73-77
52. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E (1999)  
Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9815-9820
53. Csató M, Judák R, Bozóky B, Czarnetzki BM (1990)  
Effect of tiacrilast, a mast cell mediator-release inhibitor, on murine experimental contact dermatitis. *Skin Pharmacol* 3:164-170
54. Csernok E, Szymkowiak CH, Mistry N, Daha MR, Gross WL, Kekow J (1996)  
Transforming growth factor-beta (TGF-beta) expression and interaction with proteinase 3 (PR3) in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Clin Exp Immunol* 105: 104-111
55. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A (1983)  
A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods* 65: 109-121
56. David A, Kacher Y, Specks U, Aviram I (2003)  
Interaction of proteinase 3 with CD1 1b/CD1 8 (beta2 integrin) on the cell membrane of human neutrophils. *L Leukoc Biol* 74: 551-557
57. De Fougères AR, Springer TA (1992)  
Intercellular adhesion molecule-3, a third adhesion counter receptor for lymphocyte function-associated molecule-1 on resting lymphocytes. *J Exp Med* 175: 185-190
58. Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, Rival Y, Ruco L, Lampugnani MG, Dejana E. (1996)  
Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol* 135: 497-510
59. Delyani JA, Murohara T, Lefer AM (1996)  
Novel recombinant serpin, LEX-032, attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *Am J Physiol* 270: 881-887
60. Doerschuk CM (2001)  
Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs  
*Microcirculation* 2001: 71-88
61. Downey GP, Worthen GS, Heson PM, Hyde DM (1993)

## Literatur

---

- Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Capillary location and migration across the interalveolar septum. *Am Rev Respir Dis* 147: 168-176
62. Dreckhahn D, Ness W (1997)  
The endothelial contractile cytoskeleton. In: *Vascular endothelium: Physiology, pathology, and therapeutic opportunities*. Editors: Born GVR., Schwartz CV, Schattaer FK, Stuttgart, Germany; 1-26
63. Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Cazabon S, Strosberg AD, Couraud PO (1994)  
Intercellular adhesion molecule 1 activation induces tyrosine phosphorylation of the cytoskeleton-associated protein cortactin in brain microvessel endothelial cell. *J Biol Chem* 269: 12536-12540
64. Ehrlich P, Lazarus A, Myers W, Woodhead GS (1900). *Histology of the blood, normal and pathological*. Cambridge: The University Press.
65. Ehrlich P (1879)  
Über die spezifischen Granulationen des Blutes. *Archiv für Anatomie und Physiologie. Supplementum*. Leipzig
66. el Sayed SO, Dyson M (1993)  
Responses of dermal mast cells to injury. *J Anat* 182: 369-376
67. Enomoto T (1996)  
Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions  
Cultured cell: possible involvement of the Rho signal cascade. *Cell Struc Func* 21: 317-326
68. Eppihimer MJ and Granger DN (1997)  
Ischemia/reperfusion-induced leukocyte endothelial interactions in postcapillary venules. *Shock* 8: 16-25
69. Eriksson E, Boykin JV, Pittman RN (1980)  
Method for in vivo microscopy of the cutaneous microcirculation of the hairless mouse ear. *Microvasc Res*: 19:374-379
70. Eriksson S (1989)  
Alpha1-antitrypsin deficiency: lessons learned from the bedside to the gene and back again: historic perspectives. *Chest* 95: 181-189
71. Ezekowitz RA, Sim RB, MacPherson GG, Gordon S (1985)  
Interaction of human monocytes, macrophages, and polymorphonuclear leukocytes with zymosan in vitro: role of type 3 complement receptors and macrophage-derived complement. *J Clin Invest* 76: 2368-2376
72. Ezekowitz RA, Sim RB, Hill M, Gordon S (1984)  
Local opsonization by secreted macrophage complement components: role of receptors for complement in uptake of zymosan. *J Exp Med* 159: 244-260
73. Faurschou M, Borregarrd N (2003)  
Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Mikobes Infect* 5: 17-1327
74. Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM (1998)  
Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med* 187: 903-915
75. Franzoso G, Biswas P, Poli G, Carlson LM, Brown KD, Tomita Yamaguchi M, Fauci AS, Siebenlist UK (1994)  
A family of serine proteases expressed exclusively in myelo- and monocytic cells specifically processes the nuclear factor-kappa B subunit p65 in vitro and may impair human immunodeficiency virus replication in these cells. *J Exp Med* 180: 1445-1456

## Literatur

---

76. Fröhlich LO (1999)  
Proteinase-3/Elastase-2-defiziente Mäuse als Modell zur funktionellen Charakterisierung der beiden inflammatorischen Serinproteasen aus neutrophilen Granulozyten. Dissertation Universität Salzburg.
77. Furie MB, Naprstek BL, Silverstein SC (1987)  
Migration of neutrophils across monolayers of cultured microvascular endothelial cells. An in vitro model of leucocyte extravasation. *J Cell Sci* 88: 161-175
78. Gabor M (2003)  
Models of acute inflammation in the ear. *Methods Mol Biol* 225: 129-137
79. Gardinger EE, De Luca M, McNally T, Michelson AD, Andrews RK, Berndt MC (2001)  
Regulation of P-Selektin glycoprotein ligand-1 by neutrophil elastase and cathepsin G. *Blood* 98: 1440-1447
80. Garwicz D, Lindmark A, Hellmark T, Gladh M, Jögi J, Gullberg U (1997)  
Characterization of the processing and granular targeting of human proteinase 3 after transfection to the rat RBL or the murine 32D leukemic cell lines. *J Leukoc Biol* 61: 113-123
81. Gawlowski DM, Harding NR, Granger HJ (1989)  
Leukozyte phagocytosis and alterations in microvascular integrity elicited by FITC-Dextran 150 and epiillumination in the microcirculation of the hamster cheek pouch. *Microvasc Res* 37: 1-15
82. Gear ARL (1974)  
Rhodamine 6G: a potent inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 249: 3628-3637
83. Gorlin, RJ, Sedano H, Anderson V E (1964)  
The syndrome of palmar-plantar hyperkeratosis and premature periodontal destruction of the teeth: a clinical and genetic analysis of the Papillon-Lefèvre syndrome. *J Pediatr* 65: 895-908
84. Granger DN, Kubes P (1994)  
The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 55: 662-675
85. Gullberg U, Andersson E, Garwicz D, Lindmark A, Olsson I (1997)  
Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development. *Eur J Haematol* 58: 137-153
86. Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A (1988)  
The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial Junctional complex. *J Cell Biol* 107: 1575-1587
87. Han CK, Son MJ, Chang HW, Chi YS, Park H, Kim HP (2005)  
Inhibition of prostaglandin production by a structurally-optimized flavonoid derivative, 2',4',7-trimethoxyflavone and cellular action mechanism. *Biol Pharm Bull* 28: 1366-1370
88. Hanlon WA, Stolk J, Davies P, Humes JL, Mumford R, Bonney RJ (1991)  
rTNF alpha facilitates human polymorphonuclear leukocytes adherence to fibrinogen matrices with mobilization of specific and tertiary but not azurophilic granule markers. *J Leukoc Biol* 50:43-48
89. Harlan JM, Killen PD, Senecal FM, Schwartz BR, Yee EK, Taylor RF, Beatty PG, Price TH, Ochs HD (1985)  
The role of neutrophil membrane glycoprotein gp 150 in neutrophil adherence to endothelium in vitro. *Blood* 66: 167-178
90. Harris AG, Hecht R, Peer F, Nolte D, Messmer K (1997)  
An improved intravital microscopy system. *Int J Microcirc Clin Exp* 17: 322-327

## Literatur

---

91. Hart TC, Shapira L (1994)  
Papillon-Lefèvre syndrome. *Periodontol* 2000 6: 88-100
92. Heller T, Gessner JE, Schmidt RE, Klos A, Bautsch W, Kohl J (1999)  
Cutting edge: Fc receptor type I for IgG on macrophages and complement mediate the inflammatory response in immune complex peritonitis. *J Immunol* 162: 5657-5661
93. Hermant B, Bibert S, Concord E, Dublet B, Weidenhaupt M, Vernet T, Gulino-Debrac D (2003)  
Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J Biol Chem* 278: 14002-14012
94. Herrmann KS (1983)  
Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res* 26: 238-249
95. Heymann MA, Payne BD, Hoffmann JI, Rudolph AM (1977)  
Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog Cardiovasc Dis* 20: 55-79
96. Hide I (2003)  
[Mechanism of production and release of tumor necrosis factor implicated in inflammatory diseases] *Nippon Yakurigaku Zasshi* 121:163-173.
97. Hinsberb van VWM, Nieuw Amerongen van, GP, Draijer R (1997)  
Regulation of the permeability of human endothelial cell monolayers. The endothelial contractile cytoskeleton. In: *Vascular endothelium: Physiology, pathology, and therapeutic opportunities*. Editors: Born GVR., Schwartz CV, Schattauer FK, Stuttgart, Germany; 61-76
98. Hippenstiel S, Tannert-Otto S, Vollrath N, Krüll M, Just I, Aktories K, von Eichel-Streiber C, Suttorp N (1997)  
Glycosylation of small GTP-binding Rho proteins disrupts endothelial barrier function. *Am J Physiol* 272: 38-43
99. Hoffmann JI, Heymann MA, Rudolph AM, Payne BD (1977)  
Uses and abuses of the radioactive microsphere method of measuring regional blood flow. *Bibl Anat* 15:20-23
100. Hopken UE, Lu B, Gerard NP, Gerard C (1997)  
Impaired inflammatory response in the reverse passive arthus reaction through genetic depletion of the C5a receptor. *J Exp Med* 186: 749-756
101. Horwitz M, Benson KF, Person RE, Aprikyan AG, Dale DC (1999)  
Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21 -day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nature Genet* 23: 433-436
102. Huber AR, Weiss SJ (1989)  
Disruption of the subendothelial basement membrane during neutrophil diapedesis in an in vitro construct of a blood vessel wall. *J Clin Invest* 83: 1122 -1136
103. Intaglietta M, Silverman NR, Tompkins WR (1975)  
Capillary flow velocity measurements in vivo and in situ by television methods. *Microvasc Res* 10:165-179
104. Intaglietta M, Tompkins WR (1973)  
Microvascular measurements by video image shearing and splitting. *Microvasc Res* 5:309-312
105. Intaglietta M, Tompkins WR, Richardson D (1970)  
Velocity measurements in the microvasculature of the cat omentum by on-line method. *Microvasc Res* 34: 363-379
106. Ishihara K, Yamaguchi Y, Uchino S, Furuhashi T, Yamada S, Kihara S, Mori K, Ogawa M (2006)



## Literatur

---

- ICAM-1 signal transduction in cells stimulated with neutrophil elastase. *Dig Dis Sci* 51: 2102-2112
107. Janoff A (1985)  
Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease Hypothesis. *Am Rev Respir Dis* 132: 417-433
108. Janssen GH, Tangelder GJ, Egbrink MG, Reneman RS (1997a)  
Spontaneous leukocyte rolling in venules in untraumatized skin of conscious and anesthetized animals  
*Am J Physiol Heart Circ* 267:1199-1204
109. Janssen GH, Tangelder GJ, oude Egbrink MG, Reneman RS (1997b)  
Different effects of anesthetics on spontaneous leukocyte rolling in rat skin.  
*Int J Microcirc Clin Exp* 17: 305-313
110. Jenne DE, Fröhlich L, Hummel AM, Specks U (1997)  
Cloning and functional expression of the murine homologue of proteinase 3: implications for the design of murine models of vasculitis. *FEBS Lett* 408:187-190
111. Jenne DE (1994)  
Structure of the azurocidin, proteinase 3, and elastase genes. Implications for inflammation and vaskulitis. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 147-154
112. Jenne DE, Tschopp J (1988)  
Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytolytic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation. *Immunol Rev* 103: 53-71
113. Jochum M, Gippner-Steppert C, Machleidt W, Fritz H (1994)  
The role of phagocyte proteinases and proteinase inhibitors in multiple organ failure.  
*Am J Respir Crit Care Med* 150: 123-130
114. Johnson PC (1967)  
Measurement of microvascular dimensions in vivo. *J Appl Physiol* 23:593-596
115. Johnson-Leger C, Aurrand-Lions M, Imhof BA (2000)  
The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J Cell Sci* 113: 921-933
116. Jones TW (1852)  
Discovery that the veins of the bat's wing (which are furnished with valves) are endowed with rhythmical contractility and onward flow of blood is accelerated by each contraction.  
*Philos Trans R Soc London* 142:131-136
117. Kao RC, Wehner NG, Skubitz KM, Gray BH, Hoidal JR (1988)  
Proteinase 3: A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J Clin Invest* 82: 1963-1973
118. Kawabata K, Hagi T, Matsuoka S (2002)  
The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *Eur J Pharmacol* 451: 1-10
119. Kessenbrock K, Fröhlich L, Lämmermann T, Bateman A, Fässler R, Ollert M, Sixt M, Jenne D (submitted to print)  
Preliminary title: Proteinase-3 and neutrophil elastase enhance neutrophil dependent inflammation by inactivating anti-inflammatory progranulin.
120. Kieda C, Paprocka M, Krawczyński A, Zalecki P, Dupuis P, Monsigny M, Radzikowski C Dus D (2002)  
New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes.  
*Endothelium* 9: 247-261
121. Klyszcz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H (1997)  
Cap Image-ein neuartiges computergestütztes Videobildanalyse-system für die dynamische Kapillarmikroskopie. *Biomed Technik* 42: 168-175

## Literatur

---

122. Kolodney MS, Elson EL (1995)  
Contraction due to microtubule disruption is associated with increased phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10252-10256
123. Kondo S, Sauder DN (1997)  
Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF-alpha-induced skin inflammation. *Eur J Immunol* 27: 1713-1718
124. Korkmaz B, Attucci S, Jourdan ML, Juliano L, Gauthier F (2005)  
Inhibition of neutrophil elastase Alpha1-protease inhibitor at the surface of human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 175: 3329-3338
125. Kostoulas G, Hörler D, Naggi A, Casu B, Baici A (1997)  
Electrostatic interactions between human leukocyte elastase and sulfated glycosaminoglycans: physiological implications. *Biol Chem* 378: 1481-1489
126. Kuijpers TW, Tool ATJ, van der Schoot CE, Ginsel LA, Onderwater JJM, Roos D, Verhoeven AJ (1991)  
Membrane Surface Expression on Neutrophils: A Reappraisal of the Use of surface markers for neutrophil activation. *Blood* 78:1105-1111
127. Lagasse E, Weissman IL (1996)  
Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods* 197: 139-150
128. Lampugnani MG, Dejana E (1997)  
Interendothelial junctions: structure, signaling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol* 9: 674-682
129. Lange-Asschenfeldt B, Weninger W, Velasco P, Kyriakides TR, von Andrian UH, Bornstein P, Detmar M (2002)  
Increased and prolonged inflammation and angiogenesis in delayed-type hypersensitivity reactions elicited in the skin of thrombospondin-2-deficient mice. *Blood* 99:538-545
130. Langer S, Born F, Breidenbach A, Schneider A, Uhl E, Messmer K (2002)  
Effect of C-peptide on wound healing and microcirculation in diabetic mice. *Eur J Med Res* 7: 502-508
131. Laudanna C, Campell JJ, Butcher EC (1996)  
Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 271: 981-983
132. Lee WL, Downey GP (2001)  
Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 896-904
133. Leid RW, Ballieux BE, van der Heijden I, Kleyburg van der Keur C, Hagen EC, van Es LA, van der Woude FJ, Daha MR (1993)  
Cleavage and inactivation of human C1 inhibitor by the human leukocyte proteinase, proteinase 3. *Eur J Immunol* 23: 2939-2944
134. Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ (2001)  
Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 98: 1289-1297
135. Lewinsohn DM, Bargatze RF, Butcher EC (1987)  
Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes and other leukocytes. *J Immunol* 138: 4313-4321

## Literatur

---

136. Ley K, Bullard DC, Arbone ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, Beaudet AL (1995)  
Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 181: 669-675
137. Lindbom L, Werr J (2002)  
Integrin-dependent neutrophil migration in extravascular tissue. *Semin Immunol* 14: 115-121
138. Liou TG, Campbell EJ (1995)  
Nonisotropic enzyme-inhibitor interactions: a novel nonoxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. *Biochemistry* 34: 161-171
139. Liu PB, Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K (1998)  
Microtubule depolymerisation induces stress fibers, focal adhesion and DNA synthesis via GTP-binding protein Rho. *Cell Adhes Commun* 5: 249-255
140. Liu Z, Zhao M, Li N, Diaz LA, Mayadas TN (2006)  
Differential role of beta-2 integrins in experimental autoimmune bullous pemphigoid. *Blood* 107: 1063-1069
141. Liu Z, Shapiro SD, Zhou X, Twining SS, Senior RM, Giudice GJ, Fairley JA, Diaz LA (2000a)  
A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 105: 113-123
142. Liu Z, Zhou X, Shapiro SD, Shipley JM, Twinning SS, Diaz LA, Senior RM, Werb Z (2000b)  
The serpin alpha 1 -proteinases inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell* 102: 647-655
143. Lopez-Boado YS, Espinola M, Bahr S, Belaouaj A (2004)  
Neutrophil serine proteinases cleave bacterial flagellin, abrogating its host response-inducing activity. *J Immunol* 172: 509-515
144. Ludwig RJ, Zollner TM, Santoso S, Hardt K, Gille J, Baatz H, Johann PS, Pfeiffer J, Radeke HH, Schon MP, Kaufmann R, Boehncke WH, Podda M (2005)  
Junctional adhesion molecules (JAM)-B and -C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 125: 969-976
145. Lutz P G, Moog-Lutz C, Coumau-Gatbois E, Kobari L, Di Gioia Y, Cayre Y E (2000) Myeloblastin is a granulocyte colony-stimulating factor-responsive gene conferring factor-independent growth to hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1601-1606
146. MacIvor DM, Shapiro SD, Pham CT, Belaouaj A, Abraham SN, Ley TJ (1999)  
Normal neutrophil function in cathepsin G-deficient mice. *Blood* 94: 4282-4293
147. Mackerel AJ, Cottell DC, Russell KJ, Fitzgerald MX, O'Connor CM (1999)  
Migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells is not blocked by matrix metalloproteinase or serine protease inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1209-1219
148. Madri JA, Graessner D (2000)  
Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases. *Dev Immunol* 7: 103-116
149. Malpighi M (1661)  
*De Pulmonibus Observationes Anatomicae*: 61-67. Fulton JF., Wilson LG (Eds): Selected readings in the History of Physiology 2. ed 1966
150. Mayrovitz HN (1992)  
Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice. *Am J Physiol* 262: 157-161

## Literatur

---

151. Middelhoven PJ, van Buul JD, Hordijk PL, Roos D (2001)  
Different proteolytic mechanisms involved in FcγRIIIb shedding from human neutrophils  
*Clin Exp Immunol* 125: 169–175
152. Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Mauer M, Hub E, Rot A (1997)  
Transcytosis and surface expression of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91:385-395
153. Miller FN, Sims DE, Schusche DA, Abney DL (1992)  
Differentiation of light-dye effects in the microcirculation. *Microvasc Res* 44: 166-184
154. Moraes TJ (2006)  
Neutrophil granules contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr Opin Hematol* 13: 21-27
155. Moser CM, Jenne D, Pfister H, Ollert M, Krombach F (2004)  
Leukocyte migration in proteinase-3/elastase-2 double mutant mice in vivo. *Journal of Vascular Research* 41: 94-95
156. Murohara T, Guo JP, Lefer AM (1995)  
Cardioprotection by a novel recombinant serine protease inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 1246–1253
157. Newman PJ (1999)  
Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J Clin Invest* 103: 5-9
158. Nolte D, Schmid P, Jäger U, Botzlar A, Roesken F, Hecht R, Uhl E, Messmer K, Vestweber D (1994)  
Leucocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-Selectin. *Am J Physiol* 36: 1637-1642
159. Ohnishi M, Imanishi N (2000)  
Role of P-selectin in the migration of neutrophils to chemoattractant induced cutaneous inflammation.  
*Inflammation* 24: 583-593
160. Oliveira de Melo J, da Conceicao Torrado Truiti M, Muscara MN, Bolonheis SM, Dantas JA, Caparroz-Assef SM, Cuman RK, Bersani-Amado CA (2006)  
Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves.  
*Biol Pharm Bull* Nov 29: 2241-2255
161. Owen CA, Campbell EJ (1999a)  
The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol* 65: 137-150
162. Owen CA, Campbell EJ (1999b)  
Extracellular proteolysis: new paradigms for an old paradox. *J Lab Clin Med* 143: 341-351
163. Owen CA, Campbell EJ (1998)  
Angiotensinogen II generation at the cell surface of activated neutrophils: novel cathepsin G-mediated catalytic activity that is resistant to inhibition. *J Immunol* 160: 1436-1443
164. Padrines M, Wolf M, Walz A, Baggiolini M (1994)  
Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS Lett* 352: 231-235
165. Pendergraft WF, Yang JJ, Tuttle R, Segelmark M, Jennette JC, Falk RJ, Preston GA (1998)  
ANCA antigens, proteinase 3 and myeloperoxidase, are not expressed in endothelial cells.  
*Clin Exp Immunol* 112: 1981-1990
166. Peterson MW, Stone P, Shasby DM (1987)  
Cationic neutrophil proteins increase transendothelial albumin movement.  
*J Appl Physiol* 62: 1521-1530

## Literatur

---

167. Pfister H, Ollert M, Froehlich LF, Quintanilla-Martinez L, Colby TV, Specks U, Jenne DE (2004) Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener's Autoantigen) are pathogenic in vivo. *Blood* 104: 1411-1418
168. Pfister H (2002) Wegener'sche Granulomatose: Untersuchungen zur Rolle zytoplasmatischer Neutrophilen-Autoantikörper und deren Zielantigen Proteinase 3 sowie Neutrophilen-Elastase bei Entzündungsprozessen in der Maus. Dissertation München
169. Pham CT (2006) Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol* 6: 541-550
170. Pham CT, Ivanovich JL, Raptis SZ, Zehnbauser B, Ley TJ (2004) Papillon-Lefevre syndrome: correlating the molecular, cellular, and clinical consequences of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I deficiency in humans. *J Immunol* 173: 7277-7281
171. Powers, JC Tanaka T, Harper JW, Menematsu Y, Barker L, Lincoln D, Crumley KV, Fraki JE, Schechter NM, Lazarus GG et al. (1985) Mammalian chymotrypsin-like enzymes. Comparative reactivities of rat mast cell proteases, human and dog skin chymases and human cathepsin G with 4-nitroanilide substrates and with peptide chloromethyl ketone and sulfonyl fluoride inhibitors. *Biochemistry* 24: 2048-2058
172. Rabinet MJ, Plantier JL, Rival Y, Lampugnani MG, Dejana E (1996) Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 488-496
173. Rao J, Zhang F, Donnelly RJ, Spector NL, Studzinski GP (1998) Truncation of Sp1 transcription factor by myeloblastin in undifferentiated HL60 cells. *J Cell Physiol* 175: 121-128
174. Rao NV, Rao GV, Marshall, BC, Hoidal J R (1996) Biosynthesis and processing of proteinase 3 in U937 cells. Processing pathways are distinct from those of Cathepsin G. *J Biol Chem* 271: 2972-2978
175. Rao NV, Wehner NG, Marshall BC, Gray WR, Gray BH, Hoidal JR (1991) Characterization of proteinase-3 (Pr3), a neutrophil serin protease. Structural and functional properties. *J Biol Chem* 266: 9549-9548
176. Raptis SZ, Pham CT (2005) Neutrophil-derived serine proteases in immune complex-mediated diseases. *Immunol Res* 32: 211-215
177. Ravetch JV (2002) A full complement of receptors in immune complex disease. *J Clin Invest* 110:1759-1761
178. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bosover S, Gabella G, Potma E, Warley A, Roes J, Segal AW (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases with activity on platelets. *Nature* 416: 291-297
179. Renesto P, Si-Tahar M, Moniatte M, Balloy V, van Dorsselaer A, Pidard D, Chignard M (1997) Specific inhibition of thrombin induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. *Blood* 89: 1944-1953
180. Renesto P, Halbwachs-Mecarelli L, Nusbaum P, Lesavre P, Chignard M (1994) Proteinase 3: A neutrophil proteinase with activity on platelets. *J Immunol* 152: 4612-4617

## Literatur

---

181. Rice WG, Weiss SJ (1990)  
Regulation of proteolysis at the neutrophil-substrate interface by secretory leukoproteinase inhibitor. *Science* 249: 178-181
182. Rival Y, Del Maschio A, Rabiet MJ, Dejana E, Duperray A (1996)  
Inhibition of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 synthesis and leukocyte transmigration in endothelial cells by the combined action of TNF-alpha and IFN-gamma. *J Immunol* 157: 1233-1241
183. Robache-Gallea S, Morand V, Bruneau JM, Schoot B, Tagat E., Èalo E, Chouaib S, Roman-Roman S (1995)  
In vitro processing of human tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 270: 23688-23692
184. Robledo O, Papaioannou A, Ochietti B, Beauchemin C, Legault D, Cantin A, King PD, Daniel C, Alakhov VY, Potworowski EF, St-Pierre Y (2003)  
ICAM-1 isoforms: specific activity and sensitivity to cleavage by leukocyte elastase and cathepsin G. *Eur J Immunol* 33:1351-60
185. Rosengren S, Arfors KE (1990)  
Neutrophil-mediated vascular leakage is not suppressed by leukocyte elastase inhibitors. *Am J Physiol* 259: 1288-1294
186. Rösken F, Koschnick M, Menger MD, Mutschler WE, Palua N, Hanselmann RG (1999)  
Lack of p53 impairs wound healing. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 115: 467-468
187. Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare C, Arfors KE, Tuma RF (1997)  
Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45: 505-513
188. Sambrano GR, Huang W, Faruqi T, Mahrus S, Craik C, Coughlin SR (2000)  
Cathesin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J Biol Chem* 275: 6819-6823
189. Sandison JC (1928)  
The transparent chamber of the rabbit's ear, giving a complete description of improved technique of construction and introduction, and general account of growth and behavior of living cells and tissue as seen with the microscope. *Am J Anat* 41: 415-424
190. Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA (2002)  
CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol* 3: 143-150
191. Schnittler HJ, Wilke A, Gress T, Suttorp N, Dreckhahn D (1990)  
Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and Human vascular endothelium. *J Physiol* 431: 379-401
192. Scholz M, Wimmer-Greinecker G, Simon A, Dzemali O, Chang HY, Kleine P, Maheis G, Moritz A (2003)  
Perioperative elastase activity in cardiac surgery and its role in endothelial leakage. *Inflamm Res* 52: 433-438
193. Schröder U, Arfors KE, Tangen O (1976)  
Stability of fluorescein labeled dextran in vivo and in vitro. *Microvasc Res* 11: 33-39
194. Sengelov H, Kjeldsen L, Borregaard N (1993)  
Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol* 150: 1535-1543
195. Shasby DM (2007)  
Cell-Cell adhesion in lung endothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: 593-607
196. Shushakova N, Eden G, Dangers M, Zwirner J, Menne J, Gueler F, Luft FC, Haller H, Dumler I

## Literatur

---

- (2005)  
The urokinase/urokinase receptor system mediates the IgG immune complex-induced inflammation in lung. *J Immunol* 175:4060-4068
197. Shushakova N, Skokowa J, Schulman J, Baumann U, Zwirner J, Schmidt RE, Gessner JEJ (2002)  
C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγR3s in immune complex-induced lung disease. *Clin Invest* 110: 1823-1830
198. Smedly LA, Tonnesen Mg, Sandhaus RA, Haslett C, Guthrie LA, Johnses RB jr, Henson PM, Worthen GS (1986)  
Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J Clin Invest* 77: 1233-1243
199. Spector N L, Hardy L, Ryan C, Miller W H, Humes J L, Nadler L M, Luedke E (1995)  
28-kDa mammalian heat shock protein, a novel substrate of a growth regulatory protease involved in differentiation of human leukemia cells. *J Biol Chem* 270: 1003-1006
200. Springer TA (1995)  
Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol* 57: 827-872
201. Springer TA (1994)  
Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep Paradigm. *Cell* 76: 301-314
202. Steadman RP, St John L, Evans RA, Thomas GJ, Davies M, Heck LW, Abrahamson DR (1997)  
Human neutrophils do not degrade major basement membrane components during chemotactic migration. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 993-1004
203. Steil AA, Teixeira CF, Jancar S (1999)  
Platelet-activating factor and eicosanoids are mediators of local and systemic changes induced by immune-complexes in mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 57: 35-48
204. Suttorp N (1994)  
Modulation of endothelial permeability by cytoskeletal alterations and inhibition of Specific phosphodiesterase-isoenzymes. *Intern Soc Heart Res*: 95-102
205. Suttorp N, Nolte A, Wilke A, Drenckhahn D (1993)  
Human neutrophil elastase increases permeability of cultured pulmonary endothelial. Cell monolayers *Int J Microlayers* 13: 187-203
206. Suttorp N, Polley M, Seybold J, Schnittler, HJ, Seeger W, Grimminer F, Aktories K (1991)  
Adenosine diphosphate-ribosylation of G-Actin by botulinum C2 toxin increases endothelial permeability in vitro. *J. Clin. Invest.* 87: 1575-1584.
207. Suttorp N (1988)  
Zellbiologische Untersuchungen zur Pathogenese des akuten Atemwegssyndrom des Erwachsenen (ARDS). Habilitationsschrift, Gießen
208. Suttorp N, Simon LM (1982)  
Enhancement of polymorphnuclear leukocyte-mediated cytotoxicity in lung cells exposed to sustained in vitro hyperoxia. *J Clin Invest* 70: 342-350
209. Szalai AJ, Digerness SB, Agrawal A, Kearney JF, Bucy RP, Niwas S, Kilpatrick JM, Babu YS, Volanakis JE (2000)  
The Arthus reaction in rodents: species-specific requirement of complement. *J Immunol* 164: 463-468
210. Szczesny G, Veihelmann A, Massberg S, Nolte D, Messmer K (2004)  
Long-term anaesthesia using inhalatory isoflurane in different strains of mice-the haemodynamic

## Literatur

---

- effects. *Lab Anim* 38: 64-69
211. Takahashi H, Nukiwa T, Yoshimura K, Quick CD, States DJ, Holmes MD, Whang-Peng J, Knutsen T, Crystal RG (1988)  
Structure of the human neutrophil elastase gene. *J Biol Chem* 263:14739-14747
212. Tanaka T, Minematsu Y, Reilly CF, Travis J, Powers JC (1985)  
Human leukocyte cathepsin G. Subsite mapping with 4-nitroanilides, chemical modification and effect of possible cofactors. *Biochemistry* 24: 2040-2047
213. Tkalcovic J, Novelli M, Phylactides M, Iredale JP, Segal AW, Roes J (2000)  
Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* 12: 201-210
214. Toda Y, Takahashi T, Maeshima K, Shimizu H, Inoue K, Morimatsu H, Omori E, Takeuchi M, Akagi R, Morita K (2007)  
A neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, ameliorates lung injury after hemorrhagic shock in rats. *Int J Mol Med* 19: 237-243
215. Toda Y, Takahashi T, Maeshima K, Shimizu H, Inoue K, Morimatsu H, Omori E, Takeuchi M, Akagi R, Morita K. (2006)  
ICAM-1 signal transduction in cells stimulated with neutrophil elastase. *Dig Dis Sci* 51: 2102-2112
216. Travis J, Salcesen GS (1983)  
Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem* 52: 655-709
217. Tubaro A, Dri P, Delbello G, Zilli C, Della Loggia R (1986)  
The croton ear test revisited. *Agents Actions* 17: 347-349
218. Turkington PT (1992)  
Cathepsin G, a regulator of human vitamin K, dependent clotting factors and inhibitors. *Thromb Res* 67: 147-155
219. Ueki H, Masuda T (1982)  
Immune complex and cutaneous diseases. *J Dermatol* 9: 255-264
220. Van Kooyk Y, Figdor CG (2000)  
Avidity regulation of integrins: the driving force on leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 12: 542-547
221. Van Kooyk Y, van de Weil, van Kemenade P, Weder P, Kuijpers TW, Figdor CG (1989)  
Enhancement of LFA-1 mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T-Lymphocytes. *Nature* 342: 811-813
222. van Mirre E, Breunis WB, Geissler J, Hack CE, de Boer M, Roos D, Kuijpers TW (2006)  
Neutrophil responsiveness to IgG, as determined by fixed ratios of mRNA levels for activating and inhibitory FcγRII (CD32), is stable over time and unaffected by cytokines. *Blood* 108:584-590
223. Vaporciyan AA, DeLisser HM, Yan HC, Mendiguren II, Thom SR, Jones ML, Ward PA, and Albelda SM (1993)  
Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* 262: 1580-1582
224. Vender RL (1996)  
Therapeutic potential of neutrophil-elastase inhibition in pulmonary disease. *J Investig Med* 44: 531-539
225. Vestweber D (2002)  
Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Curr Opin Cell Biol* 14: 587-593



## Literatur

---

226. Vestweber D (2000)  
Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol* 190: 281-292
227. Vestweber D, Blanks JE (1999)  
Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 79:181-213
228. Vogt W (2000)  
Cleavage of the fifth component of complement and generation of a functionally active C5b6-like complex by human leukocyte elastase.  
*Immunobiology* 201:470-477
229. von Rossum AP, Limburg PC, Kallenberg CG (2003)  
Membrane proteinase 3 expression on resting neutrophils as a pathogenic factor in PR3-ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Rheumatol* 21: 64-68
230. Wang Y, Kristan J, Hao L, Lenkoski CS, Shen Y, Matis LA (2000)  
A role for complement in antibody-mediated inflammation: C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* 164: 4340-4347
231. Ward PA, Marks RM (1989)  
The acute inflammatory reaction. *Curr Opin Immunol* 2: 5-9
232. Watson SR, Fennie C, Lasky LA (1991)  
Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimera. *Nature* 349: 164-167
233. Watson WC, Brown PS, Pitcock JA, Townes AS (1987)  
Passive transfer studies with type II collagen antibody in B10.D2/old and new line and C57Bl/6 normal and beige (Chediak-Higashi) strains: evidence of important roles for C5 and multiple inflammatory cell types in the development of erosive arthritis. *Arthritis Rheum* 30: 460-465
234. Weber U (1998)  
Die Rolle verschiedener Phosphodiesterase-Isoenzyme für die Regulation der endothelialen Permeabilität. *Dissertationsschrift Giessen*
235. Weninger W, Ulfman LH, Cheng G, Souchkova N, Quackenbush EJ, Lowe JB, von Andrian UH (2000)  
Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels. *Immunity* 12: 665-676
236. Westermann J, Papst R (1996)  
How organ-specific is the migration of 'native' and memory T cells? *Immunology Today* 17: 278-282
237. Wiedow O, Meyer-Hoffert U (2005)  
Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signaling during inflammation. *J Internal Med* 257: 319-328
238. Wilmer JL, Bureson FG, Kayama F, Kanno J, Luster MI (1994)  
Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. *J Invest Dermatol* 102:915-922
239. Witko-Sarsat V, Cramer E M, Hieblot C, Guichard J, Nusbaum P, Lopez S, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L (1999a)  
Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. *Blood* 94: 2487-2496

## Literatur

---

240. Witko-Sarsat V, Lesavre P, Lopez S, Bessou G, Hieblot C, Prum B, Noel L H, Guillevin L, Ravaud P, Sermet-Gaudelus I, Timsit J, Grünfeld J-P, Halbwachs-Mecarelli L (1999b)  
A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. *J Am Soc Nephrol* 10: 1224-1233
241. Woodman RC, Reinhardt PH, Kanwar S, Johnston FL, Kubes P (1993)  
Effects of human neutrophil elastase (HNE) on neutrophil function in vitro and in inflamed microvessels. *Blood* 82: 2188-2195
242. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW (2005)  
ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* 106: 584-592
243. Young RE, Voisin MB, Wang S, Dangerfield J, Nourshargh S (2007)  
Role of neutrophil elastase in LTB(4)-induced neutrophil transmigration in vivo assessed with a specific inhibitor and neutrophil elastase deficient mice. *Br J Pharmacol* 151: 628-37
244. Young RE, Thompson RD, Larbi KY, La M, Roberts CE, Shapiro SD, 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
245. Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K (1989)  
Computer assisted leukocyte velocity measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exo* 8: 293-302
246. Ziegler CG, Krug AW, Zouboulis CC, Bornstein SR (2007)  
Corticotropin releasing hormone and its function in the skin. *Horm Metab Res* 39: 106-109
247. Zimmerman BJ, Granger DN (1990)  
Reperfusion-induced leukocyte infiltration: role of elastase. *Am J Physiol* 259: 390-394
248. Zimmerman GA, Prescott TM, McInyre (1992)  
Endothelial interaction with granulocytes: Tethering and signalling molecules. *Immol Today* 13: 93-100

## 6. Abbildungen

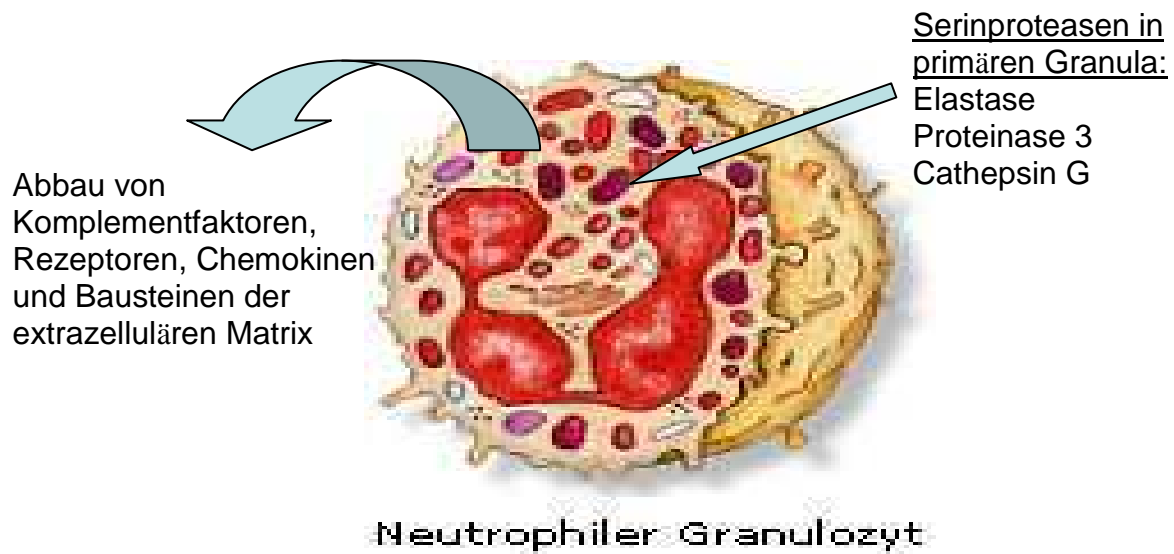


Abb. 1: Nach partieller Aktivierung durch Chemokine exprimieren neutrophile Granulozyten eine kleine Fraktion ihrer gespeicherten Proteasen auf der Zelloberfläche. Hier sind sie, abgeschirmt von Antiproteasen, in der Lage ihren biologischen Funktionen nachzukommen. [Modifiziert nach <http://www.ilo.at/images/texte/NeutrophilGrb.jpg>]

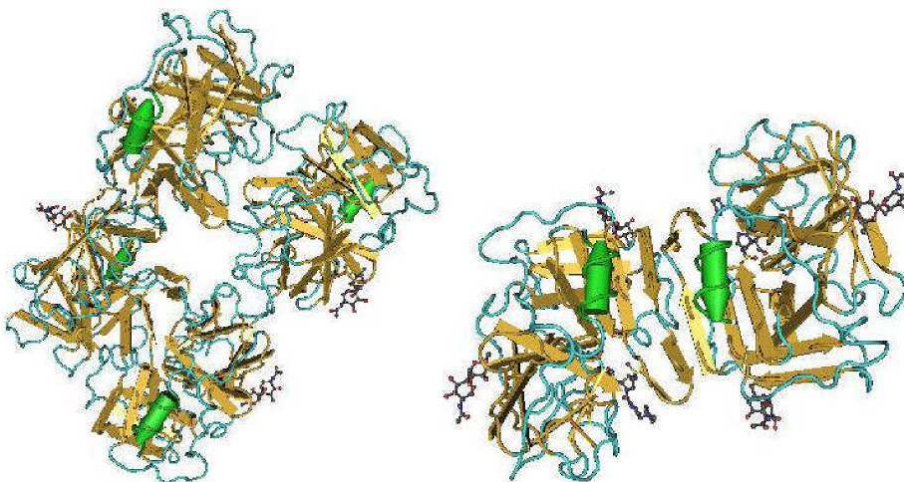


Abb. 2: Dreidimensionale Darstellung von PRTN3 (links) und ELA2 (rechts). Die Abbildungen stammen aus der Strukturdatenbank des Internetportals „Pubmed“.  
[\[http://structure.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?Dopt=s&uid=4574](http://structure.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?Dopt=s&uid=4574) (PRTN3)  
[\[http://structure.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?Dopt=s&uid=20352](http://structure.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?Dopt=s&uid=20352) (ELA2)]

## Abbildungen

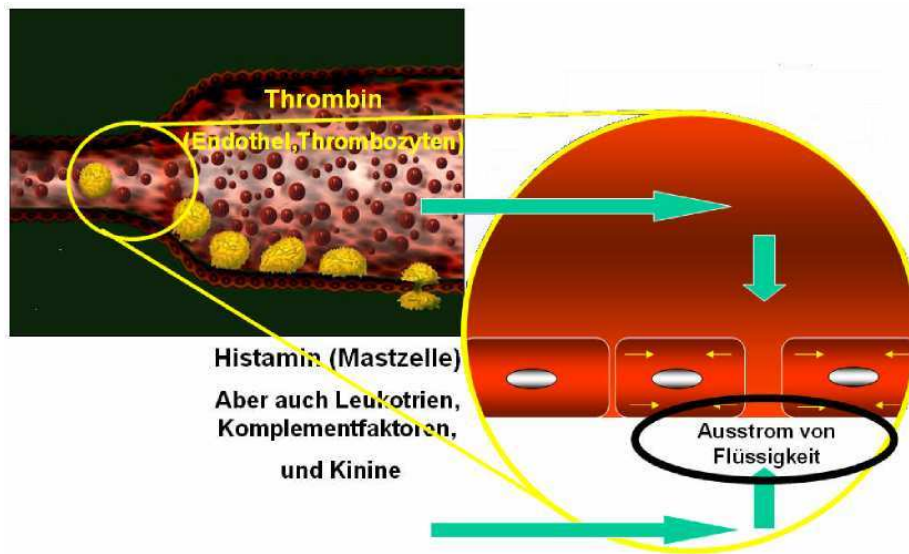


Abb. 3 Histamin und Thrombin bewirkt am Endothel über die Aktivierung von Myosinstrukturen in den Endothelzellen eine Dissoziation von Cadherin-Cadherin-Komplexen in den Endothelzwischenräumen. Dem Austritt von Plasmaproteinen aus den Blutgefäßen folgt der Ausstrom von freier Flüssigkeit

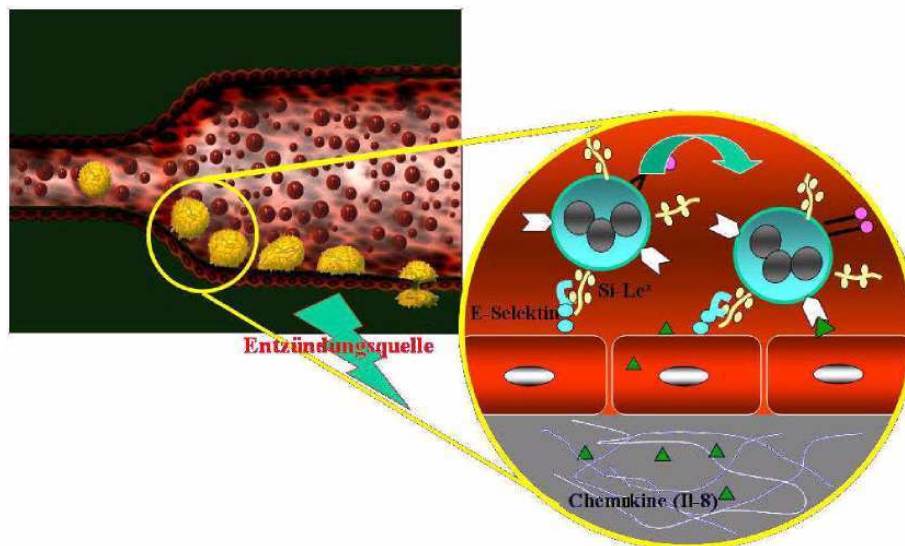


Abb.4: Durch Chemokine aktivierte endotheliale Selektine (E- Selektin) und P - Selektine aus den Weibel-Palade-Bodies der Endothelzellen vermitteln die erste Kontaktaufnahme zwischen fließendem Leukozyten und Endothelzellwand. Als Gegenrezeptor dienen Kohlenhydratverbindungen die sich durch eine gemeinsame Sialyl-LewisX Kohlenhydratstruktur auszeichnen. Typische Vertreter sind GlyCAM-1, ESL-1 und PSGL-1.

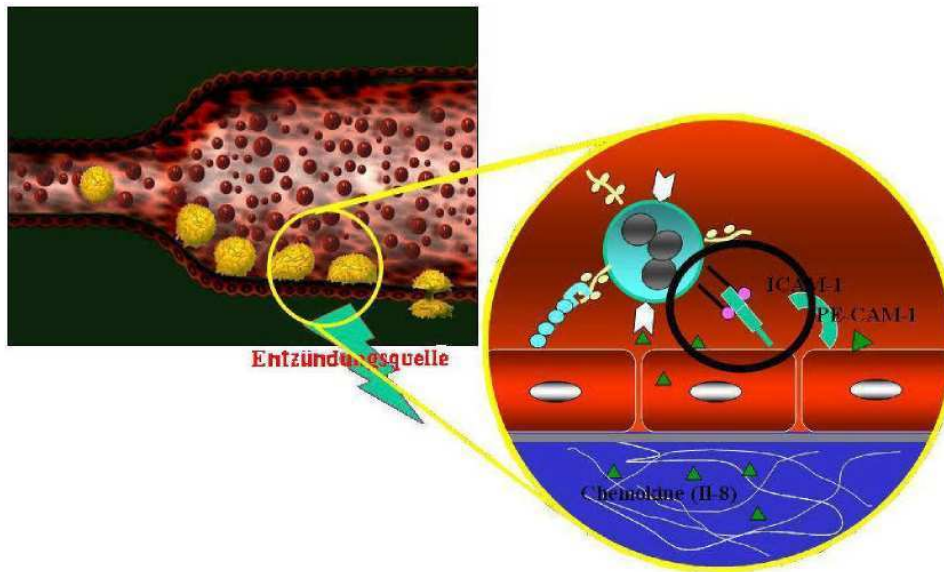


Abb. 5: Von Endothel präsentierte Chemokine wie PAF oder Il-8 aktivieren die noch rollenden neutrophilen Granulozyten über Chemokinrezeptoren zur Aktivierung von Mac- 1 und LFA-1 und Bindung mit endotheliale ICAM-1. Die räumliche Nähe zwischen Leukozyt und Endothelzelle während des „Rolling“ begünstigt diesen Prozess der Adhärenz

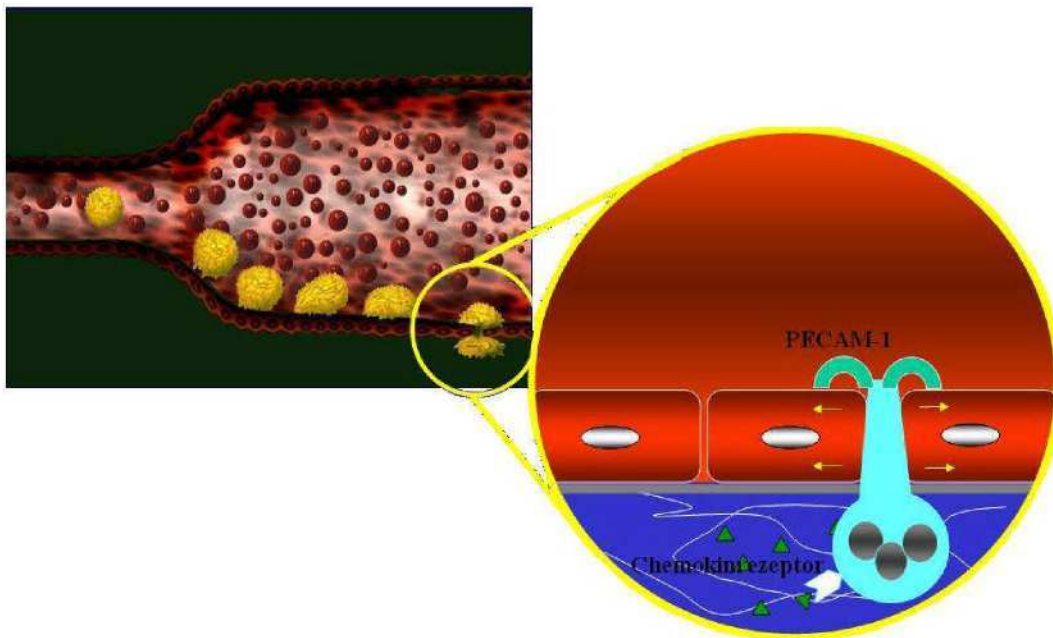


Abb. 6: Durch noch nicht vollständig geklärte Mechanismen kommt es zur Kontraktion von umliegenden Endothelzellen, was die transendotheliale Migration des Leukozyten vereinfacht. PECAM-1 und VCAM-1 konnten als Moleküle identifiziert werden, die an dem Prozess direkt beteiligt sind. Die transendotheliale Migration endet mit der Durchbrechung der Basalmembran. Der Leukozyt bewegt sich nun gelenkt durch den chemischen Gradienten der Chemokine auf die Quelle der Entzündung zu. Die Rolle neutrophilen Serinproteasen in diesem Prozess ist noch nicht vollständig geklärt.

## Abbildungen

---

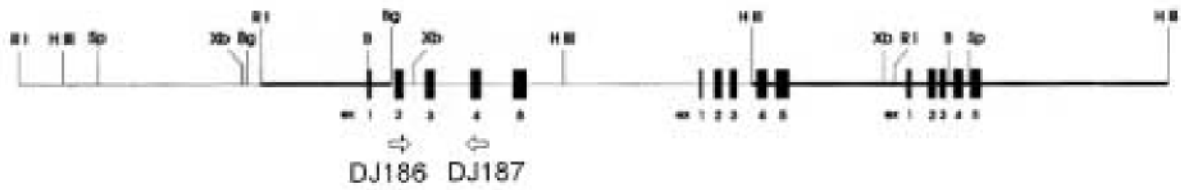


Abb. 7: Schemazeichnung des Genlokus von PRTN3 im Mäusegenom (DJ186-DJ187 [110])

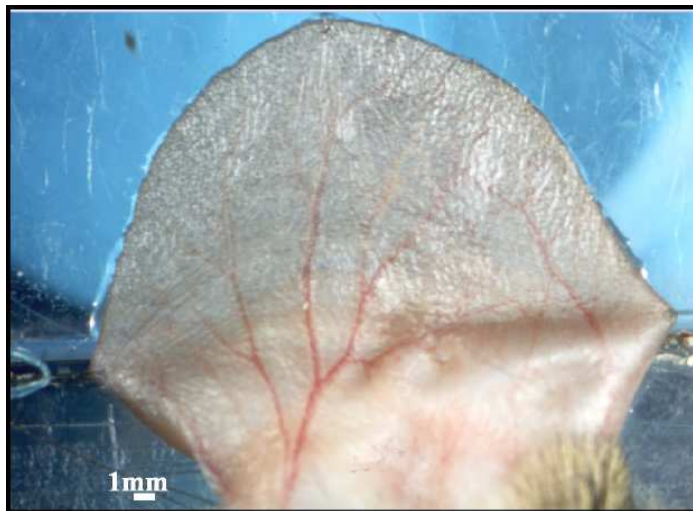


Abb. 8 Ausgespanntes Ohr einer Maus des Hintergrunds C47/B6/SV129. Gut sichtbar sind die drei großen, an der Basis eintretenden Gefäßnervenbündeln, die in der Peripherie durch bogenförmige Arkaden miteinander in Verbindung stehen. Ein Gefäßnervenbündel beinhaltet jeweils eine Arterie (50-60 $\mu$ m), Vene (50-400 $\mu$ m) und einen Nerv zur neurovaskulären Versorgung des Ohrs.

## Abbildungen

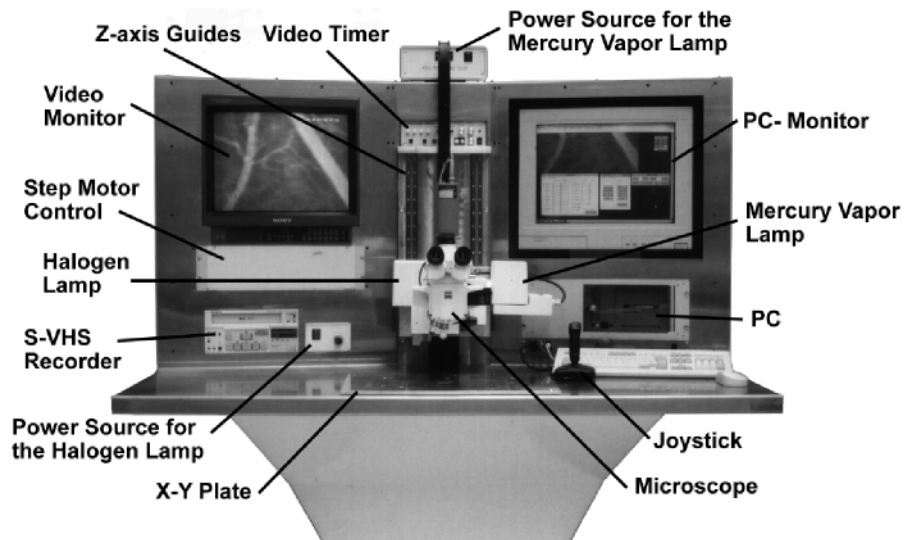


Abb. 9: Intravitalmikroskopische Aufnahmeeinheit bestehend aus Intravitalmikroskop, Kamera, Video- und Computer-Monitor, Joystick, Mikroskopiertisch mit computergesteuertem Schrittmotor [96].

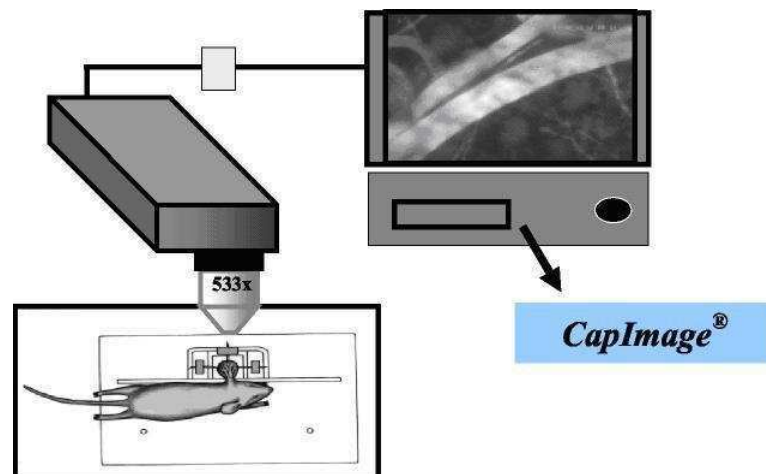


Abb. 10: Schemazeichnung der Anordnung der Aufnahmeeinheit. Die Blutgefäße des Ohrs der auf einer Plexiglasbühne immobilisierten Maus wird über das Mikroskop auf einem Bildschirm dargestellt und zur Datenanalyse dem Auswerteprogramm CapImage® zugeführt.

## Abbildungen

---

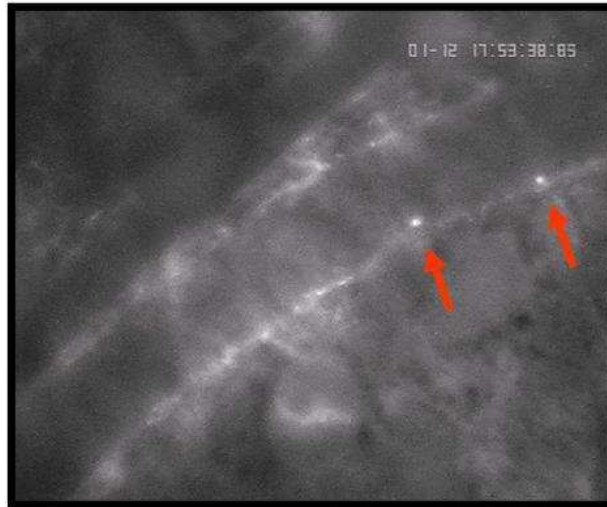


Abb. 11: Rollende Leukozyten bzw. nicht-adhärenente Leukozyten: Es werden die Leukozyten gezählt, die während einer Beobachtungszeit von 60 Sekunden die rote Markierungslinie passieren.  
Adhärenente Leukozyten: Es werden die Leukozyten gezählt, die sich während einer Beobachtungszeit von 30 Sek. nicht von dem gekennzeichneten Gefäßabschnitt aus einer definierten Lage löst.

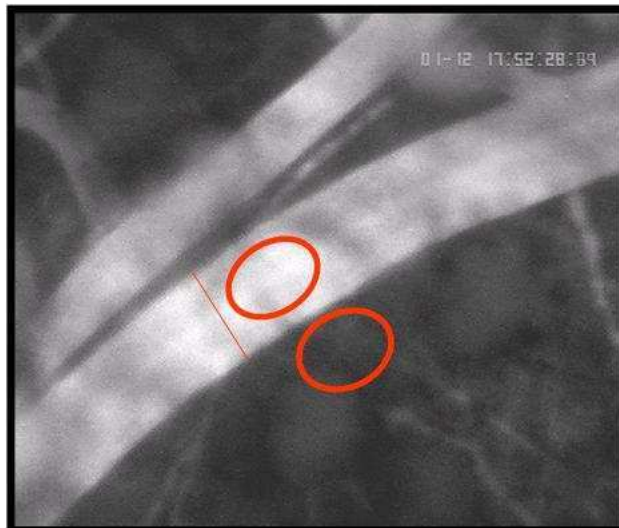


Abb. 12: Extravasation von FITC-Dextran. Mit Hilfe von Cap-Image® wird der Kontrastunterschied zwischen dem mit FITC-Dextran markierten Plasma des Gefäßes und dem Gewebe densitometrisch ermittelt (hier rot dargestellt). Eine Kontraständerung zwischen extra- und intravasalem Raum dient als Parameter für die Permeabilitätsänderung. Aus den beiden unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten wird die Extravasation berechnet.



## Abbildungen

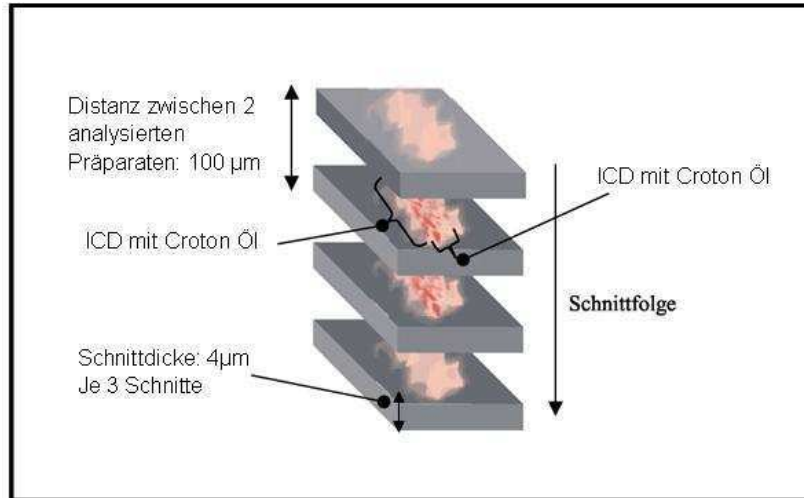


Abb. 13: Schemazeichnung der Schnittfolge zur histologischen Auswertung der Haut im Rahmen der irritativen Kontaktdermatitis

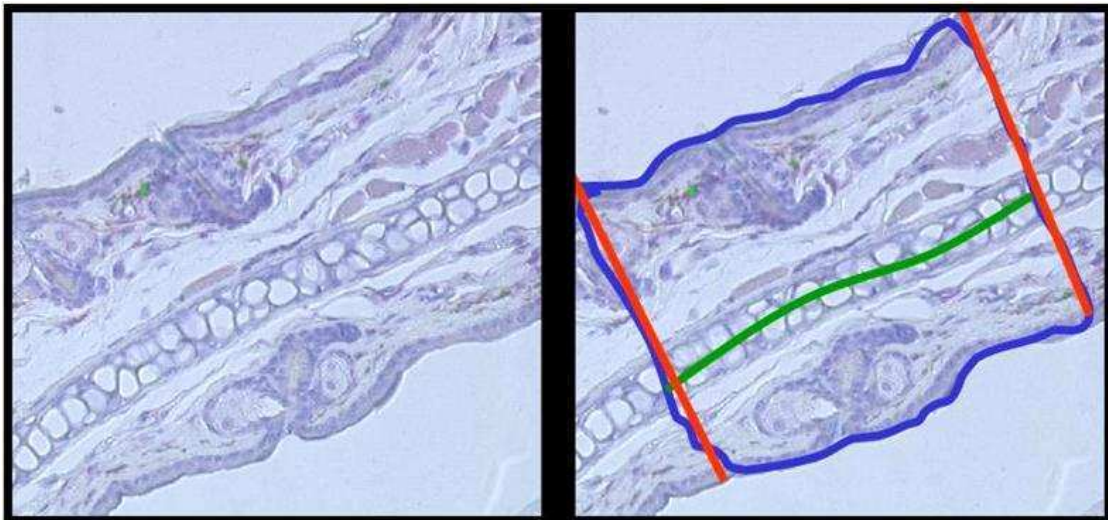


Abb. 14: Linkes Bild zeigt einen digitalisierten histologischen Schnitt des Mäuseohrs. Rechts wurde die Länge am Knorpel (grün) und die Fläche (blau) erfasst.

## Abbildungen

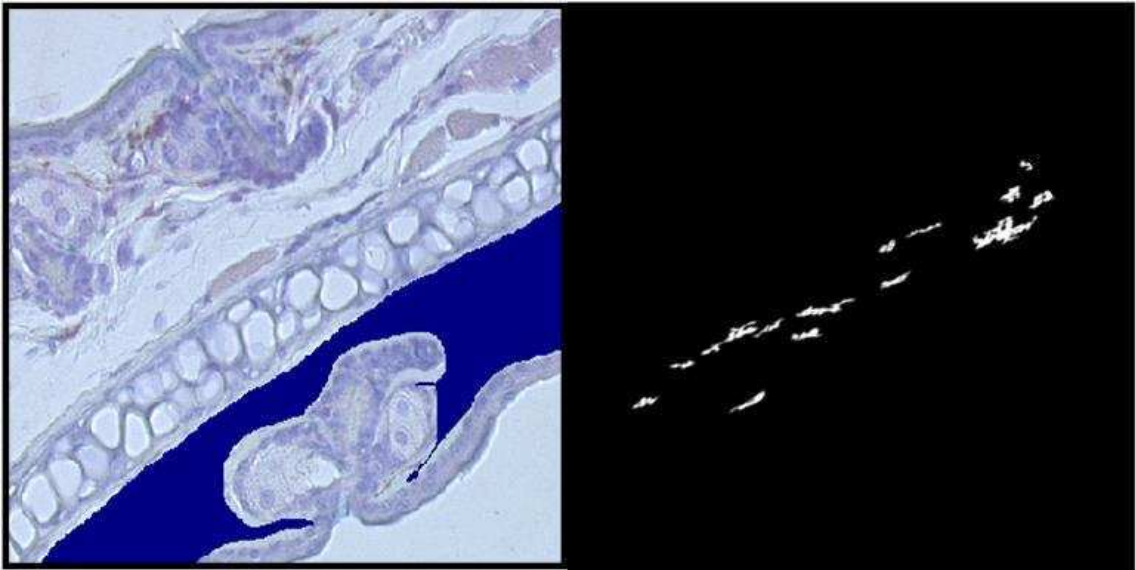


Abb. 15: Im linken Bild ist die zu beobachtende Fläche blau markiert. Das rechte Bild zeigt die gemessenen Bildpunkte des CD-45 Antikörperspektrums.

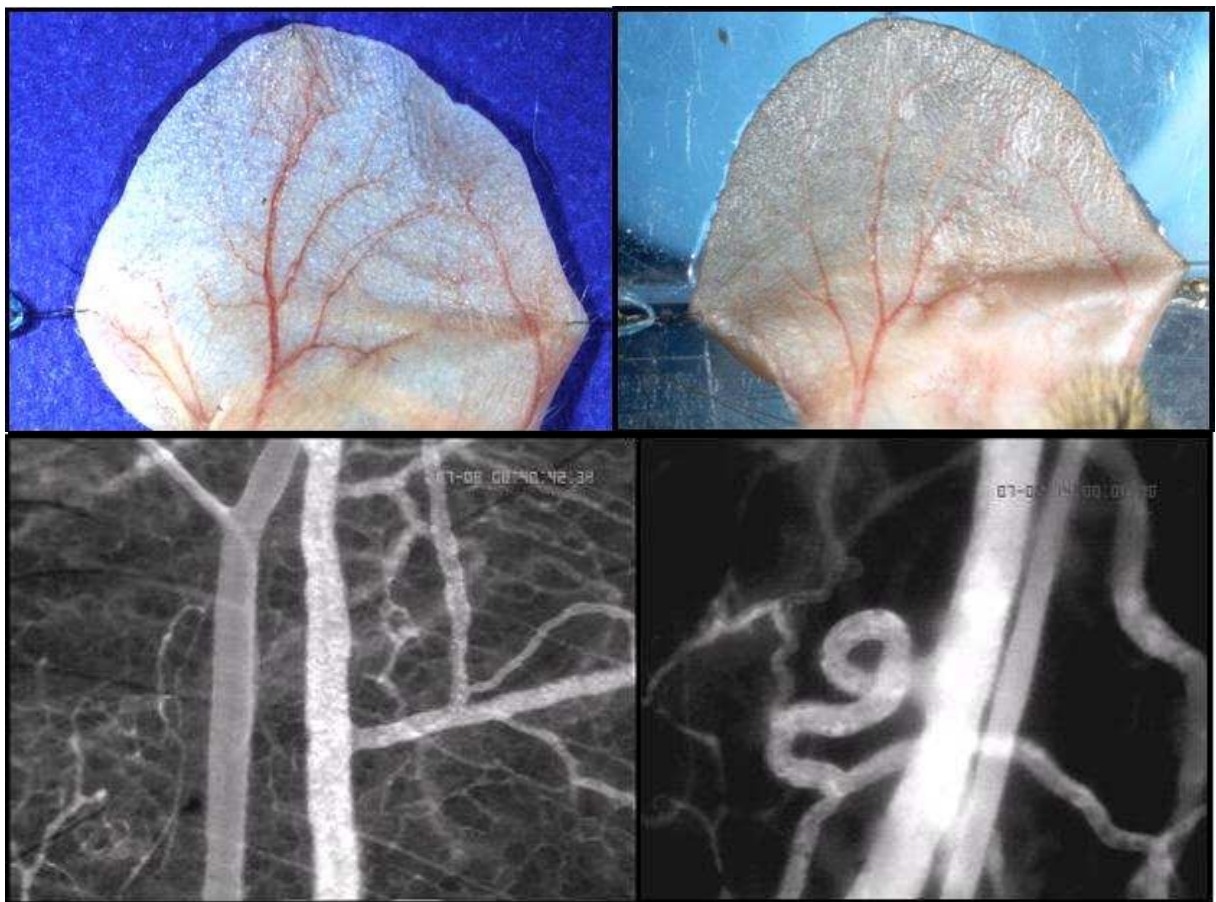


Abb. 16: Mikrozirkulation einer haarlosen (SKH-1 hr) Maus (links) einer depilierten (C57/B6/SV129) Maus (rechts).

## Abbildungen

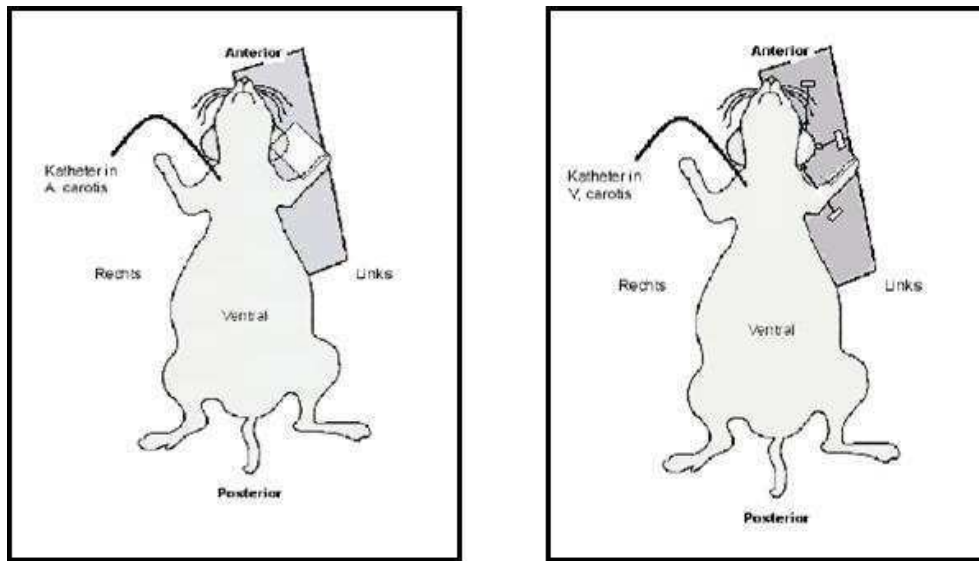


Abb. 17: Intravitalmikroskopische Varianten der ventralen Haut des Mäuseohrs (links mit Deckglas und rechts mit Haltefäden) [modifiziert nach 144].

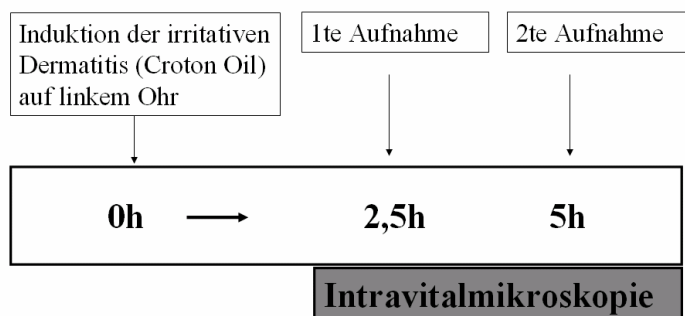


Abb. 18: Protokoll der intravitalmikroskopischen Beobachtung der Croton-Öl induzierten akuten Kontaktdermatitis

## Abbildungen

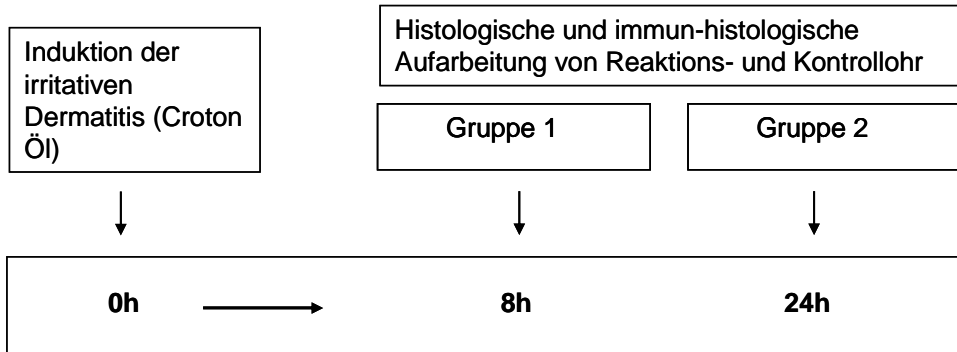


Abb. 19: Protokoll der ICD mit manueller Ohrdickemessung und histologischer Aufarbeitung

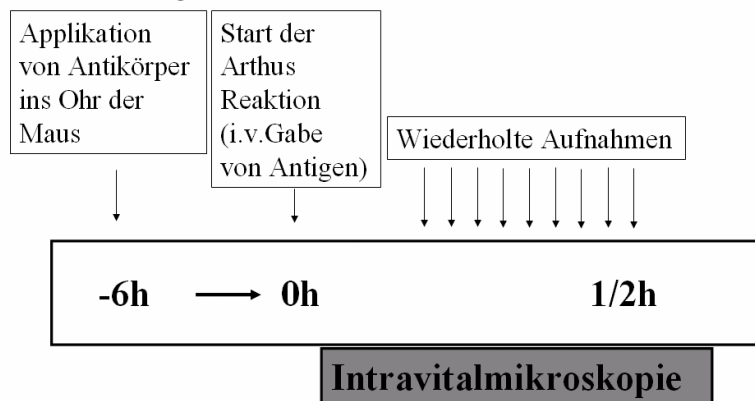


Abb. 20: Protokoll der Untersuchungen zur Arthus Reaktion

## Abbildungen

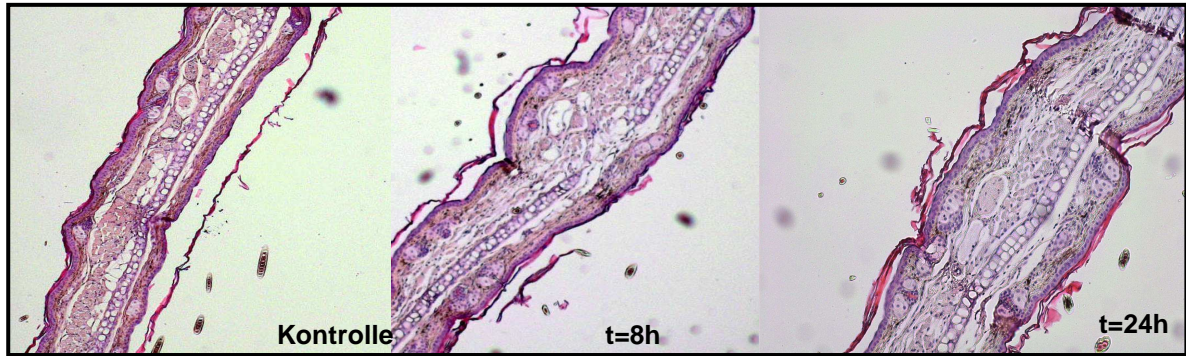


Abb. 21: HE-gefärbter feingeweblicher Schnitt des Mäuseohrs 8 Stunden (Mitte) und 24 Stunden (rechts) nach Einleitung der Croton Öl induzierten Kontaktdermatitis. Man erkennt im Gegensatz zur Kontrolle (links) eine zunehmende Ödembildung und neutrophiles Infiltrat.

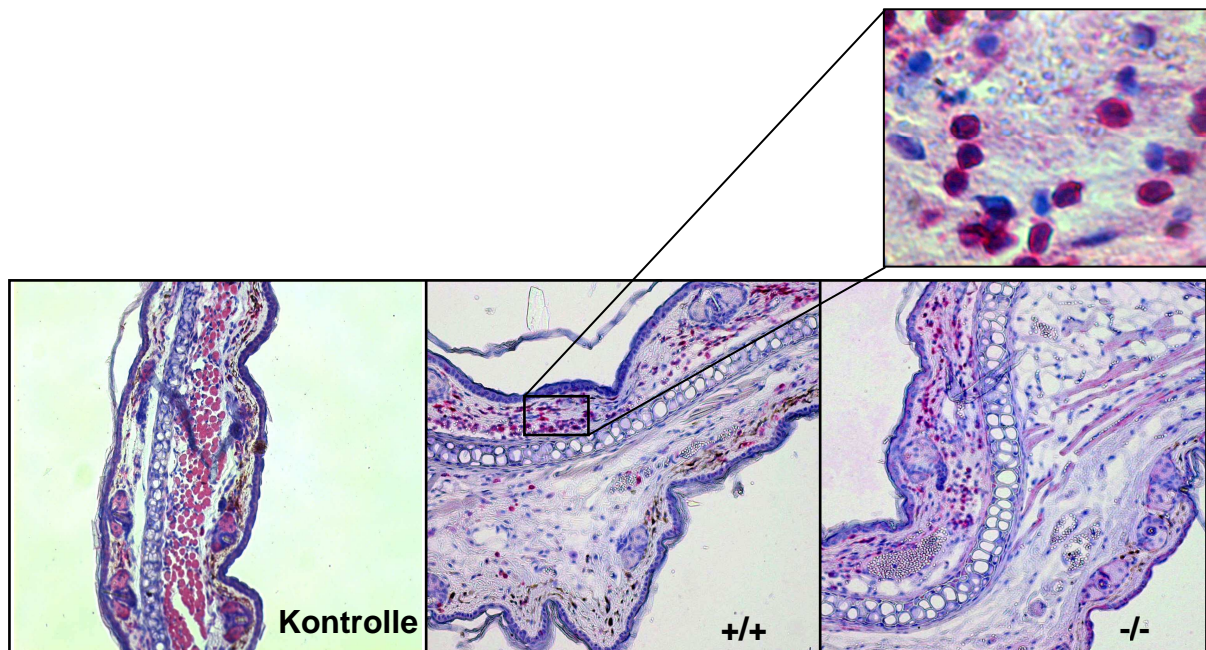


Abb. 22 : Ly6G gefärbte feingewebliche Schnitte des Mäuseohrs 24 Stunden nach Einleitung der Croton Öl induzierten Kontaktdermatitis im Gegensatz zum Kontrolllohr (links). Die Auszählung der Ly-6G gefärbten neutrophilen Granulozyten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen PRTN3 und ELA2 +/+ (Mitte) und -/- (rechts).

## 8. Danksagung

Mein hauptsächlicher Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Professor Dr. Markus Ollert von der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München sowohl für die Überlassung des Themas als auch für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Die Möglichkeit jederzeit über die auftretenden Probleme zu diskutieren war außerordentlich bereichernd und hilfreich.

Zudem möchte ich dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München Herrn Professor Dr. Dr. Ring für die Vermittlung an meinen Doktorvater danken. Er gab mir die Möglichkeit an seiner Klinik Dermatologie und Allergologie zu lernen und so den Bogen zwischen Pathophysiologie und Klinik der dermalen Entzündungsreaktion zu spannen.

Ferner sei an dieser Stelle Prof. Heidrun Behrendt, der Direktorin des Zentrums für Allergie und Umwelt (ZAUM) für die Nutzungsmöglichkeit des elektronischen Auswertesystems KS300 in ihrem Institut und die vielfältige Unterstützung gedankt.

Die vorliegende Dissertation wäre ohne meine Betreuer des experimentellen Anteils der Dr. med. Stefan Langer und Dr. med. Andre Khandoga vom Institut für Chirurgische Forschung in München nicht zu Stande gekommen. Sie waren nicht nur bei technischen und methodischen Fragestellungen stets zur Stelle, sondern ich danke ihnen auch für inhaltliche Hilfe, die sie mir zukommen ließen. Ferner gilt mein Dank dem Leiter der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Fritz Krombach vom Institut für chirurgische Forschung an der Ludwig-Maximilian-Universität und dem Direktor des Instituts Prof. Dr. Dr. hc. mult. Konrad Messmer.

Für die sehr gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei Martin Skerhut, Bettina Maar und Beate Heuser von der Forschergruppe „Molekulare und klinische Allergotoxikologie“ bedanken.

Meiner Frau und meinen Eltern danke ich besonders für die Geduld, die seelische Unterstützung und die Aufmunterung auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die hier namentlich noch genannt wurden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## **9. Lebenslauf**

Geboren als Sohn von Dr. med. Dr. med. dent. Ursula Frenzel und Dr. med. dent. Manfred Frenzel und am 01.05.1976 in München.

Nach dem Abitur am Gymnasium „Icking über dem Isartal“ Beginn des Grundstudiums der Medizin an der Ludwig-Maximilian-Universität in München.

Nach dem Abschluss des klinischen Medizinstudiums an der Technischen Universität in München Beginn mit der klinischen Ausbildung zum Dermatologen und Allergologen an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München. Derzeitige Weiterbildung in der Praxis von Frau PD. Dr. med. Sabine Plötz in München.

## **10. Abbildungs- Diagramm-, und Tabellenverzeichnis:**

### **Abbildungen:**

Abb.1: Nach partieller Aktivierung durch Chemokine exprimieren neutrophile Granulozyten eine kleine Fraktion ihrer gespeicherten Proteasen auf der Zelloberfläche. Hier sind sie, abgeschirmt von Antiproteasen, in der Lage ihren biologischen Funktionen nachzukommen. [Modifiziert nach <http://www.ilo.at/images/texte/NeutrophilGrb.jpg>]

Abb.2: Dreidimensionale Darstellung von PRTN3 (links) und ELA2 (rechts). Die Abbildungen stammen aus der Strukturdatenbank des Internetportals „Pubmed“.

[<http://structure.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?Dopt=s&uid=4574> (PRTN3)  
<http://structure.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?Dopt=s&uid=20352> (ELA2)]

Abb.3 Endotheliale Leakage

Abb.4: Prozess des „Rollings“

Abb.5: Prozess der festen Adhärenz („Sticking“)

Abb.6: Der Prozess der Transmigration

Abb.7: Schemazeichnung des Genlokus von PRTN3 im Mäusegenom (DJ186-DJ187 (162))

Abb.8 Ausgespanntes Ohr einer Maus des Hintergrunds C47/B6/SV129.

Abb.9: Intravitalmikroskopische Aufnahmeeinheit bestehend aus Intravitalmikroskop, Kamera, Video- und Computer-Monitor, Joystick, Mikroskopiertisch mit computergesteuertem Schrittmotor; nach Harris et al., 1997 (9).

Abb.10: Schemazeichnung der Anordnung der Aufnahmeeinheit. Die Blutgefäße des Ohrs der auf einer Plexiglasbühne immobilisierten Maus wird über das Mikroskop auf einem Bildschirm dargestellt und zur Datenanalyse dem Auswerteprogramm CapImage® zugeführt.

Abb.11: Rollende Leukozyten bzw. nicht-adhärenente Leukozyten

Abb.12: Extravasation von FITC-Dextran

Abb.13: Schemazeichnung der Schnittfolge zur histologischen Auswertung der Haut im Rahmen der irritativen Kontaktdermatitis

Abb.14: Linkes Bild zeigt einen digitalisierten histologischen Schnitt des Mäusohrs. Rechts wurde die Länge am Knorpel (grün) und die Fläche (blau) erfasst.

Abb.15: Im linken Bild ist die zu beobachtende Fläche blau markiert. Das rechte Bild zeigt die gemessenen Bildpunkte des CD-45 Antikörperspektrums



Abb.16: Mikrozirkulation einer Haarlosen (SKH-1 hr) Maus (links) einer depilierten (C57/B6/SV129) Maus (rechts).

Abb.17: Intravitalmikroskopische Varianten der ventralen Haut des Mäuseohrs (Links mit Deckglas und rechts mit Haltefäden) [modifiziert nach 140].

### **Diagramme:**

Diagramm 1: Extravasation des Plasmamarkers FITC-Dextran zwischen der dorsalen Ohrseite des Wildtypstamms und der ventralen Ohrseite vor Applikation von Croton Öl.

Diagramm 2: Anzahl rollender Leukozyten am Gefäßendothel an der dorsalen Ohrseite (Wildtyp) und an der ventralen Ohrseite der Gruppen vor Applikation von Croton Öl (Baseline)

Diagramm 3: Anzahl der adhärenen Leukozyten zwischen der dorsalen Ohrseite des Wildtypstamms und der ventralen Ohrseite vor Applikation von Croton Öl.

Diagramm 4: Extravasation des Plasmamarkers (FITC-Dextran) bei vier verschiedenen Gruppen vor (Baseline), 2,5 Stunden und 5 Stunden nach der ICD mit Croton Öl.

Diagramm 5: Anzahl rollender Rodamin 6G fluoreszenzmarkierter Leukozyten am Gefäßendothel bei vier verschiedenen Gruppen vor (Baseline), 2,5 Stunden und 5 Stunden nach der ICD mit Croton Öl.

Diagramm 6: Anzahl adhärenter Rodamin 6G-markierter Leukozyten am Gefäßendothel von vier verschiedenen Gruppen vor (Baseline), 2,5 Stunden und 5 Stunden nach der ICD mit Croton Öl.

Diagramm 7: Ohrdicke (Spring loaded caliper) in  $\mu\text{m}$  von 4 verschiedenen Gruppen zu 5 Zeitpunkten (Baseline, 2,5; 5; 8; und 24 Stunden)

Diagramm 8: Prozentuale Änderung der Ohrdicke (Spring loaded caliper) in 4 verschiedenen Gruppen zu 5 Zeitpunkten (Baseline, 2,5; 5; 8; und 24 Stunden)

Diagramm 9: Histologisch gemessene Ohrdicke in 4 verschiedenen Gruppen 8 und 24 Stunden nach Induktion der ICD mit Croton Öl

Diagramm 10: Vergleich zwischen der histologischen und der manuellen Messung der Ohrdicke in  $\mu\text{m}$

Diagramm 11: CD45 computerassistierte Messung des Fluoreszenzindex im Beobachtungsfeld (Unterseite des Ohrs) als Maß für die totale Leukozyten-Infiltration zum Zeitpunkt 8 und 24 Stunden nach Induktion der ICD

Diagramm 12: Anzahl von Ly-6G-positiven neutrophilen Granulozyten pro Beobachtungsfeld (ventrale Ohrseite)

Diagramm 13: Leakage nach vor (Wildtyp), 0h, 4h und 6h nach Applikation von 10µl NaCl in das subdermale Kompartiment der dorsalen Ohrseite mithilfe einer speziellen Mikronadel.

Diagramm 14: Plasmazelluläre Leakage in 3 Kontrollgruppen und 3 Arthus-Reaktion Gruppen mit absteigender Verdünnung des Antikörpers.

Diagramm 15: Anzahl der rollenden Leukozyten pro Sekunde in 3 Kontrollgruppen und 3 Arthus-Reaktion Gruppen mit absteigender Verdünnung des Antikörpers.

Diagramm 16: Anzahl adhärenter neutrophiler Granulozyten in 3 Kontrollgruppen und 3 Arthus-Reaktion Gruppen mit absteigender Verdünnung des Antikörpers.

Diagramm 17: Kontrolluntersuchung zur Arthusreaktion

### **Tabellen:**

Tabelle 1: Mikrozirkulatorische Parameter von 5 haarlosen (SKH-1 hr) und 6 depilierten (C57/B6/SV129) Mäusen werden mit den Resultaten von Nolte et al. (6 haarlose Mäuse und jeweils 4-6 Gefäßsegmente) verglichen.

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der intravitalmikroskopischen Beobachtung der Croton-Öl induzierten akuten Kontaktdermatitis

Tabelle 3: Gruppeneinteilung der ICD für die manuelle Ohrdickemessung und histologischer Aufarbeitung