

Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Deutsches Herzzentrum München und
1. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Neue Aspekte des Beta2-integrinvermittelten Crawlings von
Leukozyten dargestellt anhand von in vivo-
Multiphotonenmikroskopie**

Veronika Maria Liegsalz-Beck

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. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. St. Massberg
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Diese Dissertation wurde am 29.06.2015 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.04.2016 angenommen.

Meiner Familie

GLIEDERUNG

GLIEDERUNG

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Hintergrund	1
1.2	Die Rolle von Leukozyten bei Entzündungen.....	1
1.3	Die Kaskade der leukozytären Migration	5
1.4	Crawling.....	11
1.4.1	Das Bewegungsphänomen des Crawlings.....	11
1.4.2	Unterschiedliche Formen des Crawling leukozytärer Populationen	13
1.4.3	Regulatoren des Crawlings.....	16
1.4.3.1	Die Rolle von Integrinen: <i>Inside-out- und Outside-in</i> -Signalwege.....	16
1.4.3.2	Der Einfluss von Mac-1, LFA-1, ICAM-1, Vav-1, mAbp1 und CD18 auf das Crawling	18
1.4.3.3	Der Einfluss von Scherkräften auf das Crawling.....	22
1.5	Methoden zur Analyse des Crawlings in vivo.....	23
2	FRAGESTELLUNG UND ZIELE	25
3	MATERIAL UND METHODEN	26
3.1	Verwendete Tiere	26
3.2	Verwendete Reagentien	27
3.3	Verwendete Antikörper	31
3.4	Versuchsaufbau	33
3.4.1	Narkose.....	33
3.4.2	Präparation und Katheterisierung der Arteria femoralis	34
3.4.3	Das Ohrmodell der Maus	36
3.4.4	Zweiphotonenmikroskopie.....	36
3.4.5	Etablierung eines Modells zur <i>Single-Cell-Tracking</i> -Analyse des Crawlings.....	40
3.4.6	Hämodynamische und leukozytäre Parameter	41
3.4.7	Experimentelle Untergruppen	43
3.4.8	Das Entzündungsmodell.....	44
3.5	Statistische Analysen und Bildbearbeitung	44
4	ERGEBNISSE	45
4.1	Hämodynamische Parameter	45

GLIEDERUNG

4.2	Crawlingverhalten unter <i>Steady-State</i>-Bedingungen: Analyse von Neutrophilen Granulozyten, Monozyten und T- Zellen	46
4.3	Einfluss des Versuchsaufbaus auf Crawling - Phototoxische Effekte führen zu vermehrtem Crawling	53
4.4	Crawling während einer akuten Entzündung	57
4.4.1	Schaffung einer inflammatorischen Reaktion durch Gabe von KC und Überprüfung des Wirkmechanismus	57
4.4.2	Crawlingverhalten nach KC-Entzündungsreiz: Unterschiede zwischen Neutrophilen Granulozyten und Monozyten	58
4.5	Die Wirkung blockierender Antikörper auf das Crawlingverhalten leukozytärer Subpopulationen unter <i>Steady-State</i>-Bedingungen und während einer Entzündung	60
4.5.1	Der Effekt von Anti-CD11a-Antikörpern auf Crawling	61
4.5.2	Der Effekt von Anti-CD11b-Antikörpern auf Crawling	66
4.5.3	Der Effekt von Anti-ICAM-1-Antikörpern auf Crawling	71
5	DISKUSSION	73
5.1	Diskussion von Material und Methoden	73
5.2	Diskussion der Ergebnisse	87
5.3	Mögliche Folgeprojekte	105
5.4	Ausblick.....	106
6	ZUSAMMENFASSUNG	108
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	112
	LITERATURVERZEICHNIS	115
	DANKSAGUNG	146

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Antigen
AK	Antikörper
AO	Acridine orange
ApoE	Apolipoprotein E
°C	Grad Celsius
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
CD99L2	CD99 antigen like-2
CX3CL1	Ligand für Fraktalkinerezeptor
CX3CR1	Fraktalkinerezeptor
CX3CR1 eGFP/+	Mausstamm mit GFP-markierten Monozyten, heterozygot
C57BL/6	Als Wildtypkontrolle verwendeter Tierstamm
DNA	Desoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
ESAM	Endothelial cell-selective adhesion molecule
E-Selektin	Endotheliales Selektin
ESL	E-selectin-ligand
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC-Dextrane	Fluorescein isothiocyanate dextrane
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
g	Gramm
G(i)-Protein	Inhibitorisches G-Protein
GPCR	G-protein-coupled receptor
Gr-1	Granulocyte differentiation antigen 1
GRO-alpha	Growth regulated oncogen alpha
GTP	Guanosintriphosphat
HA	High affinity
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
i.a.	Intraarteriell
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IVM	Intravitalmikroskopie
JAM	Junctional adhesion molecule
KC	Keratinocyte chemoattractant, chemokine-derived cytokine
KO	Knockout
LAD	Leukocyte adhesion deficiency
LFA-1	Lymphocyte function associate antigen 1
LP	Laserpower
LPS	Lipopolysaccharid
L-Selektin	Selektin auf Leukozyten
LysM	Murines Lysozym M
LysM eGFP/eGFP	Mausstamm mit GFP-markierten Myeloidzellen, homozygot
Ly6	Lymphocyte antigen 6
µl	Mikroliter

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µm	Mikrometer
mAbp1	Mammalian actin-binding protein 1
Mac-1	Macrophage-1-Antigen
MHC	Major histocompatibility complex
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MIP	Macrophage inflammatory protein
M.	Musculus
MPO	Myeloperoxidase
n	Anzahl der untersuchten Zellen
N	Anzahl der untersuchten Gefäße
NaCl	Natriumchlorid
NET	Neutrophil extracellular trap
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PMN	Polymorphnuclear leukocyte
P-Selektin	Selektin u.a. auf Plättchen
PSGL-1	P-selectin-glycoprotein ligand
PTX	Pertussis Toxin
R6G	Rhodamin6G
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
RFP	Red fluorescent protein
RLOT	Reflected light oblique transillumination
RNA	Ribonucleic acid
ROCK	Rho-associated coiled coil containing protein kinase
SHG	Second Harmonic Generation
TEM	Transendotheliale Migration
TNF	Tumornekrosefaktor
T-red-hi	Mausstamm mit RFP-markierten T-Zellen
TRITC-Dextran	Tetramethylrhodamine isothiocyanate-Dextran
V.	Vena
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VE-Cadherin	Vascular endothelial-Cadherin
VLA-4	Very late antigen-4
WBC	White blood cell count
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1 EINLEITUNG

1.1 Hintergrund

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation liegen kardiovaskuläre Erkrankungen mit 31% (2012) an erster Stelle der Todesursachen weltweit, allein 2012 starben 17,5 Millionen Menschen an den Folgen (Statistisches Bundesamt, 2015, World Health Organisation, 2015). Laut Gesundheitsberichtserstattung des Bundes waren 2013 in Europa 270,7 Sterbefälle je 100.000 Einwohner (alterstandardisiert) auf Krankheiten des Kreislaufsystems zurückzuführen (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2015).

Eine wichtige Ursache hierfür ist die Atherosklerose, eine chronische Entzündung, bei der Immunzellen kontrolliert in die Gefäßwand einwandern. Es kommt zu atherosklerotischen Läsionen, Atheromen und atherosklerotischen Plaques. Eine Vielzahl hochspezifischer zellulärer wie molekularer Mechanismen ist die Grundlage dieser multifaktoriellen Entzündungserkrankung. (Ross, 1999, Soehnlein and Weber, 2009, Galkina and Ley, 2009, Böcker et al., 2004)

Die hierdurch bedingten Gefäßschädigungen der großen und mittleren Arterien können Durchblutungsstörungen und Infarzierungen von Herz, Gehirn und Extremitäten zur Folge haben (Ross, 1999, Galkina and Ley, 2009).

1.2 Die Rolle von Leukozyten bei Entzündungen

Das Immunsystem ist ständig dem Angriff verschiedener potentiell schädlicher Mikroorganismen ausgesetzt. Eine akute Entzündung manifestiert sich typischerweise mit den Kardinalsymptomen *Calor* (Überwärmung), *Rubor* (Rötung), *Tumor* (Schwellung), *Dolor* (Schmerz) und *Functio laesa* (gestörte Funktion). (Klinke et al., 2005, Schmidt et al., 2003, Böcker et al., 2004)

Um Schädigungen abzuwehren, hat der Organismus unterschiedliche Mechanismen entwickelt. Einer hiervon ist die Erkennung und Bekämpfung der Pathogene durch im Blut zirkulierende Immunzellen, um so eine weitere Ausbreitung zu verhindern. Das mikrovaskuläre System stellt sich als Ort hochgradig dynamischer Vorgänge dar. (Hickey and Kubes, 2009, Auffray et al., 2009b)

Leukozyten zirkulieren als Teil des zellgebundenen Immunsystems größtenteils in Blut- und Lymphgefäßen, solange bis ihre Anwesenheit an Orten einer Immunantwort gefordert wird (Muller, 2003, Aumüller et al., 2010, Klinke et al., 2005, Schmidt et al., 2003). Eine

1 EINLEITUNG

Aufstellung beteiligter Subpopulationen zeigt Tabelle 1. Die Widerstandsfähigkeit der weißen Blutkörperchen gegen starke hämodynamische Kräfte und Verwirbelungen in großlumigen Gefäßen wie auch die Vermeidung einer Aggregation untereinander und mit anderen Zellen ermöglichen ihnen, sich effizient im ganzen Organismus zu verteilen (Montresor et al., 2012).

Demgegenüber steht der humorale Teil des Abwehrsystems, der sich aus im Blut befindlichen Stoffen wie Interleukinen, durch Plasmazellen gebildeten Antikörpern und weiteren Substanzen zusammensetzt (Muller, 2003, Aumüller et al., 2010, Klinke et al., 2005, Auffray et al., 2009b).

Eine Entzündung selbst ist die stereotype Reaktion von vaskularisiertem Gewebe auf jegliche Art von Verletzung und betrifft vor allem postkapilläre Venolen. In diesem Bereich des Gefäßsystems entsteht in der frühen Phase der Abwehrreaktion eine histamin-induzierte „undichte Stelle“. Die Permeabilität im Sinne der Durchlässigkeit des Endothels verändert sich. Diese aktive regulierbare und selektive Barrierefunktion ist die Voraussetzung für eine Extravasation der Entzündungszellen ins interstitielle Gewebe in Richtung der Verletzung beziehungsweise des Pathogens. (Muller, 2003, Klinke et al., 2005)

Eine wichtige Aufgabe in der Abwehr von potentiellen Krankheitserregern stellt die Phagozytose dar, die durch Elie Metchnikoff (1845-1916) erstbeschrieben wurde (Heifets, 1982, Tan and Dee, 2009, Tauber, 1992). Diese wird vor allem von mononukleären phagozytierenden Zellen wie den Monozyten und den polymorphkernigen Leukozyten (*PMN-polymorphnuclear leukocyte*) bewerkstelligt (Klinke et al., 2005, Schmidt et al., 2003).

Während der Phagozytose (beispielsweise durch einen Neutrophilen Granulozyten) wird ein Bakterium mittels Zellfortsätzen/Pseudopodien umschlossen, als abgekapseltes Phagosom in die Zelle aufgenommen und fusioniert dort mit Lysosomen und degranulierenden neutrophilen Granula, was letztendlich zur Zerstörung des Bakteriums führt (Schmidt et al., 2003, Hickey and Kubes, 2009). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit über NETs (*Neutrophil extracellular traps* – neutrophile extrazelluläre „Fänger“) - durch PMNs ausgeschiedene fadenförmige Geflechte aus DNA und gegen Bakterien gerichtete Faktoren - Bakterien aufzuspüren, einzufangen, abzutöten und deren Virulenzfaktoren abzuschwächen (Schmidt et al., 2003, Hickey and Kubes, 2009, Leavy, 2012, Kolaczowska and Kubes, 2013). NETs sind sehr adhäsiv und binden Pilze, grampositive und gramnegative Bakterien (Hickey and Kubes, 2009, Yipp et al., 2012).

Leukozyten setzen sich aus Monozyten (ca 5% der Gesamtleukozyten), Lymphozyten (ca 30%) und Granulozyten (ca 65%) zusammen und erfüllen viele verschiedene Funktionen. Zur

1 EINLEITUNG

Gruppe der Granulozyten gehören Neutrophile (40-60%), Basophile (1%) und Eosinophile (5%) Granulozyten. (Klinke et al., 2005, Aumüller et al., 2010, Schmidt et al., 2003) (s. Tab. 1).

Neutrophile Granulozyten sind 12-15µm groß und stellen mit 2000-6000/µl Blut einen Großteil der Leukozyten (Gesamtzahl 5000-10000/µl). Sie haben mehrsegmentige polymorphe Kerne. Abhängig von ihrem Reifegrad werden junge stabkernige von reifen segmentkernigen Formen unterschieden. (Klinke et al., 2005, Aumüller et al., 2010, Schmidt et al., 2003)

Um ihre Funktionen zu erfüllen, verfügen sie über primäre, sekundäre, tertiäre und sekretorische Granula verschiedenen Inhalts. Primäre Granula beherbergen Defensine, Peroxidasen und Hydrolasen, sekundäre unter anderem Histaminasen und Lactoferrin, tertiäre enthalten Matrixmetalloproteinasen, die sie zur Gewebswanderung befähigen und sekretorische Granula beinhalten alkalische Phosphatase. (Aumüller et al., 2010, Schmidt et al., 2003, Beninghoff and Drenckhahn, 2003)

Neutrophile Granulozyten sind die Schlüsseleffektorzellen des angeborenen Immunsystems (Hickey and Kubes, 2009). Ihre schnelle Migration aus den Blutgefäßen ins Gewebe ist ein entscheidender Schritt der Entzündung und wird durch feinste Veränderungen des Mikromilieus bedingt (Kaplanski et al., 1994, Patel et al., 2002, Hickey and Kubes, 2009, Khandoga et al., 2009). Die Aufgabe der PMNs besteht hauptsächlich in der Isolation, der Aufnahme und dem Abtöten von Pathogenen über oxidative wie auch nicht-oxidative Mechanismen (Hickey and Kubes, 2009).

Soehnlein et al. beschrieben 2009, dass eine Auswanderung von Polymorphkernigen Leukozyten aus Gefäßen hin zu einer Entzündung unter Beteiligung von Beta2-Integrinen und Chemokinen auch zu einer Adhäsion und Auswanderung von inflammatorischen Monozyten führt. Dies ist mitunter möglich, indem PMNs, zum Beispiel durch Freisetzung bestimmter Proteine aus ihren Granula, eine Umgebung schaffen, die die Auswanderung von Monozyten begünstigt (Soehnlein et al., 2009, Kolaczowska and Kubes, 2013, Soehnlein et al., 2008, Soehnlein and Lindbom, 2009, Soehnlein and Lindbom, 2010). Andere Studien lassen vermuten, dass Neutrophile Granulozyten auch dazu beitragen, das adaptive Immunsystem zu kontrollieren (Pick et al., 2013). Sie scheinen die Funktion von B- und T-Lymphozyten zu beeinflussen (Nathan, 2006, Pillay et al., 2012, Puga et al., 2012).

Es gibt Hinweise darauf, dass verschiedene Neutrophile Subpopulationen auch unterschiedliche Aufgaben haben (Tsuda et al., 2004, Fridlender et al., 2009, Pillay et al., 2010).

1 EINLEITUNG

Monozyten gehören ebenfalls zu den Blutleukozyten. Ihre Anzahl liegt bei 200-800/ μ l und sie sind 10-20 μ m groß. Nach der Migration ins Gewebe werden sie als Makrophagen bezeichnet. Auch sie beherbergen Granula, die mitunter saure Phosphatase und Lysozym enthalten. (Klinke et al., 2005, Aumüller et al., Schmidt et al., 2003)

Monozyten spielen eine entscheidende Rolle bei Immunreaktionen, akuten wie chronischen Entzündungen (Hyduk and Cybulsky, 2009, Geissmann et al., 2010). Wegen ihrer Fähigkeit zur Phagozytose und zur Umwandlung in antigenpräsentierende Zellen sind sie wichtige Teile sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems (Imhof and Aurrand-Lions, 2004).

In der Gruppe der Monozyten werden residente von inflammatorischen Formen unterschieden, die physiologisch verschiedene Funktionen erfüllen (s. a. 1.4.2). Während residente Monozyten zum Beispiel eine Rolle in der frühen Entzündungsantwort spielen, sind inflammatorische Monozyten mitunter für die Rekrutierung von T-Zellen und die Elimination eines Pathogens zuständig. (Auffray et al., 2007, Hickey and Kubes, 2009, Saha and Geissmann, 2011, Barbalat et al., 2009, Dunay et al., 2008, Sponaas et al., 2009)

Subpopulation	Funktion/Beteiligung/funktionsbestimmende Inhalte
Neutrophile Granulozyten	Schnelle Reaktion bei akuter Entzündung; Lyse, Phagozytose, Leukotaxie, Kontrolle des adaptiven Immunsystems
Basophile Granulozyten	Abwehr von Parasiten; Allergien; Chemotaxie für Eosinophile Granulozyten
Eosinophile Granulozyten	Abwehr von Würmern; Allergie
Monozyten	Phagozytose, Antigenpräsentation
Lymphozyten	B/T, Plasmazellen, spezifisch humoral (Antikörperproduktion), zelluläre Abwehr

***Tabelle 1:** Rolle leukozytärer Subpopulationen bei entzündlichen Prozessen. Exemplarisch sind einige Funktionen genannt (zusammengefasst nach Issekutz et al., 1981, Kaplanski et al., 1994, Patel et al., 2002, Klinke et al., 2005, Nathan, 2006, Hickey and Kubes, 2009, Hyduk and Cybulsky, 2009, Aumüller et al., 2010, Pillay et al., 2012, Puga et al., 2012)*

Im Verlauf eines inflammatorischen Geschehens variieren Beteiligung und Stellenwert der verschiedenen Leukozytenpopulationen. Die akute Form der Entzündung ist charakterisiert durch einen schnellen und nachhaltigen Einstrom von Neutrophilen Granulozyten (Hyduk and Cybulsky, 2009). Monozyten werden zeitgleich, aber in geringerem Ausmaß vom Blutgefäßsystem ins geschädigte Gewebe geordert (Issekutz et al., 1981).

1 EINLEITUNG

Im Verlauf der Entzündung vermindert sich die Gesamtzahl der Neutrophilen Granulozyten, und das Gleichgewicht verschiebt sich hin zu den Monozyten, das entzündliche Exsudat wird nun durch Monozyten und Makrophagen bestimmt (Hyduk and Cybulsky, 2009).

Bei der chronischen Entzündung hingegen kommt es zu einem verlängertem Einstrom mononukleärer Leukozyten, das heißt, abhängig von der Art der Entzündung, von Monozyten oder Lymphozyten (Hyduk and Cybulsky, 2009). Während Monozyten das Zellbild einer atherosklerotischen Entzündung bestimmen, tun das Lymphozyten bei Autoimmunkrankheiten (Hyduk and Cybulsky, 2009). Diese sind die dominierenden Zellen des spezifischen Immunsystems und werden abhängig von auf ihrer Oberfläche exprimierten Antigenen als T-, B- und Null-Lymphozyten bezeichnet (Schmidt et al., 2003). Lymphozyten erfüllen ihre Funktion im Kontext der spezifischen Immunabwehr, sowohl als Produzenten von Antikörpern durch Plasmazellen (differenzierte B-Lymphozyten), als auch durch die Bildung zytotoxischer T-Zellen (Böcker et al., 2004).

Eosinophile Granulozyten werden zum Beispiel im Rahmen einer allergischen Entzündung chemotaktisch angezogen, ihre Granula enthalten unter anderem toxisches basisches Protein und Peroxide. Basophile Granulozyten spielen eine entscheidende Rolle im Rahmen der Phagozytose, in ihren Granula befinden sich beispielsweise Heparin und Histamin. (Böcker et al., 2004) (s. Tab. 1)

1.3 Die Kaskade der leukozytären Migration

Als Antwort auf eine Infektion oder einen mechanischen Schaden startet das Immunsystem eine schnelle Antwort, um eine Ausdehnung des Schadens zu verhindern. In erster Linie wird dieser Ablauf durch vaskuläre Veränderungen und die Rekrutierung von Leukozyten erreicht. (Wang et al., 2013)

Um ihre Effektorfunktion im Immunsystem zu erfüllen, durchwandern und prüfen Leukozyten fortwährend die verschiedenen Gewebe des Körpers. Sie müssen bei Bedarf anhalten und reagieren können. Andererseits sollen sie auch Signale nur vorübergehender Zellkontakte verarbeiten können, um ihre Bewegung fortsetzen. Die Anhaftung wie das Lösen der Verbindungen sind genauestens regulierte Prozesse. Diese selektive Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe und ihre Ausrichtung dort sind essentiell für ein intakt funktionierendes angeborenes wie erworbenes Immunsystem. (Mempel et al., 2004, Ludwig et al., 2009, Hickey and Kubes, 2009, Fan et al., 2006)

Die leukozytäre Migration ist ein kaskadenartig aufgebauter Prozess, in dem Adhäsionsmoleküle des Endothels mit Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche von Leukozyten befinden, interagieren (Patel et al., 2002, Xu et al., 2013). Abbildung 1 zeigt

1 EINLEITUNG

exemplarisch intravitalmikroskopische Aufnahmen verschiedener Schritte der Migrationskaskade.

Leukozyten interagieren mit dem Endothel trotz oder aufgrund der Einwirkung des kontinuierlichen Blutflusses und der damit verbundenen Scherkräfte (Hyduk and Cybulsky, 2009, Patel et al., 2002). Die bereits bekannten Schritte Rollen, Anhaften (Adhäsion) und Transmigration wurden vor einigen Jahren um die Stufen langsames Rollen, feste Anhaftung, Crawling, Migration durch die Basalmembran und Wanderung durch das interstitielle Gewebe ergänzt (Ley et al., 2007). (s. Abb. 2)

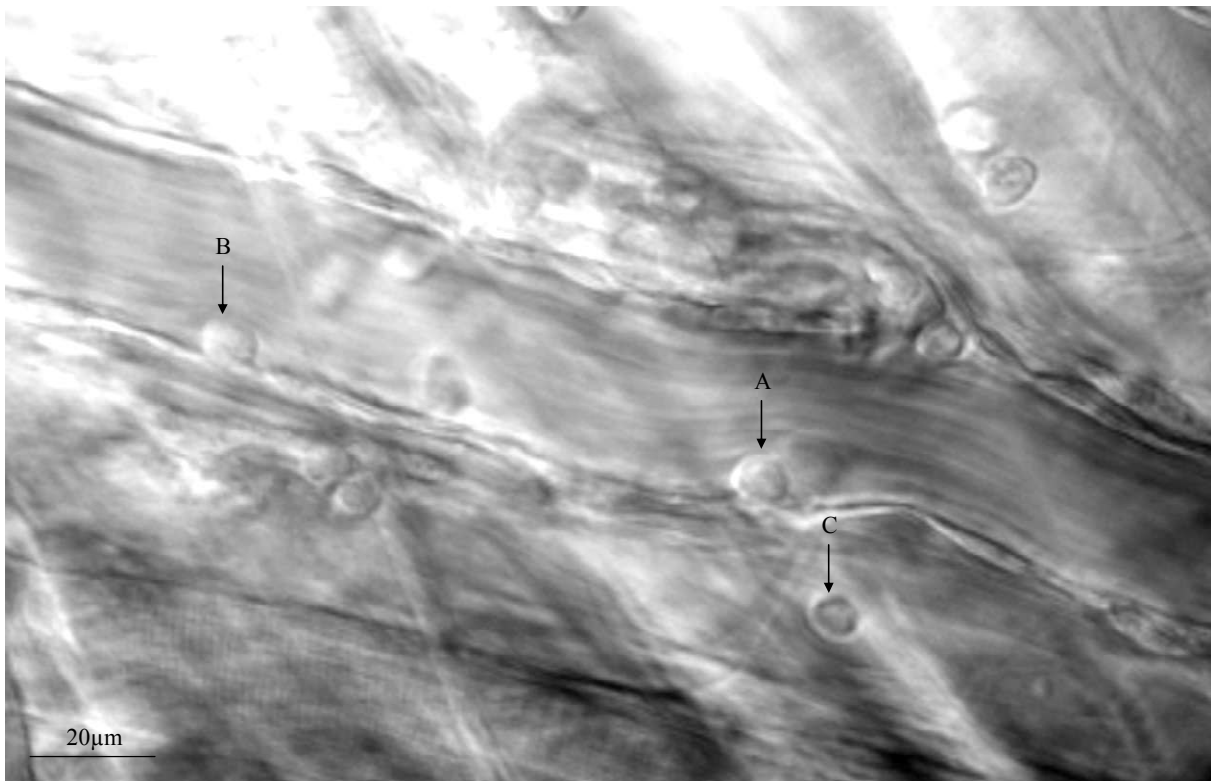


Abbildung 1: Gezeigt sind mittels Transilluminationmikroskopietechnik angefertigte Kurzzeit-Intravitalmikroskopie-Aufnahmen aus unserer Arbeitsgruppe. Hierbei wurde das M. Cremaster-Modell der Maus verwendet. Während der gegebenen Entzündungssituation (Superperfusion mit fMLP) sind hier in einer postkapillären Venole rollende (A), adhärenente (B) und bereits ins Gewebe transmigrierte (C) Leukozyten zu sehen

Zu Beginn der Migrationskaskade haftet die Zelle an der Gefäßwand an und rollt danach langsam am Endothel entlang, bevor sie an den befallenen Stellen anhalten kann (Wang et al., 2006, von Andrian et al., 1991, Fiebig et al., 1991, Ley et al., 2007). (s. Abb. 1, 2)

Dies wird vor allem durch Faktoren wie den Selektinrezeptor PSGL-1 (*P-selectin-glycoprotein ligand*) und Selektine (P-, E- und L-Selektin) vermittelt (Patel et al., 2002, Sperandio et al, 2006, Hickey and Kubes, 2009, Zarbock et al. 2008, Ley et al., 2007, McEver and Cummings, 1997, Butcher,1991, Springer, 1994). (s. Tab. 2, Abb. 2)

1 EINLEITUNG

Selektine sind multifunktionale Adhäsionsrezeptoren und stellen den primären Kontakt zwischen zirkulierenden Leukozyten und Endothelzellen her (Patel et al., 2002, Sperandio, 2006, Hyduk and Cybulsky, 2009, Kaplanski et al., 1994, Zarbock et al., 2008). Endothelständige P- und E- Selektine binden an PSGL-1 bzw. ESL (*E-selectin ligand*) auf adhärenen Leukozyten und steuern unter anderem die Aktivität von Beta2-Integrinen (Hidalgo et al., 2009, Piccardoni et al., 2001, Hyduk and Cybulsky, 2009, Weninger et al., 2000, Hidalgo et al., 2007, McEver and Cummings, 1997). Leukozytäres L-Selektin ermöglicht eine Membranvorwölbung während der Rekrutierung, eventuell besteht über die Verbindung von Zytoskelett zu Endothelzellen ein Zusammenhang mit der Ausbildung invasiver Filopodien (Hidalgo et al., 2009, Barreiro et al., 2007, Kaplanski et al., 1994). (s. Tab. 2)

	Lokalisation	Ligand	Funktion
P-Selektin	Endothel, aktivierte Thrombozyten	PSGL-1, ESL	Zelladhäsionsmolekül, initiale Anheftung von Monozyten und PMNs, Rollen, Regulation der Aktivierung von LFA-1 und MAC-1 auf adhärenen Leukozyten
E-Selektin	Endothel als Antwort auf Zytokin-stimulation (TNF-alpha oder IL-1beta)	PSGL-1, ESL	Adhäsionsrezeptor initiale Anheftung und Rollen, Regulation der Aktivierung von LFA-1 und MAC-1 auf adhärenen Leukozyten, Vernetzung mit dem Aktin-Zytoskelett
L-Selektin	PMNs, Monozyten, einige Untergruppen von T-, B- und NK-Zellen	PSGL-1	Vorwölbung der Membran während der Rekrutierung, interleukozytäre Wechselwirkungen über die Bindung verschiedener glykosylierter, fucosylierter, sulfatierter Glykoproteine wie CD34, Vermittlung von <i>Rolling</i>

Table 2: Selektine, ihre Liganden und ihre Funktion im Rahmen der Leukozytenmigration (zusammengefasst nach Piccardoni et al., 2001, Sperandio, 2006, Barreiro et al., 2007, Hidalgo et al. 2009, Hidalgo and Frenette, 2009, Zarbock et al., 2008, Schmidt et al., 2003, Maugeri et al., 2009, Simon et al., 2000, Ryan and Worthington, 1992, Nicholson, 2002, Affymetrix Ebioscience, 2014, McEver and Cummings, 1997)

Die feste Anhaftung wird durch Integrine, vor allem Alpha4- und Beta2-Integrine auf dem Leukozyten und Immunglobuline auf dem Endothel (zum Beispiel ICAM-1) induziert (s. Tab. 3, Abb. 2). Ausschlaggebend hierfür ist, dass der rollende Neutrophile Granulozyt Chemokine auf dem Oberflächenendothel entdeckt und hierdurch aktiviert wird. (Hyduk and Cybulsky, 2009)

1 EINLEITUNG

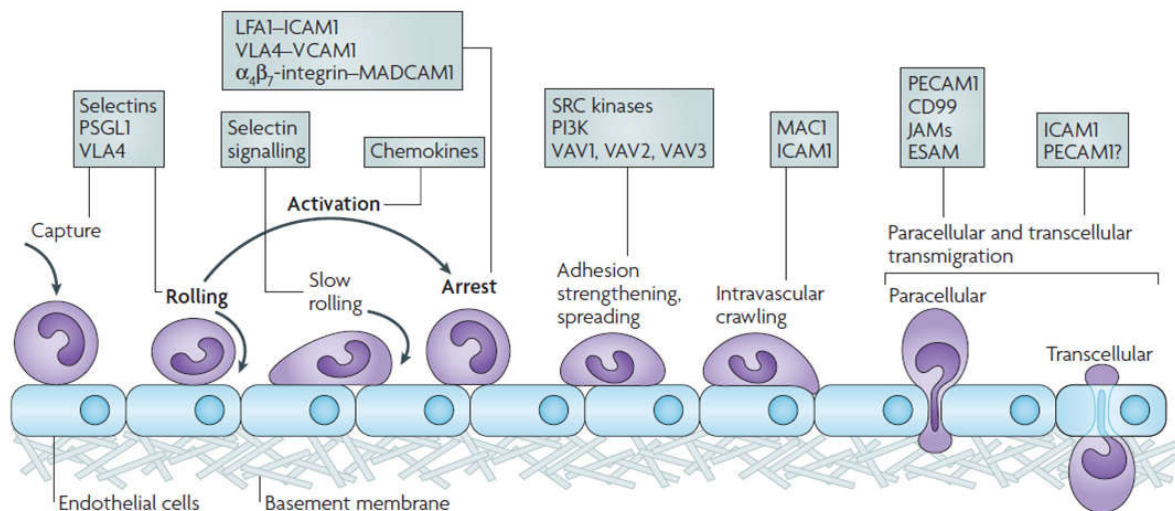
Integrine schließen die extra- und intrazelluläre Umgebung zusammen, integrieren sie (Wang, 2012). Sie bestehen je aus nicht kovalent verbundenen Alpha- und Beta-Ketten und verfügen über große extrazelluläre Domänen, transmembranöse Segmente und kurze intrazelluläre Fortsätze (Lefort and Ley, 2012, Springer and Dustin, 2012, Wang, 2012). Zu den klassischen Beta2-Integrinen gehören Alpha L Beta2 (LFA-1, *lymphocyte function associate antigen*, CD11a/CD18) und Alpha M Beta2 (Mac-1, *Macrophage-1-Antigen*, *complement receptor* CR3, CD11b/CD18). Mit der Folge einer Affinitätssteigerung gegenüber ICAM-1 (-2 und -3) (*intercellular adhesion molecules*) erfolgt die Bindung auf dem Endothel. Hierdurch wird der Zelle die Fähigkeit gegeben, sich gegen die Scherkräfte, die der Blutfluss auf sie ausübt, fest an die entzündlichen Endothelstellen anzuheften. (Dixit et al., 2012, Hynes, 2002)

VLA-4 (*Very late antigen-4*) ist ein Alpha4 Beta1-Integrin, das sich aus den Untereinheiten CD49d und CD29 zusammensetzt und mit dem Endothelzellliganden VCAM-1 zur Adhäsion von Monozyten und Lymphozyten führt. VLA-4 gilt als ein Schlüsselintegrin in der Wanderung von Lymphozyten. Seine Aktivierung findet an der führenden Seite von polarisierten T-Zellen statt und ist limitierend bei deren Migration auf VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*). Ein möglicher Ligand ist JAM-B. (Hyun et al., 2009, Hyduk and Cybulsky, 2009). (s. Tab. 3)

Die der Immunglobulinsuperfamilie zuzuordnenden ICAMs werden in zwei Untergruppen eingeteilt, ICAM-1/CD54 und ICAM-2/CD102. ICAM-1 ist auf einer Vielzahl von vaskulären Endothelzellen, Hautfibroblasten und Mukosaepithelzellen dauerhaft oder situationsunabhängig vorhanden. (Long, 2011, Huang et al., 2006, Lehmann et al., 2003) ICAM-2 hingegen findet sich vor allem im Bereich der Zellverbindungskomplexe (Huang et al., 2006). Beiden gemeinsam ist die Fähigkeit Beta2-Integrine und damit Leukozyten zu binden (Lehmann et al., 2003). (s. Tab. 3)

Es konnte gezeigt werden, dass Scherkräfte obligat für eine für die Migration nötige chemokinbedingte GTPase-gesteuerte Aktivität der Integrine sind (Alon and Feigelson, 2009, Zwartz et al., 2004). Chemokine werden bei einer Entzündung an die Endotheloberfläche gebracht und aktivieren unter anderem das Aktinremodelling (Massena et al., 2010, Alon and Shulman, 2011).

1 EINLEITUNG



(Ley et al., 2007)

Abbildung 2: Ablauf der leukozytären Migrationskaskade. Die Migrationsschritte werden durch verschiedene Moleküle auf Seiten der Leukozyten wie auch der Endothelzellen vermittelt. Tethering oder "Fangen" der Zelle, selektinvermitteltes Rollen, langsames Rollen, feste Adhärenz, intravaskuläres Crawling, Diapedese (parazelluläre Transmigration, transzelluläre Migration); möglicherweise wird die Migration entlang des chemotaktischen Gradienten über kollagenbindendes Integrin vermittelt (zusammengefasst nach Ley et al., 2007, von Andrian and Mackay, 2000, Sixt et al. 2006)

Damit Leukozyten ins Gewebe gelangen können, müssen sie das Endothel überqueren. Die transendotheliale Migration oder Diapedese bezeichnet die Auswanderung der Leukozyten aus den kleinen Blutgefäßen und wird durch Wechselwirkungen zwischen leukozytären Liganden und Adhäsionsmolekülen der Endothelzellen vermittelt. Darüber hinaus benötigt der Leukozyt Pseudopodien, die über die endotheliale Grenze hinausreichen. Ihre Ausbildung wird über Integrine und das Zytoskelett gesteuert. Leukozyten müssen polarisieren, ihr Zytoskelett an der führenden Seite rasch abbauen und es, auf der anderen Seite des Endothels angekommen, wieder zusammensetzen. (Wehrle-Haller and Imhof, 2002, Sanchez-Madrid and del Pozzo, 1999, Imhof et al., 1997, Imhof and Aurrand-Lions, 2004, Muller, 2003, Shulman et al., 2009)

Die enge Verbindung der Endothelzellen wird über verschiedene Proteine hergestellt, die einen stabilen Komplex bilden und darüber die Überquerung von Zellen über diese Barriere steuern (Ley et al., 2007). (s. Tab. 3)

Die Verstreibungen zwischen den Endothelzellen werden durch Okkludin (*Tight Junction/Zonula Occludens*), VE-Cadherin/CD144 und Integrine (Adhärenzverbindung/Desmosom)

1 EINLEITUNG

gebildet (Nawroth et al., 2002, Corada et al., 2002, Feldman et al., 2005, Furuse et al., 1993, Beninghoff and Drenckhahn, 2003).

Die parazelluläre Migration erfolgt zwischen zwei Endothelzellen und erfordert eine vorübergehende Bildung von Lücken. Durch diese engen Öffnungen müssen sich die Leukozyten „zwängen“. Im Anschluss daran wird die Kontinuität des Endothels sofort wieder hergestellt, und es strömt nur eine geringe Menge an sonstigen Blutbestandteilen aus. (Kaplanski et al., 1994, Huang et al., 1988, Mamdouh et al., 2009)

Mit Bezug auf aktuelle Studien scheint der Hauptmechanismus für die Überquerung der Endothelbarriere parazellulär zu sein (Kvietys and Sandig, 2001, Phillipson et al., 2006, Schenkel et al., 2004). Es gibt aber ebenso Hinweise dafür, dass ein transzellulärer Weg (durch die Endothelzellen hindurch) gewählt werden kann (Carman and Springer, 2004, Feng et al., 1998).

Beide Migrationswege scheinen durch ähnliche molekulare Mechanismen beeinflusst zu werden. So blockierten Antikörper gegen PECAM-1 und CD99 in den Untersuchungen von Mamdouh et al. (2009) sowohl die parazelluläre als auch die transzelluläre Migration von Leukozyten. (Mamdouh et al., 2009)

Eine Rolle für die Transmigration von Leukozyten spielen ESAM (*Endothelial cell-selective adhesion molecule*), PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), CD99, JAMs (*Junctional adhesion molecules*) und ICAM-1 (Ley et al. 2007). (s. Abb. 2)

JAM-A, -B und -C sind an der Bildung von *Tight Junctions* zwischen Endothelzellen und an der leukozytären Migration beteiligt (Weber et al., 2007, Bradfield et al., 2007, Ludwig et al., 2009). Nach Chemokinstimulation können sie aus den Zellverbindungen an die Endotheloberfläche wandern und dort in Wechselwirkung mit anderen Molekülen treten (Weber et al., 2007, Bixel et al., 2007, Cera et al., 2009). Potentielle Bindungspartner der *Junctional adhesion molecules* sind mitunter LFA-1, VLA-4 und Mac-1. (s. Tab. 3)

CD99 auf Endothelzellen und Leukozyten bindet homophil und beeinflusst die Migration von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten wie auch die lymphozytäre Rekrutierung (Bixel et al., 2007, Schenkel et al., 2002, Bixel et al., 2004, Gazit et al., 2004). (s. Tab. 3)

CD99L2 (*CD99 antigen like-2*), das vor allem in neuronalen Zellen vorkommt, ähnelt CD99 bezüglich seiner Struktur, eine Beteiligung an der leukozytären Migrationskaskade wäre denkbar (Suh et al., 2003, Bixel et al., 2007).

ESAM befindet sich auf endothelialen *Tight Junctions* und aktivierungsassoziiert auf Thrombozyten. Es interagiert mit unterschiedlichen Liganden und wird in einen

1 EINLEITUNG

Zusammenhang mit der leukozytären Migration gebracht. (Nasdala et al., 2002, Wegmann et al., 2006). (s. Tab. 3)

PECAM-1/CD31 wird auf Monozyten, Neutrophilen Granulozyten, naiven T-Lymphozyten, Thrombozyten und vaskulären Endothelzellen exprimiert. Es kann homophile und heterophile Bindungen (mit Alpha V Beta3-Integrinen) eingehen und vermittelt unter anderem die Rekrutierung und Auswanderung von Neutrophilen Granulozyten. (Chosay et al., 1998, Muller, 2003, Nakada et al., 2000, Piali et al., 1995, Sun et al., 1996, Varon et al., 1998) (s. Tab. 3)

Endothel	Leukozyt
ICAM-1, ICAM-2, JAM-C	MAC-1
ICAM-1, ICAM-2, JAM-A	LFA-1
ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1	CD 11c
VCAM-1, JAM-B	VLA-4
JAM-A	LFA-1, JAM-A
JAM-B	VLA-4
ESAM	unspezifisch auf Neutrophilen und Monozyten
PECAM-1	PECAM-1, Integrine
CD99	CD99
CD99L2	Eventuell Integrine

***Tabelle 3:** Integrine und endotheliale Verbindungsmoleküle die an der leukozytären Migration beteiligt sind mit möglichen Liganden (zusammengefasst nach Ley et al., 2007, Bixel et al., 2007, Xie et al., 1995, Staunton et al., 1989, Dejana, 2004, Wegmann et al., 2006, Muller, 2003, Imhof and Aurrand-Lions, 2004, Ley, 2007, Ley and Parnham, 2007, Nakada et al., 2000)*

Auf der Außenseite des Gefäßes angekommen bewegen sich die Leukozyten amöboid, gesteuert durch einen Gradienten chemotaktischer Signale, zum Ort des Geschehens (Klinke et al., 2005, Sixt et al., 2006, Schmidt et al.2003).

1.4 Crawling

1.4.1 Das Bewegungsphänomen des Crawlings

Das intravaskuläre Crawling ist der transendothelialen Migration unmittelbar vorgeschaltet und wird vermutlich durch Beta2-Integrine vermittelt (Ley et al., 2007, von Andrian and Mackay, 2000, Sixt et al. 2006). Die genauen Mechanismen des Crawlings sind jedoch noch nicht ausreichend verstanden und stellen den Hauptaspekt dieser Arbeit dar.

Bereits 1979 zeigten Chang et al., dass Lymphozyten im Zusammenhang mit Fibroblasten in Kultur eine Art Crawling (Krabbeln, Kriechen) betrieben. Die Autoren vermuteten, dass

1 EINLEITUNG

dieses Bewegungsphänomen den Lymphozyten dazu dienen könnte zelloberflächengebundene Antigene zu untersuchen oder mit der Transmigration in Zusammenhang stehen könnte. (Chang et al., 1979)

Durch Schenkel et al. wurde Crawling 2004 als zusätzlicher Schritt im Verlauf der monozytären Migrationskaskade beschrieben und später als intraluminales Crawling bezeichnet. In vitro krabbelten menschliche Monozyten von der Stelle, an der sie fest anhafteten, über die Endotheloberfläche zu einer Einmündungsstelle und transmigrierten im Anschluss daran (Schenkel et al., 2004, Wong et al., 2010).

Weitere Beobachtungen wurden in vivo im Entzündungsmodell des Musculus Cremaster gemacht. Bereits adhärente Zellen polarisierten und begannen sich aktiv auf der entzündlichen Endotheloberfläche zu bewegen. Diese Bewegung fand in verschiedenen Richtungen und Formen unabhängig von der Blutflussrichtung statt. (Phillipson et al., 2006, Ryschich et al., 2006, Wojciechowski and Sarelius, 2005) (s. Abb. 3)

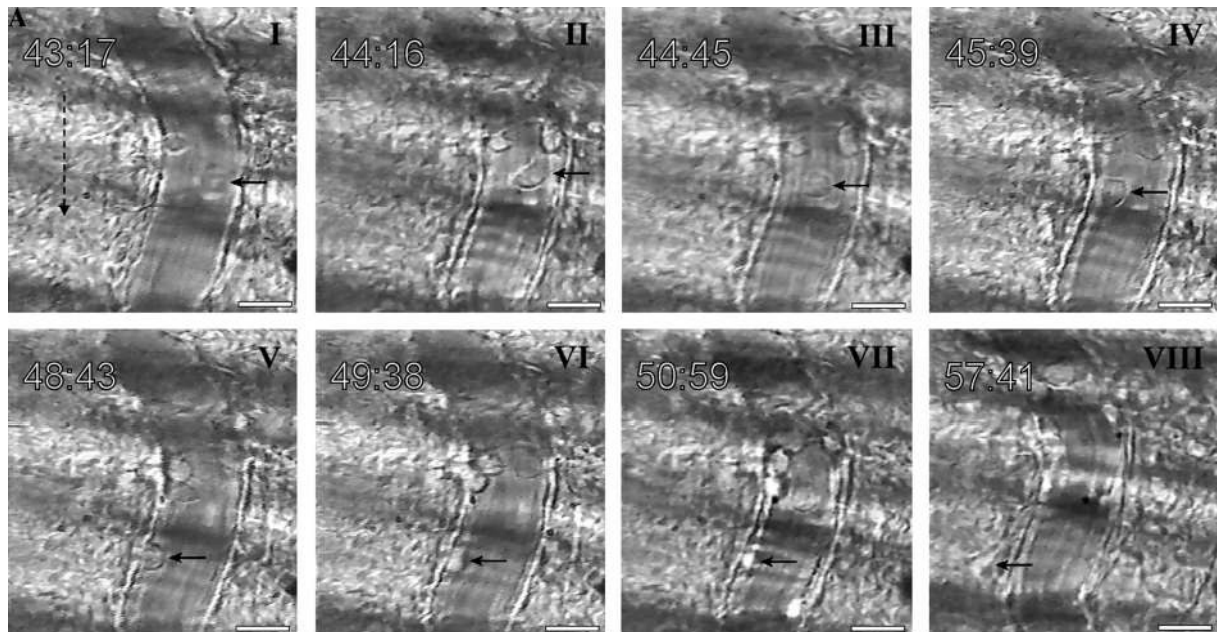
Intravasales Crawling ist ein gerichteter Prozess mit typischen Bewegungsmustern und einer Geschwindigkeit von etwa $10\mu\text{m}/\text{min}$, vergleichbar mit der der interstitiellen Migration ($9,9\pm 4,5\mu\text{m}/\text{min}$). Demgegenüber steht eine Geschwindigkeit von $16\mu\text{m}/\text{sec}$ rollender Leukozyten. (Ryschich et al., 2006)

Diese Erkenntnisse helfen zu realisieren, warum Crawling erst durch die Verwendung der Langzeit-*Time Lapse* (Zeitraffer)–Mikroskopie beobachtet werden konnte.

Im Gegensatz zur interstitiellen Migration von Leukozyten scheint die intravaskuläre Rekrutierung integrinabhängig zu sein und maßgeblich durch Scherkräfte reguliert zu werden (Kim and Sarelius, 2004, Alon and Ley, 2008).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass rekrutierte Leukozyten verschiedener Subpopulationen in Venolen über eine beachtliche Strecke crawlten, bevor sie transmigrierten (Phillipson et al., 2009, Phillipson et al., 2006, Wojciechowski and Sarelius, 2005, Auffray et al., 2007).

Zur Charakterisierung der Crawlingbewegung wurden durch Auffray et al. 2007 unterschiedliche Muster beschrieben: *loop*, *hairpin*, *wave*, *mixed (pattern)*, *line* und *short (path)* ($<40\mu\text{m}$). (s. Abb. 15)



(Phillipson et al., 2006)

Abbildung 3: Langzeit-Zeitraffer-IVM-Aufnahmen des intravaskulären Crawlings von Leukozyten im M. Cremaster-Modell nach Stimulation mit dem Chemokin MIP-1. Sichtbar ist eine bereits adhärenzte Zelle, die beginnt sich entlang des Endothels senkrecht zum Blutfluss zu bewegen und so eine Stelle sucht, um aus dem Gefäß zu transmigrieren. Im Anschluss daran befindet sich die Zelle im Gewebe. Diese Bewegung ist langsamer als die des Rollens und erfordert daher eine längere IVM-Aufnahmedauer (-->kennzeichnet den Blutfluss) (Phillipson et al., 2006)

1.4.2 Unterschiedliche Formen des Crawling leukozytärer Populationen

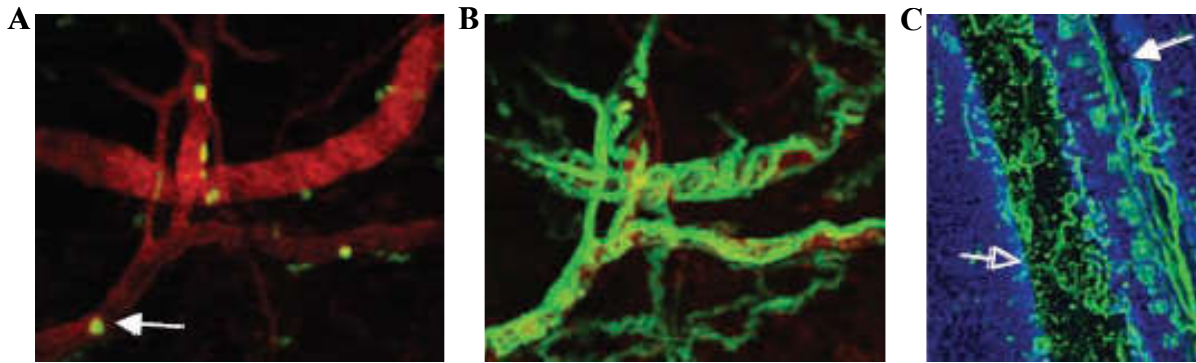
Die Einzelschritte der Migrationskaskade finden nicht ausschließlich in entzündetem Gewebe statt. In Untersuchungen konnte anhand des M. Cremaster-Modells beobachtet werden, dass in postkapillären Venolen ohne zusätzlichen Entzündungsreiz Neutrophile Granulozyten adhärenz wurden (Wojciechowaki and Sarelius, 2005). Allerdings ist hierbei wegen der chirurgischen Manipulation im Rahmen der Präparation keine klassische *Steady-State*-Situation (physiologische entzündungsfreie Bedingungen ohne artefizielle Veränderungen) gegeben. Entsprechende in vitro-Versuche an unstimuliertem, einschichtigem Endothel aber auch in vivo-Versuche an Mesenterium und Ohr zeigten, dass Monozyten eine Art konstitutives Crawling ohne vorangegangene Entzündungsreize betreiben können (Schenkel et al., 2004, Auffray et al., 2007, Hickey and Kubes, 2009). (s. Abb. 4)

Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass unter Monozyten eine gewisse Heterogenität herrscht (Gordon and Taylor, 2005).

Es gibt drei humane und zwei murine Subpopulationen, deren Einteilung auf ihrem Phänotyp und ihrer individuellen Zytokinproduktion beruht. Obwohl es Unterschiede zwischen menschlichen und murinen Monozyten zum Beispiel in Bezug auf MHC II (*Major*

1 EINLEITUNG

histocompatibility complex) gibt, können auch menschliche in Untergruppen unterteilt werden, die in Größe, Granularität, Adhäsionsmolekül- und Chemokinrezeptorexpression teils mit den murinen übereinstimmen. (Geissmann et al., 2003, Wong et al., 2012, Shantsila et al., 2011, Appleby et al., 2013, Auffray et al., 2007, Auffray et al., 2009b, Strauss-Ayali et al., 2007)



(Auffray et al. 2007)

Abbildung 4: Intravitalmikroskopische Crawlingaufnahmen: Darstellung des Weges crawlender residenter Monozyten (Time-Lapse-Mikroskopie) in Gefäßen von Haut (A, B) und Mesenterium (gefüllter Pfeil-Arterie, ungefüllter Pfeil-Vene) (C) (Auffray et al. 2007)

Bei der auch von uns verwendeten Mauslinie CX3CR1 eGFP/+, in welcher Monozyten GFP (*green fluorescent protein*) im Fraktalkinerezeptor exprimieren, können hoch-GFP-exprimierende und niedrig-GFP-exprimierende Monozyten voneinander unterschieden werden (Auffray et al., 2007, Geissmann et al., 2003, Palframan et al., 2001). Die Untergruppen differieren auch in der Expression bestimmter Oberflächenmarker, Chemokinrezeptoren und ihrer genauen Funktion (Geissmann et al., 2003, Sunderkotter et al., 2004, Strauss-Ayali et al., 2007, Geissmann et al., 2008, Hyduk and Cybulsky, 2009). Die GFP-*high*-Fraktion (Gruppe der residenten Monozyten) crawlt unter *Steady-State*-Bedingungen (Auffray et al., 2007). Dies wird dahingehend interpretiert, dass diese Zellen des angeborenen Immunsystems eine bisher noch nicht genauer differenzierte Überwachungsfunktion im Rahmen der Krankheitsabwehr erfüllen (Hickey and Kubes, 2009, Auffray et al., 2007). Sie werden als ortsansässig (*resident*) bezeichnet, da sie sowohl in entzündetem als auch in nicht entzündetem Gewebe anzutreffen sind (Auffray et al., 2007, Hickey and Kubes, 2009). Sie sind langlebiger als ihr Pendant und exprimieren vermehrt CX3CR1/Fraktalkinerezeptor, kaum andere Chemokinrezeptoren, Gr-1 und L-Selektin (Hyduk and Cybulsky, 2009, Hickey and Kubes, 2009, Geissmann et al., 2003).

Residente Monozyten können unabhängig von der Blutflussrichtung, teils über lange Strecken und über geraume Zeit (bis mehrere Stunden) im *Steady-State* über das Gefäßendothel

1 EINLEITUNG

krabbeln (Auffray et al., 2009b). Nach dem Setzen eines inflammatorischen Stimulus crawlen sie jedoch nur kurz in Venolen und transmigrieren dann (Hickey and Kubes, 2009).

Die sogenannten inflammatorischen (niedrig-GFP-exprimierenden/Gr-1+) Monozyten scheinen unter entzündungsfreien Bedingungen nur eine begrenzte Dauer zu leben und enthalten reichlich L-Selektin, PSGL-1 und Chemokinrezeptoren (wie CCR2, MCP-1/CCL2), aber wenig CX3CR1/Fraktalkinerezeptor (Hyduk and Cybulsky, 2009, Geissmann et al., 2003, Auffray et al., 2007). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass diese Population in der Leber nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*, *Plasmodium chabaudi* oder *Toxoplasma gondii* im Stande war, zum Beispiel TNF-alpha zu produzieren oder die Bereitstellung von Effektor-T-Zellen zu fördern und so zur Elimination der Pathogene beizutragen (Saha and Geissmann, 2011, Barbalat et al., 2009, Dunay et al., 2008, Sponaas et al., 2009).

Während niedrig-GFP-exprimierende "Entzündungsmoноzyten" in erster Linie rollen, crawlen hoch-GFP-exprimierende residente Monozyten vornehmlich über weite Strecken und gelangen bei Bedarf schnell ins Gewebe, um dort zu Makrophagen zu differenzieren (Auffray et al., 2007, Auffray et al., 2009b). Da es auch die ortsansässigen Monozyten waren, die zuerst Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor, Chemokine und Interleukin-1 ausschütteten, könnten sie auch über ihre unmittelbaren Aufgaben im Rahmen der frühen Entzündungsantwort hinaus maßgeblich an der Rekrutierung anderer Effektorzellen wie PMNs und Entzündungsmoноzyten beteiligt sein. (Auffray et al., 2007, Hickey and Kubes, 2009, Auffray et al., 2009b)

Residente Monozyten crawlen mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 12µm/min, nachdem sie integrin- und CX3CR1-vermittelt fest an das Endothel gebunden haben (Auffray et al., 2007, Auffray et al., 2009b).

Durch Sumagin et al. wurden 2010 Monozyten und Neutrophile Granulozyten in unstimuliertem und stimuliertem Zustand verglichen. In unstimulierten Venolen wurden signifikant mehr Monozyten als Neutrophile Granulozyten adhären (58% vs. 14%). Diese Zahlen konnten durch die Gabe von TNF-alpha erhöht werden. (Sumagin et al., 2010)

Da diese Untersuchungen am M. Cremaster stattfanden, kann hier postuliert werden, dass es bisher keine Daten zum Crawling von Neutrophilen Granulozyten unter *Steady-State*-Bedingungen im entsprechenden nativen und nicht verletzten Gewebe gibt.

Das T-Zell-*Homing* in Lymphknoten wurde ebenso als ein mehrstufiges Modell, das auf der Wechselwirkung zwischen Lymphozyten und Endothelzellen und den exprimierten Oberflächenmolekülen beruht, beschrieben (Stein et al., 2000, Warnock et al., 1998).

1 EINLEITUNG

Optional ICAM-1-abhängiges intraluminales Crawling von T-Zellen in hochendothelialen Venolen fand im Vorfeld der schnellen ICAM-1- und ICAM-2-abhängigen Diapedese statt (Boscacci et al., 2010). Soriano et al. stellten 2011 eine Einschränkung des Crawlings von T-Lymphozyten auf chemokinbedeckten Endothelzellen nach ROCK (*Rho-associated coiled coil containing protein kinase*)-Hemmung fest.

Shulman et al. zeigten 2009 in vivo und in vitro crawlende T-Lymphozyten in Lymphknoten. Hierbei führten chemokine Signale auf Endothelzellen zu einer punktförmigen Anhäufung von LFA-1. Dies bedingte eine Ansammlung von ICAM-1 und folglich die Ausbildung von Filopodien und unterstützte darüber lymphozytäres Crawling. Scherkräfte steigerten die Ausbildung von Filopodien dieser crawlenden T-Lymphozyten. (Shulman et al., 2009) (s. Abb. 6)

1.4.3 Regulatoren des Crawlings

Mechanismus und Regulation dieses neuen Schritts genauer zu verstehen waren Inhalt dieser Arbeit. Es wird vermutet, dass Integrine im Zusammenspiel mit ihren endothelseitigen Liganden wie ICAM-1, ICAM-2 und VCAM das Crawling leukozytärer Subpopulationen steuern. So scheint die Aktivierung von Integrinen obligat für Charakteristika und Erfüllung diverser leukozytärer Funktionen, zum Beispiel des Rollens und Crawlens (Herter et al., 2013).

1.4.3.1 Die Rolle von Integrinen: *Inside-out*- und *Outside-in*-Signalwege

Integrine sind eine große Gruppe von Adhäsionsrezeptoren, die maßgeblich an der Anheftung von Zellen aneinander beteiligt sind. Sie befinden sich auf der Zelloberfläche in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen drei Anpassungszuständen (Kim et al., 2011a, Springer and Dustin, 2012). Da dieses Gleichgewicht auch die zytoskelettale Neuorganisation beeinflusst, scheint es wichtig zum Beispiel für die Festigung der Anhaftung und das intraluminale Crawling zu sein, also Schritte die im Anschluss an die primäre Adhäsion stattfinden (Pick et al., 2013, Abram and Lowell, 2009, Kim et al., 2011a, Springer and Dustin, 2012).

Auf zirkulierenden Leukozyten befinden sich Integrine in einem Zustand niedriger Affinität, erst über die Bindung löslicher Partner wie Chemokine, Wachstumsfaktoren oder T-Zell-Rezeptoraktivierung kommt es zu ihrer Aktivierung (Sixt et al., 2006). So können die Adhäsionsrezeptoren sensibilisiert werden und ihre Konformation und damit ihre Affinität für extrazelluläre Liganden ändern, woraufhin über ein transmembranöses Zusammenspiel die

1 EINLEITUNG

Ligandenbindungsfunktion der Integrine aktiviert wird (Kim et al., 2011a, Hu and Luo, 2013, Lefort and Ley, 2012, Zhang and Wang, 2012, Sixt et al., 2006).

Erst aktiviertes LFA-1 und aktiviertes Mac-1 haben die Möglichkeit ihre endothelialen Liganden ICAM-1 und VCAM-1 zu binden, G-Protein-gekoppelt führt das Signal letztendlich zu einer primären festen Adhäsion des Leukozyten (Alon and Shulman, 2011, Shulman et al., 2009).

Integrine haben die besondere Fähigkeit, Signale in zwei entgegengesetzte Richtungen über die Plasmamembran zu übertragen (Luo et al., 2007, Kawamoto et al., 2012).

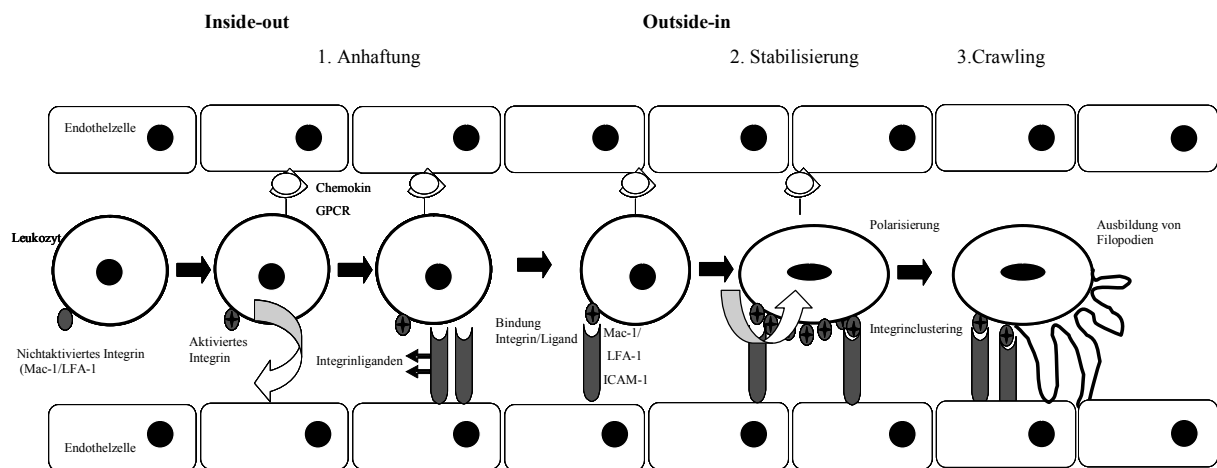


Abbildung 5: Inside-out- und Outside-in-Signalwege. Im Rahmen des Inside-out führt ein zellulärer Stimulus über intrazelluläre Signalwege zu einer Aktivierung des Integrins. Leukozytäre GPCRs binden an endotheliale Chemokine. Durch die nachfolgende Aktivierung der Integrine können diese an das Endothel binden. Der Leukozyt kann am Endothel anhaften. Der Outside-in-Signalweg bedingt eine erhöhte Affinität für Liganden durch Bindung an außenliegende Integrindomänen. Nach einer Anhäufung aktivierten Integrins kommt es zur Ausbildung von Filopodien, die Anheftung am Endothel wird stabilisiert, die Zelle polarisiert und beginnt zu crawlen (zusammengefasst nach Qin et al., 2004, Moser et al., 2009, Kim et al. 2011a, Dixit et al., 2012, Lefort and Ley, 2012, Montresor et al. 2012, Shen et al., 2012, Springer and Dustin, 2012, Wang, 2012, Zhang and Wang, 2012, Hu and Luo, 2013)

Die Bezeichnung *Inside-out* (Signalgebung von innen nach außen) bezieht sich auf den Signalweg, bei dem ein zellulärer Stimulus über intrazelluläre Signalwege zu einer Aktivierung des Integrins führt (Lefort and Ley, 2012).

Im Anschluss kommt es zu einem Stabilisierungsprozess der leukozytären Anheftung am Endothel. Die hierfür nötige Aktivierung findet von außen nach innen statt (*Outside-in*). Die Antwort der Zelle wird nach Bindung von bereits aktivierten und zwischenzeitlich immobilisierten Liganden einer anderen Zelle oder in der extrazellulären Matrix gebundenen Integrine vermittelt. (Lefort and Ley, 2012, Shulman et al., 2009) (s. Abb. 5)

1 EINLEITUNG

Sowohl *Inside-out* als auch *Outside-in* gründen auf G-Proteinen und verwenden Calcium als *second messenger* (sekundärer Botenstoff) (Dixit et al., 2012 Shen et al., 2012, Hu and Luo, 2013).

Zusammenfassend kommt es primär zur Bildung eines lokalen Adhäsionskomplexes und Aktivierung stromabwärts gelegener Signalwege durch eine Kraftumwandlung über die Membranhäufung hochaffiner (HA-) Integrine (*Clustering*), die nach leukozytärem Rollen und Anhalten unter den hydrodynamischen Kräften des Blutflusses initiiert wird. Dies führt zu einer Aktivierung des Zytoskeletts mit Polarisierung der Zelle, Ausbildung von Filopodien, zum Crawling und schützt den adhären Leukozyten davor, mit dem Blutfluss weggespült zu werden. (Lefort and Ley, 2012, Shulman et al., 2009, Hu and Luo, 2013, Dixit et al., 2012) (s. Abb. 5)

So sind es die transmembranösen Integrinrezeptoren, die das Aktinmyosinskelett dynamisch mit der extrazellulären Umwelt verbinden. Das heißt auch, dass transmigrierende Leukozyten diese Adhäsionsmoleküle zwangsläufig brauchen, um sich amöboid über Oberflächen zu bewegen. (Lammermann et al., 2008, Muller, 2003)

Wichtig für die Analyse der leukozytären Migration ist die Kenntnis über die verschiedenen Folgen, die abhängig von der Wahl eines Interventionspunktes entstehen. Wird der *Inside-out*-Signalweg modifiziert, wird die Kaskade zum Zeitpunkt des initialen Arrests unterbunden. Wird hingegen die *Outside-in*-Phase blockiert, kann der Leukozyt zwar anhalten, wird sich aber im Anschluss wieder vom Endothel lösen. Das heißt, wenn versucht wird die Crawlingregulation zu beeinflussen, indem Signalwege an unterschiedlichen Stellen unterbrochen werden, haben die crawlenden Zellen die Möglichkeit anzuhalten, sich wieder vom Endothel zu lösen oder ihre Geschwindigkeit zu verändern. Hierüber sind verschiedene Einflüsse auch auf das Crawling selbst möglich. (Kim et al., 2011a, Hu and Luo, 2013, Lefort and Ley, 2012, Zhang and Wang, 2012, Dixit et al., 2012, Shen et al. 2012, Hyduk and Cybulsky, 2009, Shulman et al., 2009)

1.4.3.2 Der Einfluss von Mac-1, LFA-1, ICAM-1, Vav-1, mAbp1 und CD18 auf das Crawling

CD11a/LFA-1

Crawling residenter Monozyten scheint vor allem im *Steady-State* LFA-1-abhängig zu sein, eine Schlüsselrolle von intaktem LFA-1 auf unstimulierten Endothelzellen ist beschrieben (Hickey and Kubes, 2009, Schenkel et al., 2004). Auch wurde die Anzahl crawlender Zellen

1 EINLEITUNG

in vivo durch blockierende Antikörper gegen LFA-1 reduziert, residente Monozyten lösten sich unter *Steady-State*-Bedingungen vom Endothel (Auffray et al., 2007). LFA-1 scheint maßgeblich daran beteiligt, dass sich Monozyten auch unter dem Einfluss von Scherkräften am Endothel halten können (Hickey and Kubes, 2009). Von Sumagin et al. wurde 2010 beschrieben, dass auch die gecrawlte Strecke hiervon beeinflusst wird. LFA-1 vermitteltes Crawling war hierbei um die zwei- bis dreifache Distanz länger als durch Mac-1-reguliertes (Sumagin et al., 2010).

In den Untersuchungen von Phillipson et al. 2006 wurden die molekularen Mechanismen neutrophilen Crawlings in entzündlicher Umgebung mit besonderem Augenmerk auf den Einfluss von Beta2-Integrinen untersucht (Hickey and Kubes, 2009, Phillipson et al., 2006). Die Zelladhäsion zeigte sich hierbei abhängig von LFA-1 (Phillipson et al., 2006, Ryschich et al., 2006, Phillipson et al., 2009, Ley et al., 2007). Nach den Ausführungen von Green et al. (2006) wird die Rekrutierung polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyten durch eine Kombination aus Selektinen, G-Protein und Beta2-Integrinen reguliert, wobei der LFA-Affinitätszustand eine entscheidende Rolle spielt. Sie stellten fest, dass ein Wechsel der Affinitätszustände von LFA-1 von mittel zu hoch zur Polarisierung der Zelle führt, wichtig für den Übergang vom Rollen zur scherkraftresistenten Anheftung ist und erst die kontaktvermittelte Signalgebung und damit die Leitung der PMNs in Richtung des entzündlichen Gewebes ermöglicht (Green et al. 2006).

Eine das Crawling im *Steady-State* und die TNF-alpha-induzierte Auswanderung Neutrophiler Granulozyten im M. Cremaster wie auch in der Peritonealhöhle reduzierende Wirkung blockierender Antikörper konnte für LFA-1 nicht gezeigt werden (Green et al., 2006, Sumagin et al., 2010). Jedoch führte die Applikation eines LFA-1-blockierenden Antikörpers in den Versuchen von Phillipson et al., 2009 in über 80% zur Ablösung crawlender Vav^{-/-} - Neutrophiler Granulozyten.

In der Vergangenheit konnte ein Einfluss von LFA-1 auf T-Lymphozyten, getriggert durch Chemokine, die auf dem Endothel exprimiert wurden, gezeigt werden. Diese T-Lymphozyten benötigten unter anderem hochaffines LFA-1, um sich zu polarisieren und die für die Kriechbewegung nötigen Filopodien auszubilden (adhäsiv und invasiv). So konnten sie auf HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) crawlen. (Shulman et al., 2009)

CD11b/Mac-1

Crawling ortsständiger/residenter Monozyten scheint unter *Steady-State*-Bedingungen weitgehend Mac-1-unabhängig zu sein (Auffray et al., 2007, Hickey and Kubes, 2009). So ist

1 EINLEITUNG

eine Antikörpergabe gegen Mac-1 im stimulierten Zustand effektiver als im *Steady-State* die Migration von Monozyten zu reduzieren (Sumagin et al., 2010). In den Analysen von Sumagin et al. (2010) war Mac-1-reguliertes Crawling von Monozyten deutlich kürzer als durch LFA-1-vermitteltes.

Mac-1 reguliert vermutlich auch das Crawling von adhärenenten Neutrophilen Granulozyten (Phillipson et al., 2006, Ryschich et al., 2006, Phillipson et al., 2009, Ley et al., 2007). So reduzierten Antikörper gegen Mac-1 ebenfalls die Geschwindigkeit der Crawlingbewegung bei PMNs, die trotz LFA-1-Defizienz adhärenent wurden (Phillipson et al., 2006). Antikörper gegen Mac-1 vermochten in früheren Untersuchungen Crawling sowohl im *Steady-State* als auch die TNF-alpha-induzierte Auswanderung Neutrophiler Granulozyten im M. Cremaster wie auch in der Peritonealhöhle zu reduzieren (Green et al., 2006, Sumagin et al., 2010).

Vav-1

Vav-1 ist ein Guaninaustauschfaktor, der das Aktinzytoskelett reguliert (Phillipson et al., 2009).

Wildtyp und Vav-1-defizienten Tieren wurden blockierende Antikörper gegen Mac-1 und LFA-1 appliziert, bei Vav-1-Defizienz veränderte sich zwangsläufig die Wechselwirkung mit Mac-1, in Vav-/- *knockout*-Tieren war Crawling Mac-1-unabhängig. Die PMNs zeigten ein passiveres Crawlingverhalten, in erster Linie in Flussrichtung. (Phillipson et al., 2009)

Insgesamt kam es zu Defekten in Neutrophilem Arrest und Crawling und konsekutiv zu einer Minderung emigrierter Zellen in Vav1-defizienten Tieren, woraus die Autoren dieser Studie schlussfolgerten, dass Vav-1 eine entscheidende Rolle in der Wechselwirkung von Mac-1 und LFA-1 spielt, und damit einen Beitrag zur Regulation intraluminalen Crawlings leistet (Phillipson et al., 2009, Woodfin et al, 2010).

CD18 stellt die Beta2-Integrin-Untereinheit dar, die mit CD11a beziehungsweise CD11b zusammen LFA-1 und Mac-1 bildet, eine selektive Blockierung von CD18 führte in der Vergangenheit ebenso zu einem deutlichen Rückgang der Anzahl crawlender Leukozyten.(Ryschich et al., 2006).

CD18-blockierende Antikörper reduzierten signifikant die Anzahl, die Geschwindigkeit und die Strecke leukozytären Crawlings (Shulman et al., 2009, Ryschich et al., 2006, Auffray et al., 2007).

1 EINLEITUNG

ICAMs sind Bindungspartner von LFA-1 und Mac-1. Ryschich et al. beschrieben 2006, dass im Rahmen intravitalmikroskopischer Aufnahmen mesenterialer Venolen nach einer Blockierung von ICAM-1 kaum noch Leukozyten crawlten, wohingegen dieser Effekt bei einer Blockierung von ICAM-2 nicht zu beobachten war. Die Rolle von ICAM-2 in der leukozytären Migration scheint stimuluspezifisch. (Ryschich et al. 2006, Huang et al., 2006) Halai et al. zeigten 2014, dass sowohl eine funktionelle als auch eine genetische Blockade von ICAM-2 die Geschwindigkeit neutrophilen Crawlings reduzieren, die Häufigkeit von Crawling mit verändertem Stop-Start-Profil erhöhen und im Vorfeld der Transmigration die Wechselwirkung zwischen endothelialen Verbindungen verlängern. Insgesamt führte diese Blockade dazu, dass weniger Zellen das Gefäß verließen. (Halai et al., 2014)

Bei einer in vitro-Studie (ohne das Vorhandensein von Scherkräften) konnte gezeigt werden, dass ICAM-2 auch das Crawling von Monozyten beeinflusste. Dies wurde durch die monozytär exprimierte Beta2-Integrine und konstitutionell endothelial exprimiertes ICAM-2 vermittelt. (Hickey and Kubes, 2009, Schenkel et al., 2004)

Der Einfluss von ICAM-1 ist nicht nur quantitativ fassbar. Die Zellen, die nach der Gabe eines spezifischen Antikörpers noch crawlten, taten dies langsamer und über eine kürzere Strecke (Ryschich et al., 2006). Auch in anderen Untersuchungen reduzierte sich leukozytäres Crawlen bei gegebener ICAM-1-Defizienz in KO-Mäusen (Frommhold et al., 2010, Phillipson et al., 2006, Ryschich et al., 2006).

Verschiedene Rollen scheinen ICAMs im Zusammenwirken mit anderen Adhäsionsfaktoren zu spielen. So wurde gezeigt, dass endothelexprimiertes ICAM-2 keinen Einfluss auf Mac-1-abhängiges Crawling von PMNs hatte, ICAM-1 jedoch wurde als Vermittler von deren Mac-1-abhängigem Crawling identifiziert (Phillipson et al., 2009).

T-Lymphozyten benötigten eine Anhäufung von ICAM-1, um sich zu polarisieren und Filopodien auszubilden (adhäsiv und invasiv) und auf HUVEC zu crawlen (Shulman et al., 2009).

Abbildung 6 zeigt die Ausbildung solcher Ausläufer.

mAbp1 (*mammalian actin-binding protein 1*) ist ein Adapterprotein und wird auf einer Vielzahl murinen Gewebes exprimiert (Schymeinsky et al., 2009, Kessels et al., 2000, Larbolette et al., 1999).

Auch mAbp1 beeinflusst das Zytoskelett, indem es über adhäsive Beta2-Integrine eine wichtige Funktion in der Kraftübertragung vom Aktin-Zytoskelett zu extrazellulären Liganden erfüllt, und könnte das Gleichgewicht der Affinitätszustände zwischen Beta2-

1 EINLEITUNG

Integrin-Liganden in Richtung einer gesteigerten Affinität verschieben (Schymeinsky et al., 2009, Schymeinsky et al., 2011). Ebenso besteht die Möglichkeit, dass mAbp1 auch über Beeinflussung der Endozytose der Integrine den intrazellulären Integrinverkehr mit reguliert und so die Wiederverwertung von beispielsweise LFA-1 steigert (Fabbri et al., 2005, Caswell et al., 2009, Schymeinsky et al., 2009). Hepper et al. zeigten 2012 in vitro eine mAbp1-Abhängigkeit Beta2-integrinvermittelter endothelialer Leukozytenausbreitung unter Scherkräfteinfluss, im Gegensatz hierzu war es unter statischen Bedingungen verzichtbar.

1.4.3.3 Der Einfluss von Scherkräften auf das Crawling

Eine Rolle scheint auch die An- beziehungsweise Abwesenheit von Scherkräften zu spielen. (s. Abb. 6)

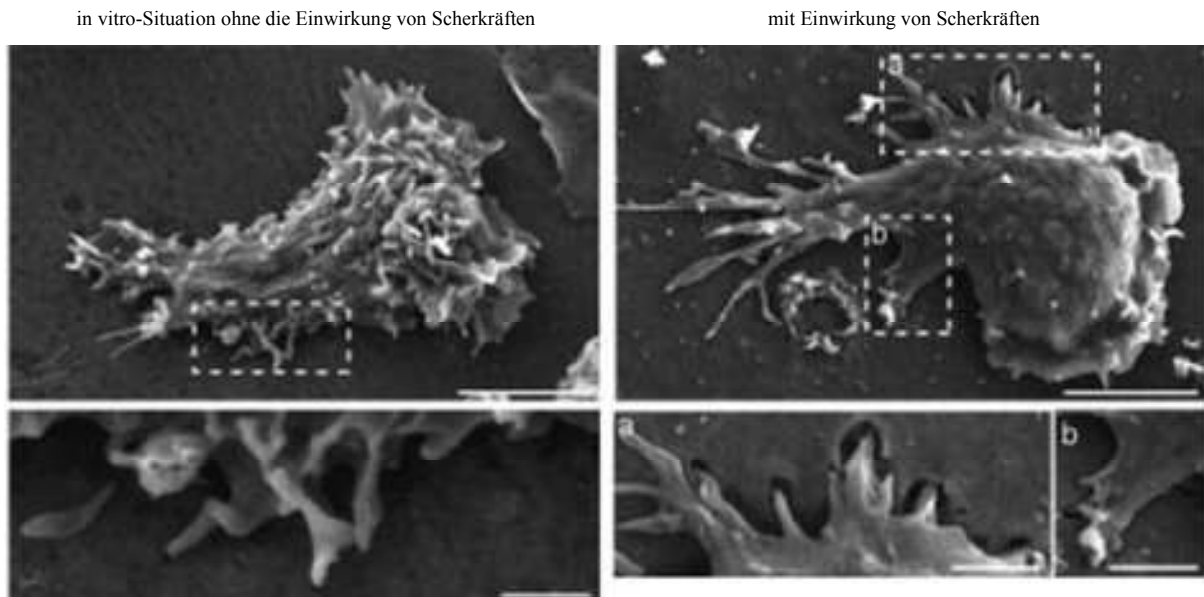
Scherung bezeichnet eine Krafteinwirkung antiparallel zu einer parallelen Oberfläche. So entsteht eine Gleitungskraft. Die tangentielle Schubspannung berechnet sich aus der Scherkraft pro Fläche ($Nm=Pa$). (Balke, 2010, Hyduk and Cybulsky, 2009)

In vitro wurde der Einfluss von Scherkräften auf die Ausbildung von Filopodien an adhärenen ruhenden Lymphozyten gezeigt. Es konnte beobachtet werden, dass sich vermehrt Filopodien unter crawlenden T-Lymphozyten bildeten, wenn Scherkräfte auf sie einwirkten. Umgekehrt wurden invasive Fortsätze unter crawlenden Lymphozyten kaum gebildet, wenn keine Scherkräfte wirkten oder Einschränkungen, bezogen auf Chemokinsignale, bestanden. Da unter diesen Voraussetzungen kaum transendotheliale Migration stattfand, scheint die Häufigkeit der Ausbildung invasiver Filopodien mit einer erfolgreichen Überwindung der endothelialen Barriere assoziiert zu sein. (Shulman et al., 2009, Schreiber et al., 2007, Ward, 2009)

Invasive Filopodien wurden nie auf der führenden Seite von Lymphozyten beobachtet, die bereits das Endothel überquert hatten. Lymphozyten und PMNs ragten mit diesen invasiven Fortsätzen in die Endothelzellen hinein, während sie diese überquerten (Cinamon et al., 2004, Schreiber et al., 2007, Carman et al. 2007). Wenn Lymphozyten und eventuell auch andere Leukozyten letztendlich die parazellulären endothelialen Verbindungen erreicht hatten, nutzten sie diese Fortsätze, um subendothelial gelegene Chemokine zu untersuchen (Weber et al., 1999, Lee et al., 2009, Alon and Shulman, 2011).

Chemokinaktivierte T-Zellintegrine scheinen durch Scherkräfte beeinflusst zu werden (Woolf et al., 2007).

1 EINLEITUNG



(Shulman et al., 2009)

Abbildung 6: T-Lymphozyten auf aktiviertem Endothel. Die Ausbildung von Filopodien setzt die Einwirkung von Scherkräften voraus. Die Bildung dieser Ausläufer ist eine essentielle Voraussetzung für das Crawling von Zellen. (Shulman et al., 2009, Schreiber et al., 2007, Ward, 2009)

1.5 Methoden zur Analyse des Crawlings in vivo

Bei einer großen Menge an Daten über die dem Crawling zugrundeliegenden Mechanismen entstammen diese jedoch unterschiedlichen Versuchsprotokollen. (s. Abb. 7)

Die Abhängigkeit Crawlings von bestimmten Oberflächenmolekülen wurde zum Beispiel an *knockout*-Tieren, nach Vorbehandlung mit einem blockierenden Antikörper oder nach Applikation von Antikörpern im Anschluss an eine intravitalmikroskopische Aufnahme untersucht. Potentielle Fehlerquellen bei diesen Versuchsanordnungen sind der nicht ausschließbare Einfluss anderer Faktoren und die nicht gegebene kontinuierliche Analysierbarkeit der einzelnen crawlenden Zelle.

Um Crawling als Schritt der Migrationskaskade genauer zu analysieren und unsere Fragestellungen zu beantworten, war es nötig, die Versuchsanordnung zur Analyse leukozytären Crawlings zu optimieren und hierfür ein Modell zu etablieren, das eine in vivo-Analyse während physiologischer *Steady-State*-Bedingungen ebenso wie während einer Entzündung zulässt. Bedingung hierfür war, eine Möglichkeit zu entwickeln, einzelne Zellen vor, während und unmittelbar nach der Gabe von blockierenden Antikörpern verfolgen und analysieren zu können (*Single-Cell-Tracking*).

1 EINLEITUNG

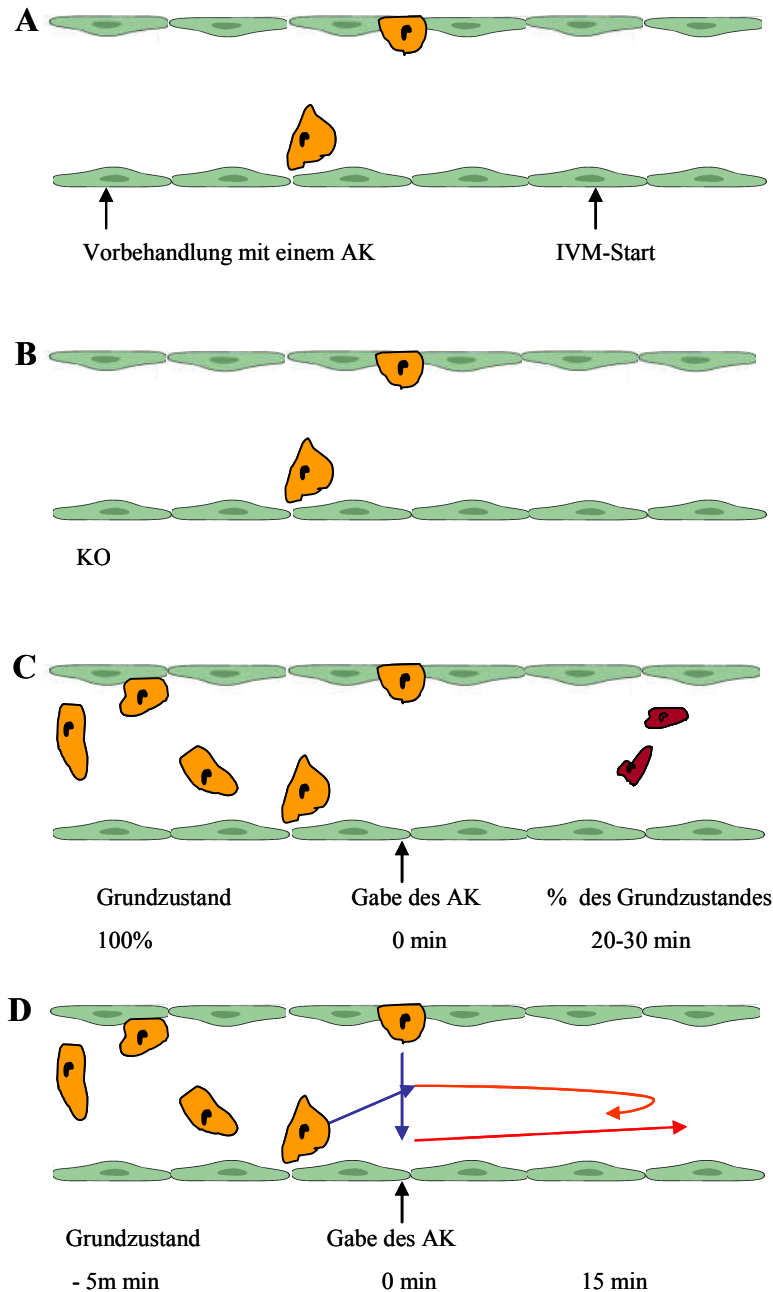


Abbildung 7: Vergleich der verschiedenen Versuchsanordnungen zur Untersuchung des Crawlingphänomens. (A) Vorbehandlung mit blockierenden Antikörpern, vor Beginn der intravitalmikroskopischen Aufnahmen (Phillipson et al. 2006) (B) Verwendung von knockout-Tieren (Phillipson et al. 2006) (C) Gabe von blockierenden Antikörpern nach einer vorangegangenen Aufnahme des Grundzustandes (Phillipson et al., 2009) (D) Versuchsaufbau dieser Studie, durchgehende Intravitalmikroskopie vor/während/nach Applikation des Antikörpers, Single-Cell-Tracking

2 FRAGESTELLUNG UND ZIELE

Um die funktionelle Relevanz und die molekularen Mechanismen des Crawlings besser zu verstehen, sollten im Rahmen dieser Studie folgende Inhalte untersucht beziehungsweise folgende Fragestellungen beantwortet werden.

- Welche Subpopulationen von Leukozyten oder Immunzellen haben unter physiologischen und inflammatorischen Bedingungen die Fähigkeit zu crawlen?
- Welchen Einfluss haben die Art des Versuchsaufbaus und unterschiedliche Fluoreszenzmarker auf das Crawlen von Leukozyten?
- Welchen Einfluss haben physiologische Umgebungsfaktoren wie Blutflussgeschwindigkeit, -richtung, Scherrate und Gefäßgröße auf das Crawlingverhalten von verschiedenen leukozytären Subpopulationen?
- Welche Unterschiede von Crawling gibt es unter physiologischen (*Steady-State*) und inflammatorischen Bedingungen?
- Welche Rolle spielen die Beta2-Integrine Mac-1 und LFA-1 auf den Leukozyten und deren endothelseitiger Ligand ICAM-1 für das Crawling?
- Ein Ziel war darüber hinaus, das *Single-Cell-Tracking*-Protokoll zur Analyse von Crawling *in vivo* zu optimieren und auf diesem Wege die Auswertung der intravitalmikroskopischen Bildgebung zu verbessern.

3 MATERIAL UND METHODEN

Alle Versuche wurden im Labor der experimentellen Erwachsenenkardiologie des Deutschen Herzzentrums in München gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (AZ.55.2-1-54-2531.3-16-09, AZ55.2-1-54-2531.3-46-09).

3.1 Verwendete Tiere

Die Mäuse waren bei den Versuchen zwischen sechs und zwölf Wochen alt und wogen 25-30g. Sie wurden unter Einhaltung des Tag-Nacht-Rhythmus in Käfigen zu zwei bis sechs Tieren gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (SNIFF Spezialdiät, Soest, Deutschland). Für die einzelnen Versuchgruppen wurden männliche und weibliche Tiere folgender Stämme verwendet:

C57BL/6 Wildtypen (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld und Eigenzucht aus der Tierhaltung des Deutschen Herzzentrums München, Lazarettstraße 62, 80636 München). C57BL/6-Mäuse werden in der biomedizinischen Forschung als Hintergrund genetisch veränderter Tiere und als Wildtypkontrollen verwendet (Bourdi et al., 2011, Kamradt et al., 2000).

CX3CR1 eGFP/+ (S. Jung, *Weizman Institute of Science, Department of Immunology*, Rehovot, Israel; Walter Brendel Zentrum für experimentelle Medizin, München; Eigenzucht aus der Tierhaltung des Deutschen Herzzentrums München, Lazarettstraße 62, 80636 München). Dieser Stamm wurde zur Analyse von Monozyten verwendet.

Die CX3C-Chemokinfamilie beinhaltet nur CX3CL1 (gleichbedeutend mit Fraktalkine). Dies ist der einzige Ligand des G-proteingekoppelten 7-membrangebundenen Rezeptors CX3CR1 (Kim et al., 2011b, Jung et al., 2000). Er befindet sich auf unterschiedlichen Zelltypen, zum Beispiel Endothelzellen (Schulz et al., 2007). CX3CR1 wird in murinen Hautwunden durch einwandernde Makrophagen, Myofibroblasten und Endothelzellen exprimiert (Brancato and Albina, 2011). Auf Endothelzellen exprimiertes Fraktalkine vermittelt die Aktivierung und Adhäsion von Leukozyten, die seinen Rezeptor CX3CR1 exprimieren (Hasegawa et al., 2005, Imai et al. 1997).

Bei den verwendeten transgenen heterozygoten Tieren wird das entsprechende Gen durch ein GFP-Gen ersetzt, als Folge exprimieren Monozyten, natürliche Killerzellen und einige T-Lymphozyten GFP im Fraktalkinerezeptor (Kezic et al., 2008, Auffray et al., 2007, Kim et al., 2011b, White et al., 2014).

3 MATERIAL UND METHODEN

LysM eGFP/eGFP (Thomas Graf, *Center of Genomic Regulation*, Barcelona, Spanien; Walter Brendel Zentrum für experimentelle Medizin, München; Eigenzucht aus der Tierhaltung des Deutschen Herzzentrums München, Lazarettstraße 62, 80636 München). In unseren Versuchen wurden homozygote Tiere dieses Stamms zur Analyse von Neutrophilen Granulozyten verwendet.

Durch *knockin* des GFP-Gens in das murine Lysozym M werden myelomonozytäre Zellen *in vivo* mit grünfluoreszierendem Protein markiert. Als Folge dessen exprimieren die meisten myelomonozytären Zellen, vor allem reife Neutrophile Granulozyten, aber kaum andere Zelllinien dieser Tiere grün fluoreszierendes Protein anstelle des LysozymM-Gens. Auch Mäuse, bei denen beide Kopien des LysM-Gens inaktiviert werden, unterscheiden sich in Entwicklung und Fruchtbarkeit nicht von den entsprechenden Wildtypen. (Faust et al., 2000, Schulz et al., 2007)

T-red-high (Thorsten Mempel, Boston; Eigenzucht aus der Tierhaltung des Deutschen Herzzentrums München, Lazarettstraße 62, 80636 München). Dieser Stamm wurde zur Analyse von T-Lymphozyten verwendet.

T-Lymphozyten, einschließlich Effektorzellen dieser Tiere, exprimieren rotfluoreszierendes Protein (RFP). Dies wird erreicht, indem die kodierende FP-Sequenz, kontrolliert durch eine DNA-Sequenz, die das Ablesen eines Gens verstärkt (den murinen *CD4-Promoter*), ohne *Silencer* von Introns und das plasmidische Konstrukt in befruchtete Eizellen injiziert wird. (Mempel et al. 2006, Manjunath et al., 1999)

3.2 Verwendete Reagentien

Färbung, Lösung, Antikoagulation

Acridin Orange und Rhodamin 6G Chlorid wurden zur *in vivo*-Anfärbung von Leukozyten bei Wildtyptieren im Rahmen der Vorversuche verwendet, mittels TRITC und FITC Dextran war es möglich Gefäße darzustellen und so die Mikrozirkulation zu untersuchen. NaCl und DPBS wurden zur Verdünnung beziehungsweise Lösung anderer Reagentien und Ringerlaktatlösung zur Superperfusion des murinen Ohrs während der IVM-Aufnahmen verwendet. Durch Heparin wurde eine Koagulation des entnommenen Blutes bis zur Analyse verhindert. *FluoSperes* ermöglichten die Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeit. Die entsprechenden Bezugsquellen zeigt folgende Tabelle.

3 MATERIAL UND METHODEN

Verwendete Reagentien	Bezugsquelle	Charakteristika
Acridin Orange (Stone and Bradley, 1967, Saetzler et al., 1997, Liu et al. 2014, Fan et al., 2006)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Kationisch, nukleinsäurebindend; Exzitation 470nm, Emission 530-560 nm; Einlagerung in Lysosomen, Endosomen, Golgi-Apparat, Zellkern
Rhodamin 6G Chlorid (Saetzler et al., 1997, Wiseman et al., 1985, Kutushov and Gorelik, 2013)	Invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	Kationisch, Einlagerung in den aktiven Mitochondrien von Leukozyten; Exzitationsmaximum 527nm, Emissionsmaximum 551nm
TRITC Dextran (Heidt et al, 2014)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Exzitationsmaximum 557nm, Emissionsmaximum 576nm
FITC Dextran (Jaffer, 2011, Bayer et al., 1998, Thorball, 1981)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Exzitationsmaximum 490nm, Emissionsmaximum 520nm
NaCl	Braun, Melsungen, Deutschland	
DPBS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland	
Ringerlaktat-lösung	Serag-Wiessner GmbH&Co. KG, Naila, Deutschland	
Heparin Natrium 25000IE/5ml	Braun, Melsungen, Deutschland	
FluoSpheres	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	2µm

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Reagentien

Induktion einer Entzündung:

KC/CXCL1 und fMLP fungieren als Vermittler der Entzündung (Xu et al., 2013, Chen et al., 2009, Hol et al. 2010). KC wurde entsprechend in unseren Versuchen verwendet, um eine akute Inflammation zu erzeugen. Mittels PTX wurde seine Wirkung überprüft. (s. Tab. 5)

KC entspricht in der Maus dem menschlichen Chemokin GRO-alpha (Stefanovic et al., 2005). Es wird der Familie der Zytokine zugeordnet und ist ein CXC(L)-Chemokin (KC/GRO-alpha/CXCL1), eine Aminosäure befindet sich zwischen den ersten beiden Cysteinen (Baglioni, 1998, Son et al., 2007, Zlotnik and Yoshie, 2000).

Chemokine agieren als Entzündungsvermittler und spielen so eine entscheidende Rolle bei inflammatorischen Geschehen (Glass et al., 2003, Iqbal et al., 2013). So werden zum Beispiel während einer chronischen Entzündung Chemokinrezeptoren heraufreguliert (Johnston et al. 1999). Chemokine sind kleine Peptide, deren Wirkung als potente Leukozytenaktivatoren

3 MATERIAL UND METHODEN

über eine Familie von 7-transmembranös-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermittelt wird (Fernandez and Lolis, 2002, Murdoch and Finn, 2000). KC, das unter anderem auch in Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen exprimiert wird, wird, induziert durch Thrombin, in den Endothelzellen der Gefäße gebildet (Iida and Grotendorst, 1990, Becker, 1994). Das entsprechende GRO (*growth related*)-Gen hat inflammatorische und wachstumsregulierende Eigenschaften (Miura et al., 2001, Becker et al., 1994, Haskill et al., 1990).

Der CXCR2-Rezeptor für KC (und homolog IL-8) befindet sich auf myeloiden Zellen, im besonderen auf reifen Granulozyten. Der Chemokinrezeptor und sein Ligand KC vermitteln die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten (Murdoch and Finn, 2000, Fernandez and Lolis, 2002, Laing and Secombes, 2004, Tecimer et al., 2000, Ritzman et al., 2010, Chintakuntlawar and Chodosh, 2009).

KC, das auf frühen atherosklerotischen Schäden präsentiert wird, war in früheren Untersuchungen auch an der Rekrutierung von Monozyten beteiligt (Huo et al., 2001). Verwendet wurden 600ng intraarteriell (Smith et al., 2004, Huo et al., 2001, Woodman et al., 1993). Dies entspricht der Dosis von IL-8, die in vergangenen Studien zu einem Anhalten rollender Neutrophiler Granulozyten im Mesenterium von Hasen führte (Ley et al., 1993, Smith et al., 2004).

Als Kontrolle des Wirkmechanismus von KC und, um zu überprüfen, ob Crawling abhängig von GPCRs ist, wurde einem Versuchstier Pertussistoxin injiziert und im Anschluss daran die intravitalmikroskopische Bildgebung gestartet. (s. Tab. 5)

PTX/Pertussis Toxin ist ein komplexes Exotoxin aus *Bordetella pertussis*. Es vermittelt die ADP-Ribosylierung der Alpha-Untereinheit von mit oberflächlichen Chemokinrezeptoren zusammenhängenden inhibitorischen G(i)-Proteinen, worüber eine Interaktion mit deren GPCRs (*G-protein-coupled-receptors*) verhindert und damit die Neutrophilenantwort auf Chemokine reduziert wird. Es ist weder eine Inaktivierung der damit konstitutiv aktiven Adenylatzyklase noch eine Öffnung von Kaliumkanälen möglich, folglich erhöht sich der cAMP-Spiegel. (Andreasen and Carbonetti, 2008, Antoine et al., 2000, Mangmool and Kurose, 2011, Moullam et al., 1990, Ryan et al., 2010, Wen et al., 2013) (s. Abb. 8, Tab. 5)

Die Anwendung von Pertussistoxin resultiert in einem veränderten Chemokinhaushalt und hemmt die Anlockung von Neutrophilen Granulozyten (Andreasen and Carbonetti, 2008, Spangrude et al., 1985, Bestebroer et al., 2010, Iqbal et al., 2013, Ryan et al., 2010).

3 MATERIAL UND METHODEN

Die integrinabhängige lymphozytäre Adhäsion in hochendothelialen Venolen muriner Peyer Plaques wurde in früheren Studien durch die Vorbehandlung rollender Lymphozyten mit Pertussitoxin blockiert (Berlin et al., 1993). Auf diesen Beobachtungen gründet die Hypothese, dass lymphozytäre G(i)-Proteine eine entscheidende Rolle in der Integrinaktivierung spielen. In nachfolgenden in vitro-Studien konnten diese schnellen PTX-abhängigen chemokinstimulierten Aktivierungsschritte von Integrinen nicht bestätigt werden (Alon and Feigelson, 2009).

3.3 Verwendete Antikörper

Um zu überprüfen, welche Oberflächenmoleküle und Rezeptoren Crawling regulieren können, wurden einige dieser mittels monoklonaler Antikörper selektiv blockiert.

Verändert sich Crawling in irgendeiner Form, sei es quantitativ oder qualitativ, wenn ein spezifischer Antikörper appliziert wird, lässt dies den Rückschluss zu, dass der blockierte Part essentiell für Crawling ist.

Da Crawling in der Vergangenheit als LFA-1- und Mac-1-abhängig beschrieben wurde, überprüften wir dies anhand unseres Versuchsprotokolls und verglichen die Wirkung der gegen die Untereinheiten CD11a- und CD11b-gerichteten Antikörper zwischen den leukozytären Populationen und unter differierenden Umgebungsbedingungen. Als endothelseitiger Ligand dieser Beta2-Integrine wurde ICAM-1 (CD54) untersucht.

Kontrolliert wurden die so überprüften Wirkungen der Antikörper mit Hilfe eines Kontrollantikörpers (IgG2a). (s. Tab. 6)

Anti-Ly6G wurde im Rahmen der Vorversuche als alternative Färbemöglichkeit von PMNs verwendet. Hierfür wurden im Vorfeld der Aufnahmen 2µg beziehungsweise 10µg intraarteriell injiziert. (s. Abb. 9)

Eine Auflistung aller verwendeten Antikörper zeigt Tabelle 6.

3 MATERIAL UND METHODEN

Verwendete Antikörper (Applikation i.a.)	Bezugsquelle/Klon	Charakteristika
Anti-IgG2a (50µg) (AffymetrixEbioscience, 2014, Xie et al., 1997)	Ebioscience, San Diego, USA; Klon: m2a-15F8	Kontrollantikörper
Anti-CD11a (50µg)	Ebioscience, San Diego, USA; Klon M17/4 FITC	LFA1: CD11a/CD18; s. a. Tab.3; Abschnitt 1.4.3.2
Anti-CD 11b (50µg)	Ebioscience, San Diego, USA; Klon M1/70	MAC-1: CD11b/CD18; s. a. Tab.3; Abschnitt 1.4.3.2
Anti-CD54- Antikörper/Anti- ICAM-1 (50µg)	Ebioscience, San Diego, USA; Klon YN1/1.7.4, FITC	s. a. Tab.3; Abschnitt 1.4.3.2
Anti-Gr-1 (Ly6G) (25µg) (AffymetrixEbioscience, 2014, Wang et al., 2012, Sahbaie et al., 2012, Yipp and Kubes, 2013)	Ebioscience, San Diego, USA; Klon: RB6-8C5	Ly6G = GPI-verankertes Protein (Glykosylphosphatidylinositol), Antikörper gegen myeloisches Differenzierungsantigen, von Monozyten nur vorübergehend während der knochenmarksgebundenen Entwicklungsstufe, von PMNs in allen Entwicklungsstufen exprimiert; Abhängig vom verwendeten Klon sind die AK mehr oder weniger PMN-spezifisch.

Tabelle 6: Auflistung verwendeter Antikörper

3 MATERIAL UND METHODEN

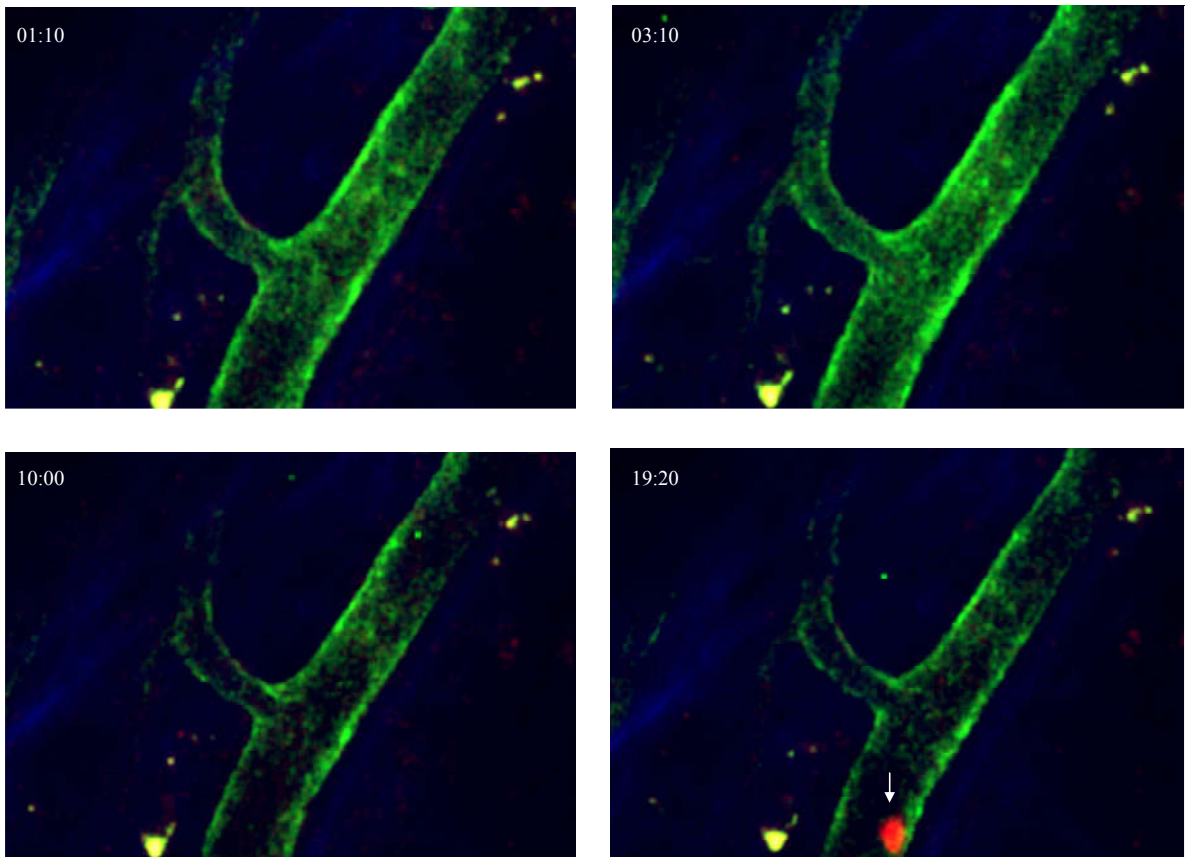


Abbildung 9: Zweiphotonenmikroskopische Aufnahmen eines crawlenden Neutrophilen Granulozyten in den Gefäßen einer C57BL/6-Wildtyp-Maus nach Applikation eines Anti-Gr-1-Antikörpers im Steady-State in Gefäßen des Ohrs. Die Gefäße wurden zur besseren Kontrastierung mit FITC-Dextran angefärbt

3.4 Versuchsaufbau

3.4.1 Narkose

Alle chirurgischen Eingriffe wurden in Vollnarkose durchgeführt.

Nach einer Isofluran-Prämedikation wurde die Anästhesie der Versuchstiere mittels intraperitonealer Injektion von Midazolam (90µg), Medetomidin (15µg) und Fentanyl (90µg) fortgeführt. Durch diese Kombination konnte eine ungefähr 45 Minuten andauernde Anästhesie erreicht werden. Eine Aufrechterhaltung der Sedierung wurde bei Bedarf durch wiederholte Injektion der obengenannten Kombination erreicht. (s. Tab. 7)

Die ausreichende Narkosetiefe wurde über das Fehlen von Schmerzreflexen bei Druck auf den digitalen Nagelfalz des Versuchstiers definiert (Alves et al., 2009).

Während der Präparation wurden die Tiere auf einer Wärmematte gelagert, so dass die Körpertemperatur kontinuierlich bei 37°C lag, und andauernd über eine Maske mit Sauerstoff versorgt. (s. Abb. 10)

3.4.2 Präparation und Katheterisierung der Arteria femoralis

Um Farbstoffe und Antikörper oder Fluorpartikel zur Messung der Blutflussgeschwindigkeit zu applizieren oder eine generalisierte akute Entzündungsreaktion zu induzieren, wurde zur Anlage eines systemischen Zugangs die linke Arteria femoralis katheterisiert. Als Vorbereitung wurde das linke Bein des Versuchstiers rasiert und enthaart (Balea Enthaarungscreme). Der Katheter wurde beim narkotisierten Tier unter Nutzung eines chirurgischen Lichtstereomikroskops gelegt. Hierzu wurde bei der narkotisierten Maus nach Hautdesinfektion (Cutasept) ein ungefähr ein Zentimeter langer horizontaler Hautschnitt an der Innenseite des linken Oberschenkels gemacht, dann wurden die Gefäße von Faszien und Gewebe freipräpariert und im Anschluss vorsichtig die Arterie von Vene und Nerv separiert. Nach erfolgter Trennung wurde die A. femoralis distal ligiert und um das proximale Segment ebenso ein Faden gelegt. Das Gefäß wurde mit Hilfe einer Kanüle minimal eröffnet und hierdurch ein Propylenekatheter eingeführt. Nach Fixierung mittels eines Fadens wurde die Haut über dem liegenden Katheter mit Seidenfäden und Einzelknopfnähten verschlossen. (s. Abb. 10, Tab. 7)

3 MATERIAL UND METHODEN

Verwendete Materialien/ Geräte	Bezugsquelle	Charakteristika
Forene 100%, 250 ml, B506	Fa Abbott, Wiesbaden, Deutschland	Anästhetikum
Midazolam (50mg/kg Körper- gewicht)	Ratiopharm, Ulm, Deutschland	Anästhetikum
Medetomidin (5mg/kg Körper- gewicht)	Pfizer, Karlsruhe, Deutschland	Anästhetikum
Fentanyl (0,5mg/kg Körper- gewicht)	CuraMed Pharma GmbH, München, Deutschland	Anästhetikum
Balea Enthaarungscreme	Balea, DM, Karlsruhe Deutschland	
chirurgisches Mikroskop	Wild, M3Z, Heerbrugg, Schweiz	
Cutasept F Spray	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland	
Faden	Pearsalls Limited, Taunlon, England	5/0
Kanülen	Braun, Melsungen, Deutschland	0,4x0,2mm, 0,13 x 0,3mm
Propylenekatheter	Smith Medical Ltd.GB	0,28ID/0,61OD, Portex
Seidenfäden	Pearsalls Limited, Taunlon, England	sille braded suture, reel no 0015, 0,5 U7/0
Silikon	Pattex, Düsseldorf, Deutschland	Transparente Abdichtung
Intravitalmikroskopische Plattform	Dipl. Ing. Martin Humbs, Deutschland	Spezialanfertigung
TrimScop	La Vision Biotec, Bielefeld, Deutschland;	Zweiphotonenmikroskop
Mai Tai Laser	SpectraPhysics, Kalifornien, USA	
Mikroskop mit Wasser- immersionsobjektiv (20fach).	Olympus, Tokio, Japan	
Inspector	La vision, Biotec, Bielefeld, Deutschland	Software
Volocity	Improvision, Perkin- Elmer, Waltham, USA	Auswertungssoftware
GIMP	The GIMP Team	Bildbearbeitungsprogramm, Kontrastverstärkung
Sigma Stat	Jandel scientific, Erkrath, Deutschland	Signifikanzprüfung, t-Test bzw. <i>Anova on ranks</i> -Test
Sysmex KX-21	Sysmex Europe Group GmbH, Norderstedt, Deutschland	Analyse hämatologischer Parameter

Table 7: Auflistung verwendeter Materialien, Geräte und Programme

3 MATERIAL UND METHODEN

3.4.3 Das Ohrmodell der Maus

Für die Intravitalmikroskopie verwendeten wir ein Modell, das bereits aus Untersuchungen der Mikrozirkulation bekannt und etabliert ist (Robert et al., 1999, Ludwig et al., 2004).

Hierbei wurde das unrasierte rechte Ohr des Versuchstiers mit vier bis fünf feinsten Kanülenspitzen auf einer speziellen intravitalmikroskopischen Plattform fixiert. Dafür war keine weitere chirurgische Manipulation nötig, so dass durch eine solche weitgehend atraumatische Fixierung ein *Steady-State*-Zustand ohne Entzündungsreiz geschaffen werden konnte. Die Öffnung der intravitalmikroskopischen Plattform wurde mit Silikon abgedichtet.

Während des Versuchs wurde das Ohr mit einer warmen Ringerlaktatlösung superperfundiert. So wurden vergleichbare physiologische Versuchsbedingungen geschaffen. (s. Abb. 10)

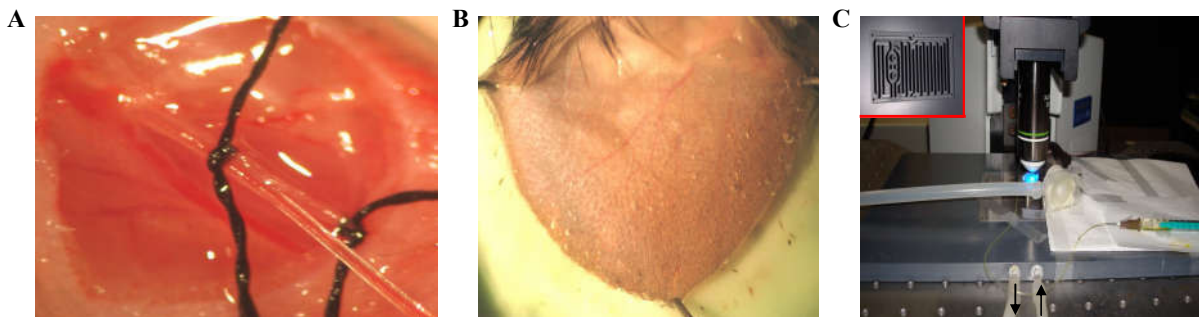


Abbildung 10: Vorbereitende Präparation und Versuchsaufbau (A) Katheterisierung und Fixierung des Zugangs mit Fäden in der linken Arteria femoralis des Versuchstiers (B) Fixierung des Ohrs mittels feinsten Kanülen auf einer speziell angefertigten intravitalmikroskopischen Plattform, Abdichtung mittels Silikon und Superperfusion mittels Ringerlaktatlösung (C) Mikroskopierplattform mit Versuchstier unter dem Zweiphotonenmikroskop, Katheter mit aufgesetzter Spritze zur Injektion und Spülung, Sauerstoffversorgung mittels einer Maske und eines Schlauchsystems, Warmwasserzirkulationssystem zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur von 37°C

3.4.4 Zweiphotonenmikroskopie

Seit über einem Jahrhundert werden IVM-Techniken verwendet, um in einem lebenden Versuchstier die Leukozytenrekrutierung in geschädigtes Gewebe auf dem Niveau der einzelnen Zelle zu analysieren. Auf diese Weise ist es möglich dynamische Prozesse lebender Zellen zu beschreiben. (Masedunskas et al., 2013, Mempel et al., 2004, Stephens and Allan, 2003)

Für die intravitalmikroskopischen Schnittbildaufnahmen unserer Versuche wurde ein Zweiphotonenmikroskop (TrimScop, Mai Tai Laser, Mikroskop mit Wasserimmersionsobjektiv) verwendet. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 12 dargestellt.

3 MATERIAL UND METHODEN

Die Multiphotonenmikroskopie stellt eine Standardmethode zur nichtinvasiven Bildgebung von Geweben mit subzellulärer Auflösung dar (Friedl et al., 2007).

Bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie absorbiert zum Beispiel Fluorescein die Energie eines Photons und einige Nanosekunden später strahlt es einen Teil der Energie in Form eines zweiten Photons wieder ab. Die Energie eines Photons ist indirekt proportional zu seiner Wellenlänge, das heißt das zweite Photon hat eine höhere Wellenlänge als das erste (Wellenlängenverschiebung, Stokes-Verschiebung). Das bedingt zum Beispiel eine grüne Emission bei Anregung im blauen Bereich. (Cahalan et al., 2002, Universität Wien, 2015, Spektrum Akademischer Verlag, 2000) (s. Abb. 11)

Bei der Multiphotonenmikroskopie hingegen wird zur Bildgebung ein Phänomen verwendet, das 1931 durch Maria Göppert-Mayer beschrieben wurde und 1990 durch Denk et al. erstmals zur praktischen Anwendung kam (Denk et al., 1990, Göppert-Mayer, 1931, Gericke, 2014, Masters and So, 2004). Das Prinzip besteht darin, dass ein Elektron zwei Photonen zeitgleich absorbiert (innerhalb einer Zeitspanne von unter einer Picosekunde) (Cahalan et al., 2002, Gericke, 2014). Anstelle der Anregung eines Moleküls mit 400nm, wird hierbei der angeregte Zustand induziert, indem zwei Photonen der Wellenlänge 800nm gleichzeitig verwendet werden (Gericke, 2014). Hierdurch ist die Anregung insgesamt energieärmer und nichtlinear (Helmchen and Denk, 2005). Die als Fluoreszenz sichtbar werdende Energie wird beim Übergang des angeregten Zustandes zurück in den Grundzustand frei (Helmchen and Denk, 2005, Sumen et al., 2004). (s. Abb. 11)

Das emittierte Licht hat hierbei eine geringere Wellenlänge als das zur Anregung verwendete (Campagnola and Loew, 2003, Cahalan et al., 2002). Weil die Anregung auf der zeitgleichen Absorption von zwei Photonen beruht, steigt die entstehende Fluoreszenz proportional zum Quadrat der Anregungsintensität (Cahalan et al., 2002). Die Effektivität der Multiphotonabsorption ist abhängig von den physikalischen Eigenschaften des Moleküls und der räumlichen und zeitlichen Verteilung des Anregungslichts (Helmchen and Denk, 2005).

Durch die *Second Harmonic Generation (SHG)* – eine Frequenzverdopplung eines Anregungslaserstrahls - ist es möglich kürzere Wellenlängen zu erreichen (Campagnola and Loew, 2003). Dieses Phänomen stellt einen nichtlinearen optischen Prozess dar, langwelliges Licht (z.B. rotes) kann bei nahezu entsprechender Qualität in kurzwelliges mit doppelter Frequenz (z.B. blaues/grünes) umgewandelt werden. Dies ermöglicht eine genaue Fokussierung. (Campagnola and Loew, 2003, Masters and So, 2004, Mohler et al., 2003, Mullisch and Welsch, 2010, Campagnola et al., 2002)

3 MATERIAL UND METHODEN

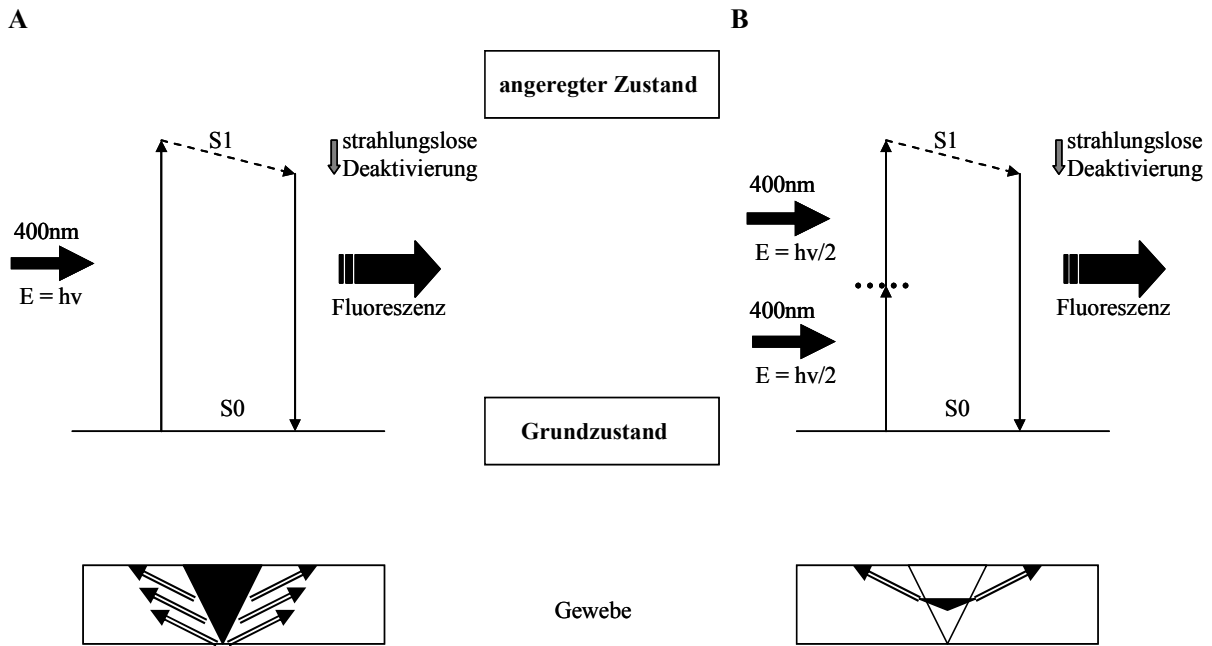


Abbildung 11: Prinzip der Zwei-Photonenmikroskopie dargestellt anhand eines modifizierten und vereinfachten Jablonskidiagramms. (A)Anregung nach dem Einphotonenprinzip (B)Anregung durch zwei Photonen doppelter Wellenlänge (modifiziert nach Helmchen and Denk, 2005, Gericke, 2014, Campagnola et al., 2002, Bristol University, 2014)

Eine niedrige numerische Apertur von 0,95 und eine hohe Auflösung ermöglichen Aufnahmen hoher Eindringtiefe und Qualität. Über die Verwendung eines gepulsten Lasers wird eine Reduzierung der sonst hohen Anregungsenergie erreicht. Durch diese Art der Laseranwendung entstehen während des Impulses durch Summation hohe Spitzenleistungen bei verhältnismäßig geringen in etwa der konventionellen Konfokalmikroskopie entsprechenden Durchschnittsleistungen. (Bristol University, 2014, Gericke, 2014, Williams et al. 1994, Cahalan et al., 2002)

Die Gesamtdauer unserer Aufnahmen pro Versuchstier betrug zwischen 60 und 90 Minuten und war unter anderem abhängig von der Art des applizierten Farbstoffs. Für die einzelnen Aufnahmen wurden folgende Einstellungen festgelegt: Anregungswellenlänge 800nm, Gesamtzeit 20min, 120 steps, 10sec, 20Z-Stacks/horizontale Schnittbilder, 10wait time; 2-5% LaserPower, 3 Kanäle: blau, grün, rot; Region: 200µm x 200µm; 512 x 512 Pixel).

Eine Laserquelle bildet ultrakurze Laserimpulse, Intensität und Stärke der Strahlung werden eingestellt, bevor Laserstrahl und Mikroskop verbunden werden. Bewegliche Scanspiegel ermöglichen ein koordiniertes Abarbeiten der Probe. Die durch zwei Photonen angeregte Fluoreszenz, die abgestrahlt wird, geht durch das Objektiv, den Strahlteiler und wird im Photomultiplier gemessen. Die Abbildung des Präparats jedoch wird erst durch den

3 MATERIAL UND METHODEN

angeschlossenen Computer generiert. (Helmchen and Denk, 2005, Cahalan et al., 2002, Gericke, 2014, Campagnola and Loew, 2003, Campagnola et al., 2002, Diaspro et al., 2006, Pawley, 2006)

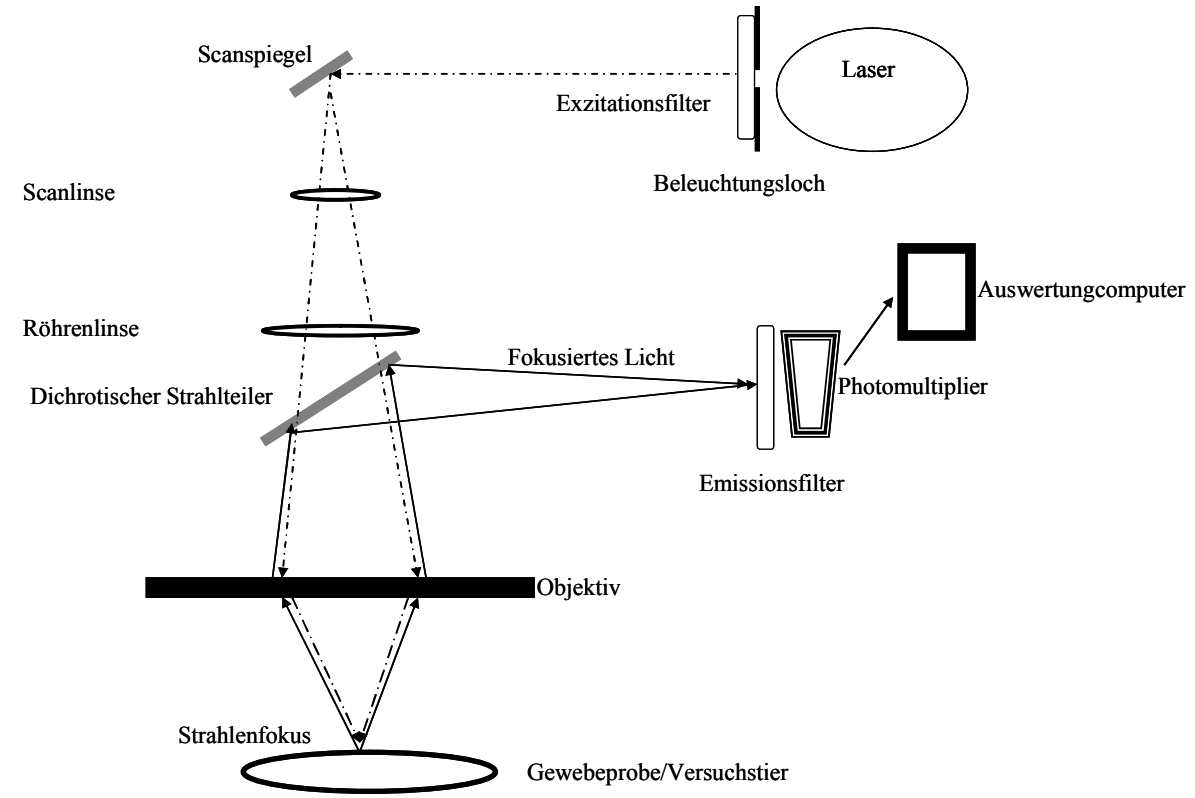


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Zweiphotonenmikroskops (modifiziert nach Helmchen and Denk, 2005, Cahalan et al., 2002, Gericke, 2014, Campagnola and Loew, 2003, Campagnola et al., 2002, Diaspro et al., 2006, Pawley, 2006)

3 MATERIAL UND METHODEN

Folgende Abbildung zeigt exemplarisch eine zweiphotonenmikroskopische Aufnahme inklusive eines definierten Beobachtungsfeldes.

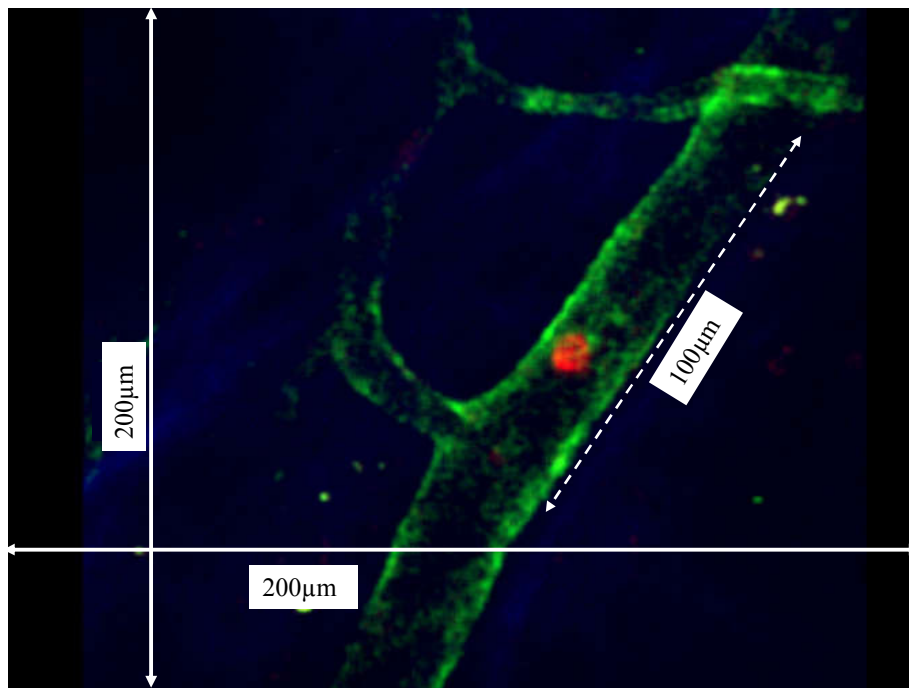


Abbildung 13: Intravitalmikroskopische Aufnahme des murinen Ohrs mittels Zweiphotonenmikroskopie, Definition der Bewegungsfelder. Färbung Neutrophiler Granulozyten durch Anti-Gr-1. Pfeile kennzeichnen die Beobachtungsfelder von $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$; Die Anzahl crawlender Zellen wird anhand eines Gefäßsegments von $100\mu\text{m}$ bestimmt (gestrichelter Pfeil).

3.4.5 Etablierung eines Modells zur *Single-Cell-Tracking*-Analyse des Crawlings

Um die direkte Wirkung der blockierenden Antikörper gegen Integrine auf crawlende Zellen zu untersuchen, wurde nach einer Grundzustandsaufnahme von fünf bis zehn Minuten Dauer der entsprechende Antikörper während der laufenden Aufnahme appliziert und im Anschluss das Zellverhalten durch *Single-Cell-Tracking* vor, während und nach Antikörpergabe analysiert. (s. Abb. 7, 14)

Der genaue Zeitpunkt der Applikation wurde dokumentiert und ist darüber hinaus durch die FITC-Färbung der Antikörper in den Aufnahmen selbst reproduzierbar.

Am Ende jedes Versuchs erfolgte nach nochmaligem Vertiefen der Vollnarkose eine intrakardiale Blutentnahme. Danach wurden die Tiere nach einer weiteren Kontrolle einer ausreichenden Narkosetiefe durch Genickbruch getötet.

3 MATERIAL UND METHODEN

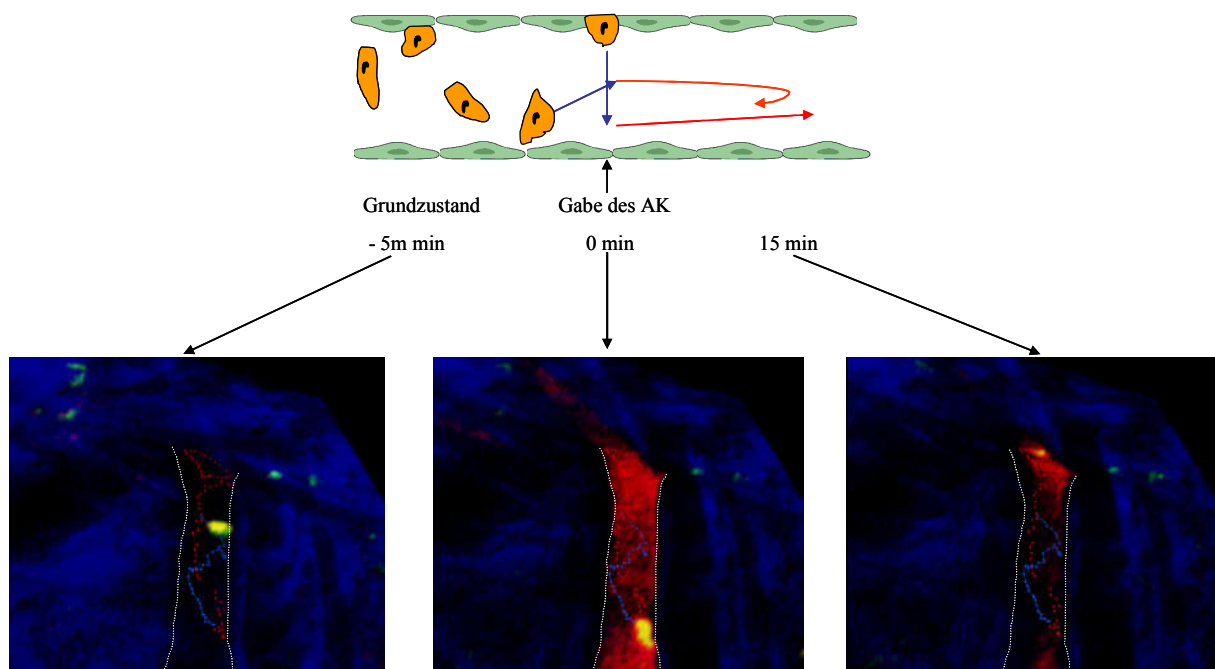


Abbildung 14: Darstellung des Single-Cell-Tracking-Protokolls mit den zugehörigen intravitalmikroskopischen Aufnahmen. Gezeigt ist ein crawlender GFP-positiver Monozyt in einer postkapillären Venole. Nach einer Aufnahmedauer von fünf Minuten wurde während der laufenden Aufzeichnung der jeweilige Antikörper injiziert. Im Anschluss wurde der Weg des crawlenden Leukozyten mittels der Methode „Single-Cell-Tracking“ analysiert. Die blaue Markierung entspricht in diesem Fall der Bewegung vor Antikörpergabe, die rote der danach

3.4.6 Hämodynamische und leukozytäre Parameter

Dem entnommenen Blut wurde Heparin zugefügt und im Anschluss eine Analyse der Blutbestandteile wie des Hämatokrits und der Gesamtzahl der Leukozyten (*white blood cell count*/WBC-Wert) durchgeführt (Sysmex KX-21). Hierdurch wurde eine Vergleichbarkeit der Blutwerte und damit der Ergebnisse gesichert.

Pro Experiment beziehungsweise Tier wurden mehrere Gefäße und die gegebenenfalls darin crawlenden Zellen ausgewertet. Der Durchmesser der Gefäße, in denen wir Crawling untersuchten, wurde an mindestens fünf verschiedenen Stellen gemessen und daraus der Mittelwert errechnet.

Die Geschwindigkeit des Blutflusses wurde anhand der gemessenen Geschwindigkeit von applizierten fluoreszierenden Partikeln bestimmt (Zhou et al., 2009). Die 2µm großen Partikel wurden im Anschluss an die Aufnahmen systemisch über den liegenden A. femoralis-Katheter appliziert (Khandoga et al., 2009). Auch hierbei wurde der Mittelwert aus mindestens fünf Messungen pro Gefäß ermittelt. Die Auswertung erfolgte über das Programm Volocity, indem der Mittelwert aus der zurückgelegten Strecke einzelner Fluoreszenzpartikel pro definierter Zeiteinheit verwendet wurde.

3 MATERIAL UND METHODEN

Wie erwähnt, wurde unter anderem in den Studien von Shulmann et al. 2009 gezeigt, dass Scherkräfte eine Voraussetzung für Crawling sind. Phillipson et al. zeigten 2009, dass perpendikuläres mechanotaktisches Crawling in vitro reproduzierbar war, wenn die Zellen unter den Einfluss von Scherspannung gebracht wurden. Um diesen Einflussfaktor Scherung in vivo zu analysieren, wurden die Gefäße, in denen Crawling zu beobachten war, abhängig von der Fließgeschwindigkeit des Blutes im Verhältnis zum Gefäßdurchmesser in eine *low shear*- und eine *high shear*-Gruppe eingeteilt (Gaboury et al., 1996).

Die Newtonsche Wandscherrate (s^{-1}) ergibt sich aus der achtfachen Flussgeschwindigkeit (in $\mu m/0,1sec$) geteilt durch den Gefäßdurchmesser (in μm). Die mittlere Blutflussgeschwindigkeit wird bestimmt, indem die zentrale Geschwindigkeit mit dem Faktor 0,625 multipliziert wird. Die Scherrate an den Grenzflächen - am Übergang von endothelialer Oberfläche und Gefäßlumen - definiert sich durch Multiplikation mit dem empirischen Korrekturfaktor von 4,9. (Cahalan et al., 2002, Khandoga et al., 2009, Ryschich et al., 2006) Auf dieser Berechnung beruhend, wurden Gefäße in Gruppen hoher und niedriger Scherkraft aufgeteilt. Eine Newtonsche Scherrate kleiner $400 s^{-1}$ galt als niedrig (Taylor et al., 1996).

Die crawlenden Leukozyten wurden analog zu Auffray et al. (2007) nach ihrem Bewegungsmuster in die Untergruppen *hairpin*, *wave*, *line*, *loop*, *mixed* und *short* eingeteilt. (s. Abb. 13).

Ihre Bewegungsrichtung im Verhältnis zum Blutfluss im Gefäß wurde in „mit dem Blutfluss“, „gegen den Blutfluss“ und „senkrecht zum Blutfluss“ ($90^\circ \pm 30^\circ$) unterteilt.

Die crawlenden Zellen wurden nach Bearbeitung des Videomaterials analysiert. Wir dokumentierten die Geschwindigkeit, das Crawlingmuster und die insgesamt zurückgelegte Strecke jeder einzelnen crawlenden Zelle. Es wurden Gruppen für Bewegungsmuster und Bewegungsrichtung gebildet. Das Verhalten der einzelnen Zelle im Verlauf der Aufnahme wurde betrachtet und im Nachhinein nach einem festen Schema klassifiziert.

Alle Parameter wurden getrennt drei bis fünf Minuten vor und bis 15 Minuten nach der intraarteriellen Antikörperapplikation untersucht.

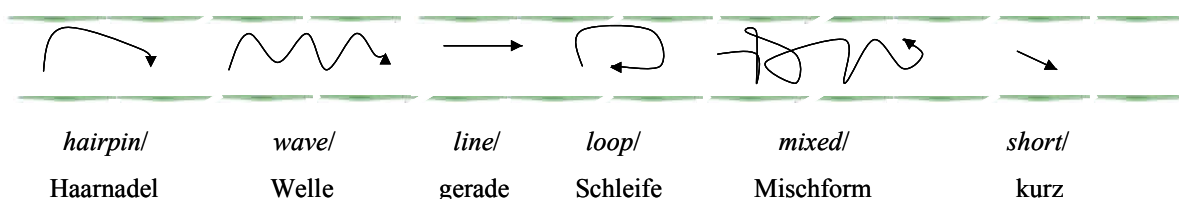


Abbildung 15: Schema der verschiedenen Bewegungsformen des Crawlings (nach Auffray et al. 2007)

3 MATERIAL UND METHODEN

3.4.7 Experimentelle Untergruppen

Die Versuche wurden in verschiedene Gruppen unterteilt.

Die im Vorfeld an Wildtypmäusen durchgeführten Versuche mit konventioneller Fluoreszenzfärbung (Acridine Orange, Rhodamin 6G), PTX und Gr-1-Antikörpern fanden ohne einen zusätzlichen Entzündungsreiz mittels KC, LPS oder fMLP statt.

Ebenso wurde in drei Gruppen, bestehend aus LysM eGFP/eGFP, CX3CR1 eGFP/+ und *T-red-high* Tieren, geprüft, ob diese Zellen unter *Steady-State*-Bedingungen und nach Entzündungsinduktion crawlten.

Im Anschluss wurden sowohl in der Versuchsreihe des unstimulierten *Steady-State*, als auch in der Versuchsreihe „Entzündung“ nach Stimulierung primär Monozyten und Neutrophile Granulozyten untersucht.

Die Effekte von Antikörpern gegen CD11a, CD11b und CD54 auf Monozyten im *Steady-State* und Neutrophile Granulozyten während einer Entzündung wurden analysiert und mit denjenigen bei der Gabe des Kontrollantikörpers IgG2a verglichen. (s. Tab. 8).

A

Leukozyten AO+	N=19
Leukozyten Rh6G+ 20µg, LP 5-11%	N=70
Leukozyten Rh6G+ 2µg, LP 2,5-5%	N=25
T-Lymphozyten RFP+ <i>Steady-State</i>	N=11
Neutrophile Granulozyten Anti-Gr-1/Ly6G 10µg	N=5
Neutrophile Granulozyten Anti-Gr-1/Ly6G 2µg	N=5
PTX Kontrollen	N=51
PTX 3h	N=18
PTX 6h	N=9
LysM eGFP/eGFP, <i>Steady-State</i> , LP 5-11%	N=5
LysM eGFP/eGFP, <i>Steady-State</i> , LP 2,5-5%	N=29
LysM eGFP/eGFP, KC	N=14
CX3CR1 eGFP/+, <i>Steady-State</i> , LP 5-11%	N=5
CX3CR1 eGFP/+, <i>Steady-State</i> , LP 2,5-5%	N=25
CX3CR1 eGFP/+, KC	N=11

B

	<i>Steady-State</i> CX3CR1 eGFP/+	Entzündung (KC) LysM eGFP/eGFP
Anti-CD11a	n=18	n=11
Anti-CD11b	n=15	n=19
Anti-CD54	n=5	n=7
Anti-IgG2a	n=20	n=26

Tabelle 8: Einteilung in Versuchsgruppen: (A) alle durchgeführten Versuche (B) alle unter der Anwendung von Antikörpern durchgeführten Versuche, n=Anzahl der Zellen, N=Anzahl der Gefäße

3 MATERIAL UND METHODEN

3.4.8 Das Entzündungsmodell

In früheren Studien wurde beschrieben, dass sich crawlende Leukozyten unter physiologischen unstimulierten Bedingungen in einer Vielzahl der Fälle vom Endothel lösten und nicht emigrierten, die Stimulation einer Entzündung, zum Beispiel mit TNF-alpha, die Zahl crawlender Leukozyten aber vervielfachte (Shulman et al., 2009, Ryschich et al., 2006).

Um zu untersuchen, ob sich das Crawlingverhalten der Leukozytenpopulationen und seine Regulation in einer Entzündungssituation ändern, wurde nach Mikroskopaufnahmen der *Baseline*-Situation (Grundzustand) an postkapillären Venolen und Arteriolen systemisch über den A. Femoralis-Katheter KC/CXCL1 oder fMLP (Daten nicht dargestellt) appliziert. In früheren Studien wurde in vivo gezeigt, dass diese Substanzen einen zügigen Anstieg von transmigrierenden Zellen hervorrufen (Fernandez and Lolis, 2002, Murdoch and Finn, 2000, Laing and Secombes, 2004, Haskill et al., 1990, Reutershan et al., 2005, Huo et al., 2001).

Nach den Ergebnissen aus den Vorversuchen entschieden wir uns bei den definitiven Versuchsgruppen für die Entzündungsinduktion mit KC. Zuerst wurde analysiert, in welchem Umfang und wie schnell KC leukozytäres Crawling induziert. Hierzu wurde LysM eGFP/eGFP und CX3CR1 eGFP/+ Mäusen nach einer Aufnahme im Ruhezustand das Chemokin systemisch appliziert. So war ein direkter Vergleich des unbeeinflussten *Steady-State* mit dem Verhalten der Leukozyten nach einem Entzündungsreiz möglich. Überprüft wurde die Wirkung von KC durch Kontrollen mit NaCl.

3.5 Statistische Analysen und Bildbearbeitung

Die verwendete Software war Inspector, die dreidimensionale Rekonstruktion und die Auswertungen wurden mit dem Programm Volocity durchgeführt. Die Nachbearbeitung des Bildmaterials erfolgte mittels der Auswertungssoftware Volocity und dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP. (s. Tab. 7)

Zur Überprüfung der Signifikanz der Ergebnisse wurden statistische Auswertungen mittels des Programms Sigma Stat durchgeführt. (s. Tab. 7)

Bei den Versuchsgruppen werden Mittelwert und Standardabweichung angegeben. P-Werte unter 0,05 werden als signifikant (* $p < 0,05$) eingestuft. Bei normalverteilten Daten mit homogen verteilten Varianzen wurde zum Vergleich von zwei Gruppen der t-Test verwendet, beim Vergleich mehrerer Gruppen der *ANOVA on ranks*-Test.

4 ERGEBNISSE

4.1 Hämodynamische Parameter

Die hämodynamischen Parameter wurden einerseits mit einer Blutuntersuchung nach Ende der Versuche, andererseits durch computergestützte Auswertung mit den Programmen Volocity und Inspector bestimmt.

Tabelle 9 zeigt, dass die versuchsrelevanten Blutwerte wie systemische Leukozytenzahl, mittlerer Gefäßdurchmesser, Blutflussgeschwindigkeit und Scherrate zwischen den Hauptversuchsgruppen vergleichbar waren. Auch bezüglich des Hämatokrits bestanden keine größeren Differenzen (nicht dargestellt).

Ebenso legen die Zahlen nahe, dass auch durch beispielsweise externe Einflüsse (z.B. durch unterschiedliche Flüssigkeitszufuhr durch Spülen des Katheters) kein signifikanter Einfluss auf diese Werte bestand.

A

CX3CR1 eGFP/+	IgG2a-AK/ vor AK	Anti-CD11a	Anti-CD11b	Anti-CD54
Gefäßdurchmesser (in μm)	17,1+/-6,3	16,1+/-5,8	23,9+/-7,1	20,7+/-4,9
Blutflussgeschwindigkeit (in $\mu\text{m}/0,1\text{ sec}$)	94,5+/-25,0	87,0+/-31,4	100+/-50	101,7+/-43,9
WBC (Leukozyten x 1000/ μl)	4,2+/-2,1	3,9+/-2,8	3,6+/-1,8	4,8+/-1,9
Newtonsche Scherrate (in s^{-1})	585,6+/-179,3	578,9+/-237,1	438,9+/-123,2	578,7+/-197,9

B

LysM eGFP/eGFP	IgG2a-AK/ vor AK	Anti-CD11a	Anti-CD11b	Anti-CD54
Gefäßdurchmesser (in μm)	24,5+/-6,3	19,4+/-3,9	23,5+/-4,4	20,6+/-1,9
Blutflussgeschwindigkeit (in $\mu\text{m}/0,1\text{ sec}$)	97,7+/-24,6	89,7+/-26,3	95,3+/-29,3	82,9+/-19,8
WBC (Leukozyten x 1000/ μl)	4,9+/-2,5	3,4+/-0,9	4,7+/-1,7	3,8+/-1,1
Newtonsche Scherrate (in s^{-1})	462,7+/-190,2	440,1+/-145,9	439,6+/-150,7	497,0+/-85,9

Tabelle 9: Mikrohämodynamische Parameter aller mittels AK durchgeführten Versuche mit CX3CR1 eGFP/+ im Steady-State (A) und LysM eGFP/eGFP Tieren im Rahmen einer KC-induzierten Entzündung (B), jeweils bei Antikörpern gegen IgG2a, CD11a, CD11b, CD54; Die Injektion eines Kontrollantikörpers hatte keinen Einfluss auf Crawling selbst oder einen anderen Schritt der Migrationskaskade. Deshalb wurden zur Veranschaulichung der hämodynamischen Parameter Werte aus diesen beiden Gruppen zu einer Gruppe „IgG2a-AK/vor AK“ zusammengefasst (Mittelwert +/- Standardabweichung)

4 ERGEBNISSE

Im Durchschnitt hatten die beobachteten Gefäße aller Versuche einen Durchmesser von $18,2\mu\text{m}$ (CX3CR1 eGFP/+) bzw. $23,5\mu\text{m}$ (LysM eGFP/eGFP), der WBC lag bei 4,1 (CX3CR1 eGFP/+) und 4,6 (LysM eGFP/eGFP), die Blutflussgeschwindigkeit betrug $94,3\mu\text{m}/0,1\text{sec}$ (CX3CR1 eGFP/+) bzw. $95,3\mu\text{m}/0,1\text{sec}$ (LysM eGFP/eGFP) und die Scherrate $561,1$ (CX3CR1 eGFP/+) bzw. $458,1$ (LysM eGFP/eGFP) (Daten nicht graphisch dargestellt). Auch bezüglich dieser Werte waren die verschiedenen Tiere vergleichbar.

4.2 Crawlingverhalten unter *Steady-State*-Bedingungen: Analyse von Neutrophilen Granulozyten, Monozyten und T- Zellen

Um zu klären, welche leukozytären Subpopulationen unter physiologischen Bedingungen crawlen können, führten wir im ersten Abschnitt der Arbeit folgende Experimente durch:

Zur Crawlinganalyse Neutrophiler Granulozyten wurde die LysM eGFP/eGFP Mauslinie, für Monozyten CX3CR1 eGFP/+ und für T-Zellen *T-red-high* verwendet.

Die Anzahl der crawlenden Zellen wurde im Anschluss an die intravitalmikroskopischen Aufnahmen computergestützt bestimmt. In einem festgelegten Abschnitt des Gefäßes ($200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$) wurden crawlende Zellen in ihrem Bewegungsverhalten durchgehend verfolgt (*Single-Cell-Tracking*; Volocity/Inspector), auch um zu vermeiden, dass Mehrfachzählungen einzelner Zellen das Ergebnis verfälschten. (s. Abb. 13)

Durchschnittlich konnten in einem Gefäß von CX3CR1 GFP/+ Tieren unter physiologischen Bedingungen $2,3/10^4\mu\text{m}^2$ Monozyten beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu scheinen Neutrophile Granulozyten in einem LysM eGFP/eGFP Tier ohne gegebenen Entzündungsreiz kaum zu crawlen (Anzahl $0,8/10^4\mu\text{m}^2$) (s. Abb. 16, 17, 19).

4 ERGEBNISSE

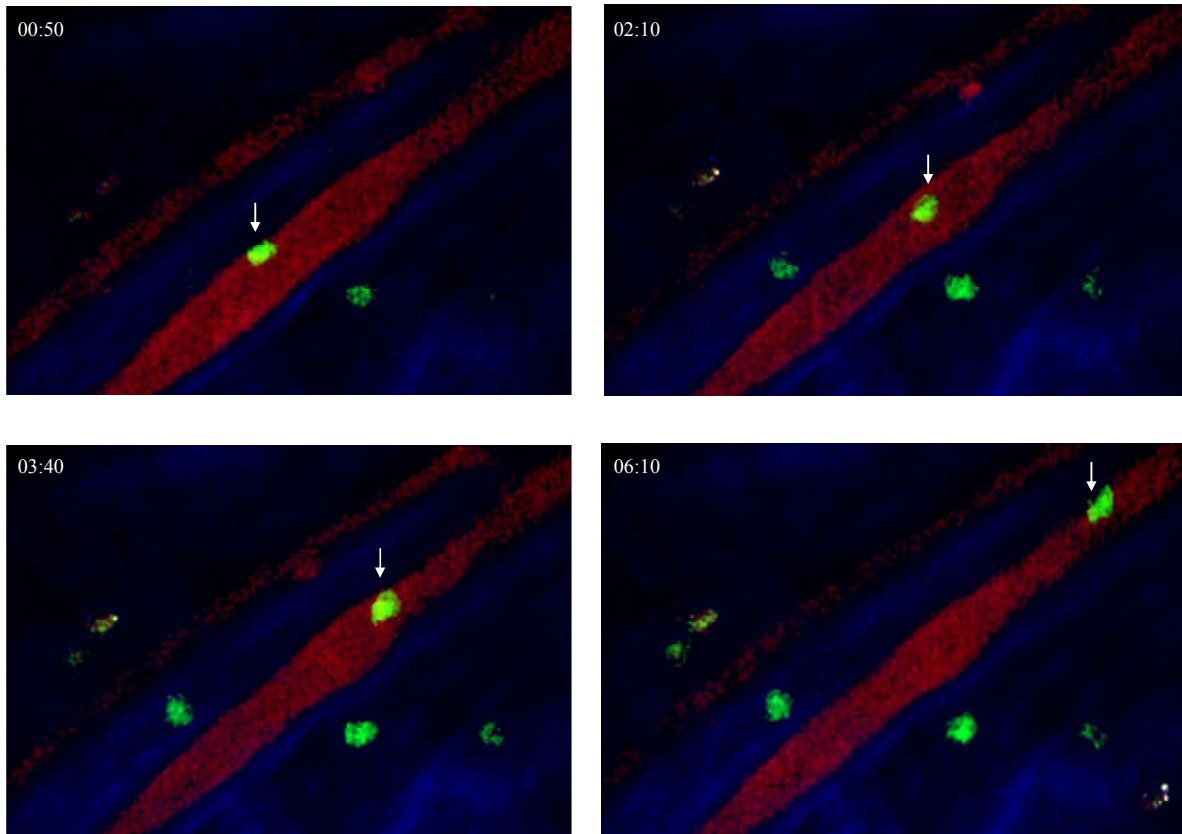


Abbildung 16: Zweiphotonenmikroskopische Aufnahmen eines crawlenden Monozyten im Steady-State in einem Ohrgefäß einer CX3CR1 eGFP/+ Maus. Die Gefäße wurden zur besseren Kontrastierung mit TRITC-Dextran angefärbt

Während Monozyten in einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $10,8\mu\text{m}/\text{min}$ crawlten, taten dies Neutrophile Granulozyten, sofern sie crawlten, kurze Strecken und mit $17,8\mu\text{m}/\text{min}$ („Rolling-like-crawling“). (s. Abb. 20)

4 ERGEBNISSE

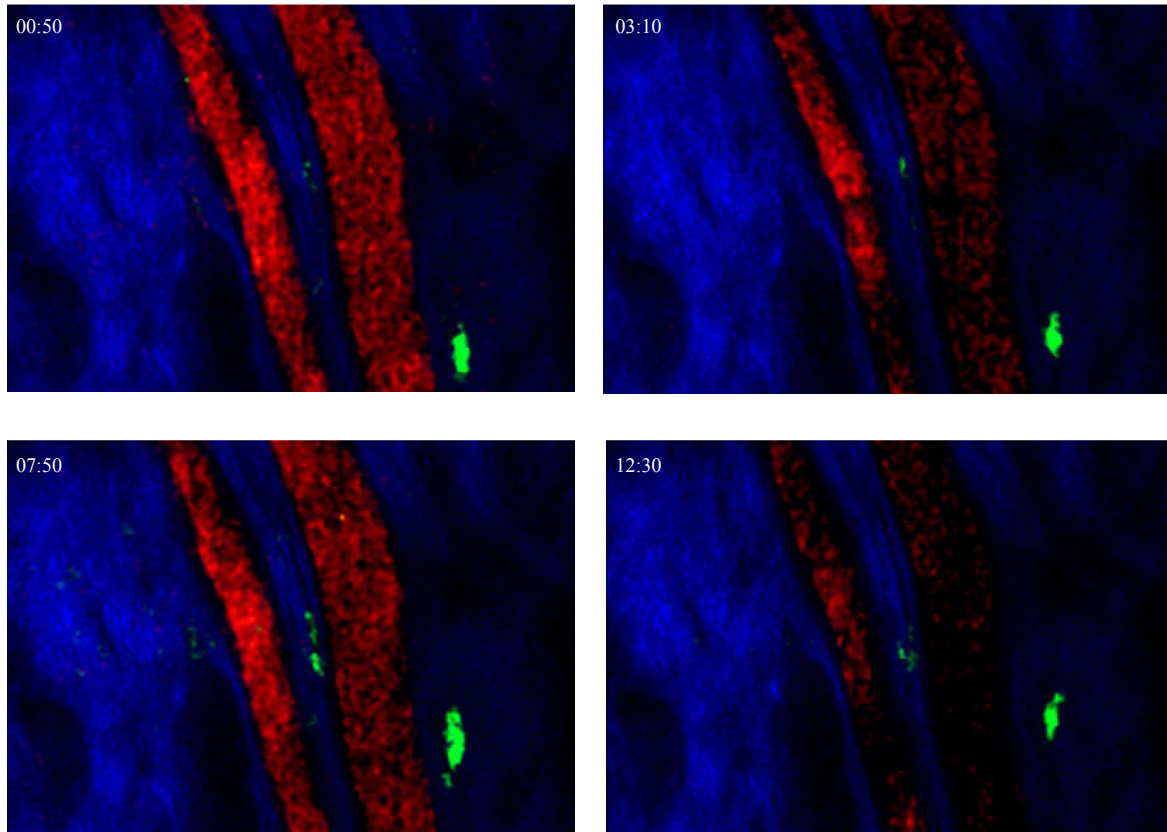


Abbildung 17: Zweiphotonenmikroskopische Aufnahmen im *Steady-State* in einem Ohrgefäß einer *LysM eGFP/eGFP* Maus. Über den dargestellten Zeitraum von über zehn Minuten *crawlt* kein Neutrophiler Granulozyt. Die Gefäße wurden zur besseren Kontrastierung mit TRITC-Dextran angefärbt

T-Lymphozyten *crawlten* in unseren Experimenten nicht im *Steady-State*. In den Versuchen mit *T-red-high* Tieren konnten weder im arteriellen noch im venösen Gefäßssystem *crawlende* T-Zellen gezeigt werden. Darüber hinaus waren in diesen Tieren auch keine *adhärenten* T-Zellen darstellbar. (s. Abb. 18, 23).

Intravitalmikroskopische Aufnahmen aus Tieren verschiedener Stämme zeigen exemplarisch die Abbildungen 16, 17 und 18.

4 ERGEBNISSE

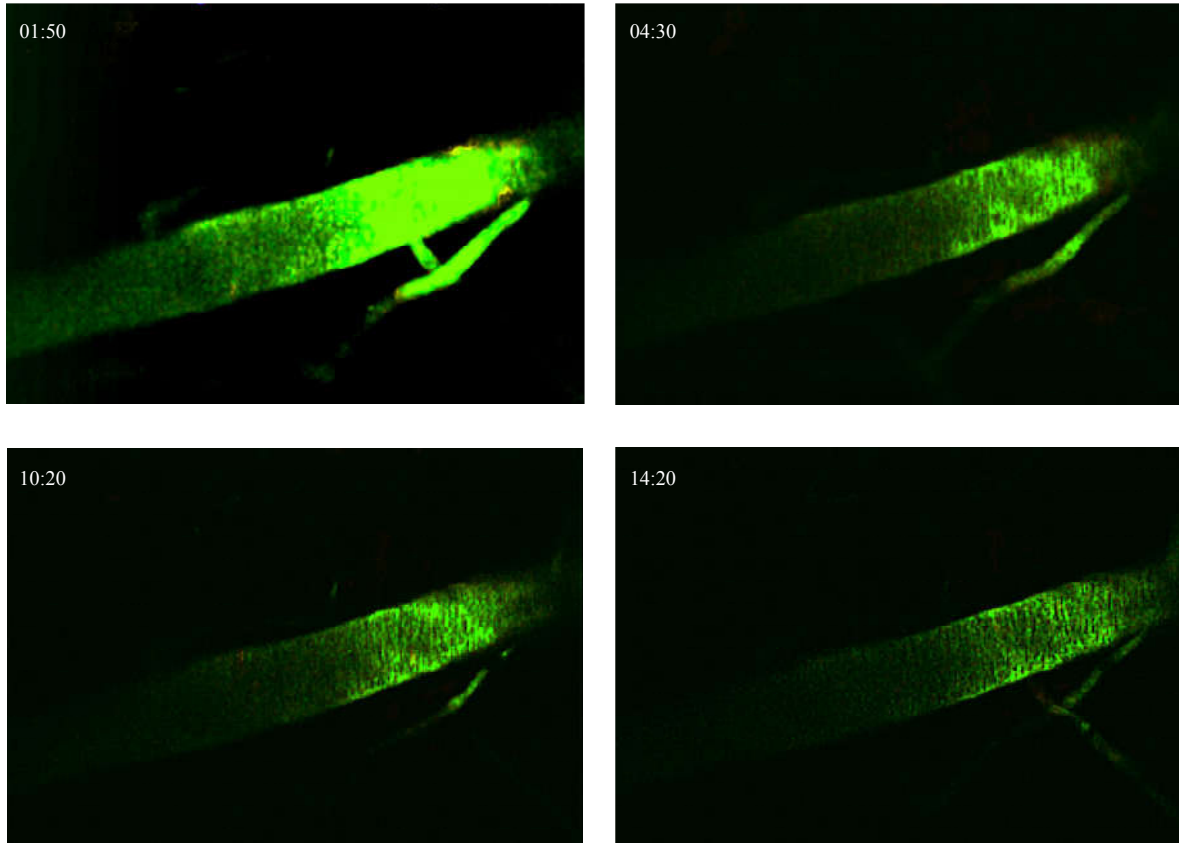


Abbildung 18: Zweiphotonenmikroskopische Aufnahmen im Steady-State in einem Ohrgefäß einer T-red-high-Maus. Über den dargestellten Zeitraum von über zehn Minuten crawlt kein T-Lymphozyt. Die Gefäße wurden zur besseren Kontrastierung mit FITC-Dextran angefärbt

Zusammenfassend waren unter gleichen Rahmenbedingungen signifikant mehr crawlende Monozyten als crawlende Neutrophile Granulozyten und keine crawlenden T-Zellen zu sehen.

4 ERGEBNISSE

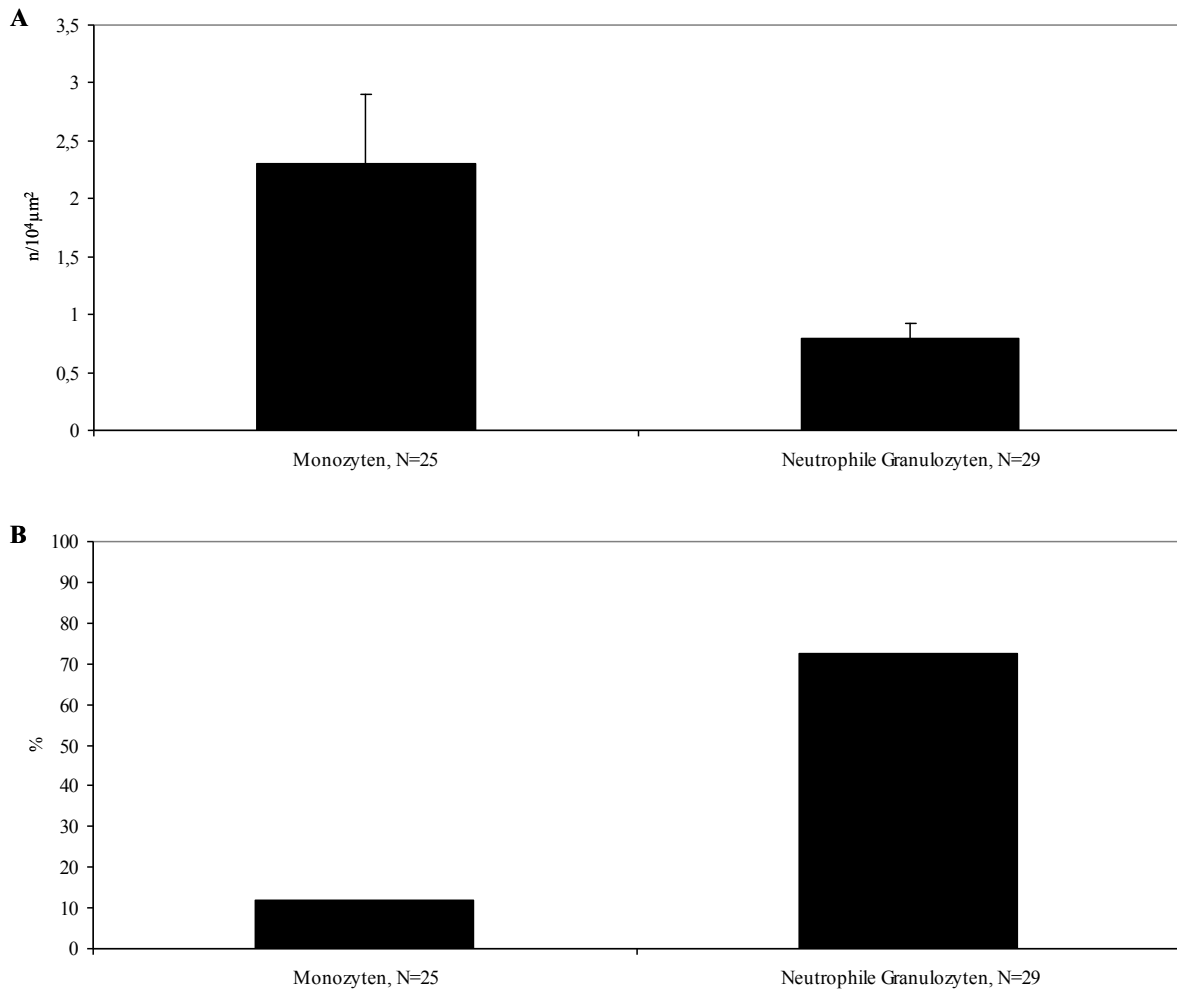


Abbildung 19: Unterschiede im Crawling zwischen Monozyten und Neutrophilen Granulozyten unter Steady-State-Bedingungen (A) Quantitativer Unterschied im Crawlingauftreten der leukozytären Subpopulationen (Mittelwert +/- Standardabweichung; t-Test; * $p < 0,05$) (B) Prozentsatz der Gefäße, in denen kein Crawling stattfand, N= Anzahl der Gefäße

Im Gegenzug waren in 72,4% der insgesamt betrachteten Gefäße keine crawlenden Neutrophilen Granulozyten zu erkennen, in den verbleibenden konnte Crawling erst zum Aufnahmeende hin beobachtet werden. (s. Abb. 19)

Nur in 12,1% der Gefäße waren hingegen keine crawlenden Monozyten sichtbar. Das heißt, in entzündungsfreien Gefäßen scheint es üblich zu sein, dass zwar Monozyten, jedoch kaum Neutrophile Granulozyten crawlen.

Die Crawlingdauer der eGFP-positiven Neutrophilen Granulozyten im *Steady-State* war, sofern Einzelzellen crawlten, wesentlich kürzer als die der eGFP-positiven Monozyten (0,9min vs. 7,1min). (s. Abb. 16).

4 ERGEBNISSE

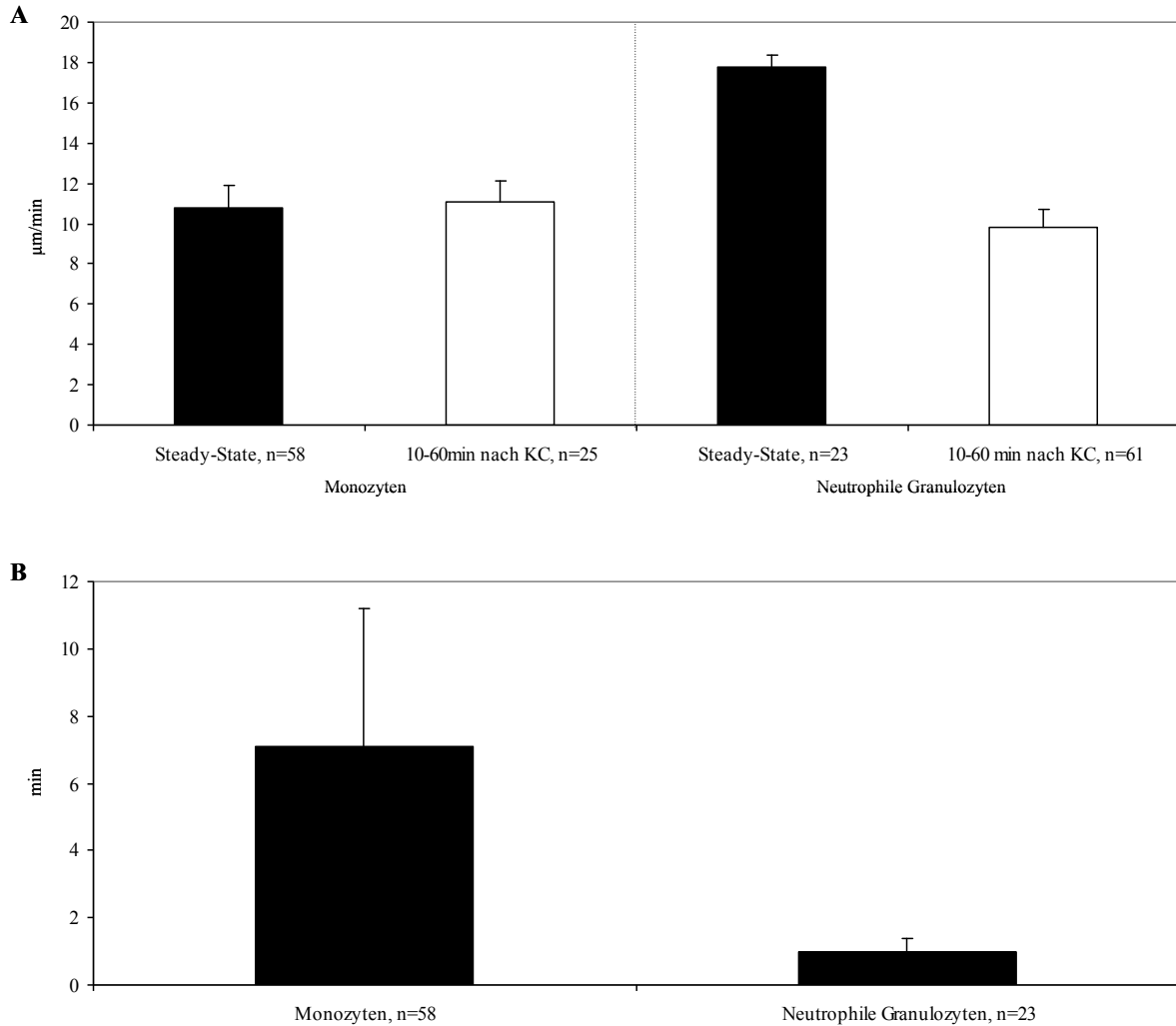


Abbildung 20: Anzahl und Geschwindigkeit crawlender Leukozyten im Vergleich (A) Geschwindigkeit crawlender Monozyten und Neutrophiler Granulozyten unter physiologischen und entzündlichen Bedingungen (B) Vergleich der durchschnittlichen Crawlingdauer im Steady-State, Monozyten vs. Neutrophile Granulozyten („rolling-like-crawling“) (Mittelwert +/- Standardabweichung, t-Test, * $p < 0,05$), n=Anzahl der beobachteten Zellen

Da die Zellen in den Blutgefäßen in verschiedene Richtungen crawlten, evaluierten wir anschließend die Hauptbewegungsrichtung sowie die dargebotenen Muster der crawlenden Leukozyten zum Blutfluss quantitativ. Hierbei zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung der Crawlingrichtung zwischen den Populationen. Gruppenübergreifend bewegte sich die Mehrzahl der Monozyten und Neutrophilen Granulozyten mit dem Blutfluss, ein Teil gegen und der kleinste prozentuale Anteil senkrecht zum Blutfluss. (s. Abb. 21)

4 ERGEBNISSE

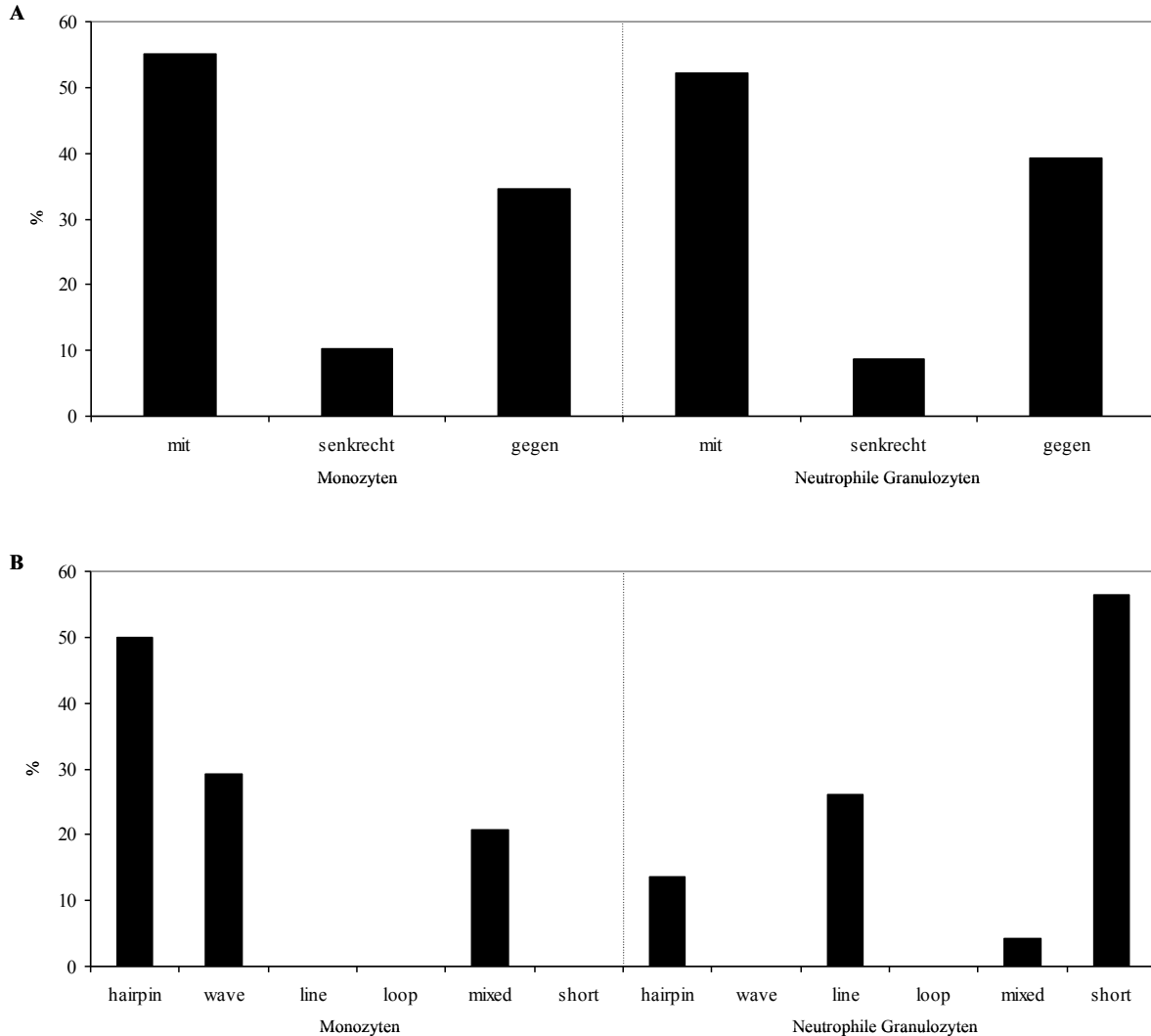


Abbildung 21: Vergleich von Crawlingrichtung (A) und Crawlingmuster (B) im Steady-State zwischen Monozyten und Neutrophilen Granulozyten; $n(\text{Monozyten})=58$, $n(\text{Neutrophile Granulozyten})=23$

Eine Abweichung wurde jedoch bei der folgenden Einteilung der Bewegungsmuster erkennbar. Während die Hauptform bei Neutrophilen Granulozyten *short* war, zeigten die Monozyten vor allem *hairpin* und *wave* als bevorzugte Crawlingformen. (s. Abb. 21)

Es scheint folglich Unterschiede zwischen den leukozytären Populationen im Crawling unter *Steady-State*-Bedingungen zu geben, sowohl das Auftreten allgemein – in erster Linie crawlten Monozyten - als auch die Bewegungscharakteristika betreffend.

Bei analoger Versuchsanordnung waren wie erwähnt in keiner Aufnahme crawlende T-Lymphozyten in *T-red-high* Tieren darstellbar.

4.3 Einfluss des Versuchsaufbaus auf Crawling - Phototoxische Effekte führen zu vermehrtem Crawling

Um auszuschließen, dass Crawling unter *Steady-State*-Bedingungen durch einen phototoxischen Effekt der Zweiphotonenmikroskopie mit konsekutiver Zellaktivierung auftrat, beziehungsweise um eine Möglichkeit zu finden, diese Störeffekte zu minimieren und so ein optimales Protokoll für Bildgebung und Analyse des Crawlings zu etablieren, wurden im Vorfeld der definitiven Versuchsreihen Experimente mit unterschiedlichen Färbungen und Variationen der angewandten Laserstärke des Zweiphotonenmikroskops durchgeführt.

Folgende Versuchsgruppen wurden eingeführt: In C57BL/6 Wildtyp-Tieren wurden Leukozyten mit den konventionellen Fluoreszenzfarbstoffen Acridinorange, Rhodamin 6G und Ly6G/Anti-Gr-1 angefärbt. (s. Tab. 8)

Die Ergebnisse hieraus konnten mit den Resultaten der Tiere mit GFP/RFP-markierten Zellen verglichen werden. Da die Menge der selektiv gefärbten und analysierten Subpopulationen deutlich unter der Menge der Gesamtheit der crawlenden Leukozyten unter Acridinorange- und Rhodaminfärbung aus den Vorversuchen lag - es crawlten etwa doppelt so viele acridin- bzw. rhodamingefärbte Leukozyten wie die Gesamtzahl der Leukozyten-subpopulationen, wenn diese mit anderen Methoden untersucht wurden, und die Zellzahl durch Erhöhung der angewandten Laserstärke weiter vervielfacht werden konnte - lag die Vermutung nahe, dass hier phototoxische Effekte ursächlich waren. Durch die Kombination aus Farbstoffen und Laserstärke wurde das Gewebe geschädigt. Diese Hypothese wurde überprüft, indem die applizierte Laserstärke des Mikroskops (von 5-10% auf 2-5%) und die Konzentration von Rh6G (von 20µg auf 2µg) reduziert wurden. Im Anschluss crawlten signifikant weniger Leukozyten (Mittelwert $5,7/10^4 \mu\text{m}^2$ vs. $10,5/10^4 \mu\text{m}^2$). (s. Abb. 23)

Die beobachtete Lasertoxizität trat nicht bei genetisch veränderten CX3CR1 eGFP/+ Tieren auf, bei denen keine zusätzliche Fluoreszenzfärbung von Nöten war. (s. Abb. 23)

Eine höhergradige Einstellung über einen längeren Zeitraum führte bei LysM eGFP/eGFP-Mäusen zu einer erhöhten Zahl crawlender Neutrophiler Granulozyten. Insgesamt crawlten Neutrophile Granulozyten wie beschrieben kaum, wenn kein Entzündungsreiz gegeben war, entweder durch chemische Entzündungsinduktion (KC, fMLP) oder durch mechanisch/thermische Schädigung im Rahmen der oben beschriebenen Phototoxizität. (s. Abb. 19, 24, 26)

Eine andere Herangehensweise an das Problem färbetechnisch bedingten Einflusses war eine veränderte Form der Anfärbung bei ansonsten gleichbleibendem Versuchsprotokoll. Während im *Steady-State* und bei Färbung mit Ly6G/Anti-Gr-1 nur einige Neutrophile Granulozyten

4 ERGEBNISSE

crawlten, taten dies mehr, wenn weniger Anti-Gr-1-Antikörper appliziert wurden (durchschnittlich $2,0/10^4 \mu\text{m}^2$ bei $10 \mu\text{g}$, $3,4/10^4 \mu\text{m}^2$ bei $2 \mu\text{g}$) (s. Abb. 22). Das bedeutet, diese Art der Färbung scheint Crawling quantitativ und eventuell auch qualitativ zu beeinflussen. Deshalb wurde im Folgenden darauf verzichtet.

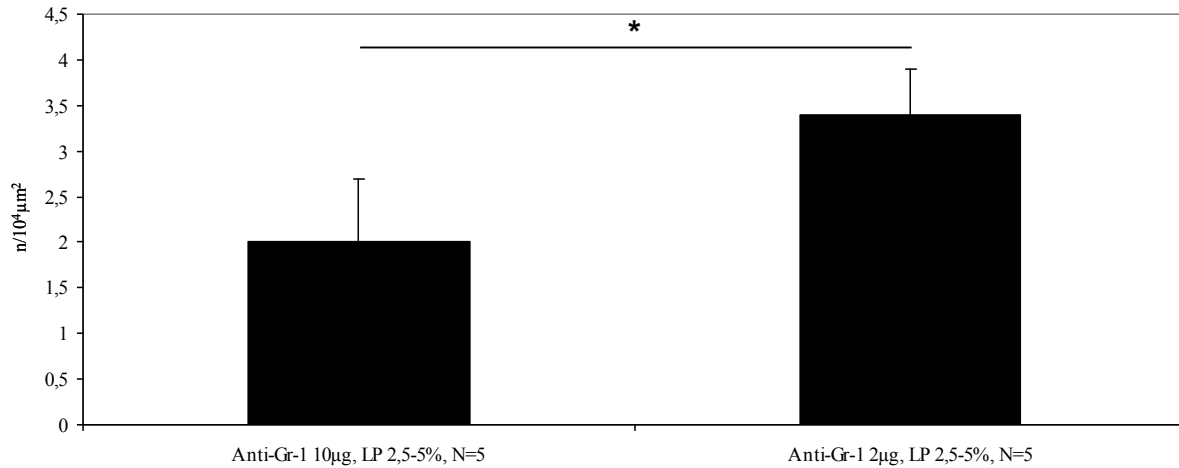


Abbildung 22: Vergleich des Crawlingverhaltens der leukozytären Subpopulationen in postkapillären Venolen bei Färbung mit Anti-Gr-1; Bei einer Verminderung der applizierten Antikörper crawlten vermehrt Zellen (Mittelwert +/- Standardabweichung, t-Test, * $p < 0,05$), N=Anzahl der Gefäße

Ein optimales Versuchsprotokoll, das ausschließlich GFP/RFP-positive Tiere vorsieht, die anzuwendende Laserstärke limitiert (Maximum 5%) und so mögliche Störfaktoren minimiert, ist Voraussetzung für die intravitalmikroskopische Analyse crawlender Leukozyten im *Steady-State*. Entsprechend wurden nach Etablierung unseres Versuchsaufbaus alle weiteren Experimente auf diese Weise durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

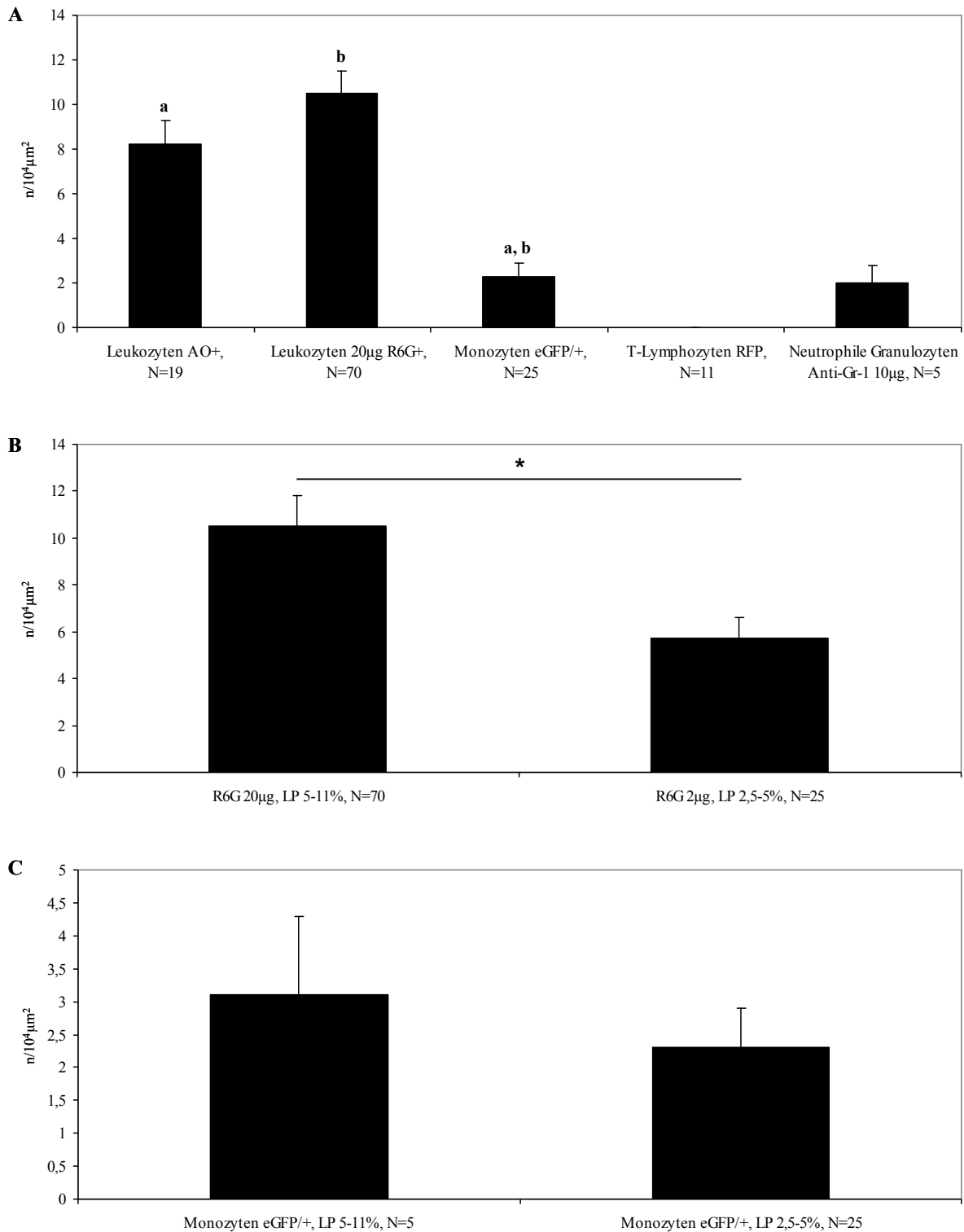


Abbildung 23: Vergleich des leukozytären Crawlingverhaltens in postkapillären Venolen bei Modifizierungen des Versuchsaufbaus ohne zusätzliche Entzündunginduktion via KC; (A) Bei Färbung mit konventionellen Fluoreszenzfarbstoffen war die Anzahl der crawlenden Leukozyten deutlich erhöht (Mittelwerte +/- Standardabweichung; Anova-Test, mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Gruppen unterscheiden sich mit einer Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$) (B) Eine Reduzierung des applizierten Rhodamins und der Laserstärke ergab eine Abnahme crawlender Zellen (C) Eine Reduzierung der Laserstärke bei Versuchen mit CX3CR1 eGFP/+ zeigte keine quantitative Veränderung (B&C: Mittelwert +/- Standardabweichung; t-Test, $*p < 0,05$), N=Anzahl der Gefäße

4 ERGEBNISSE

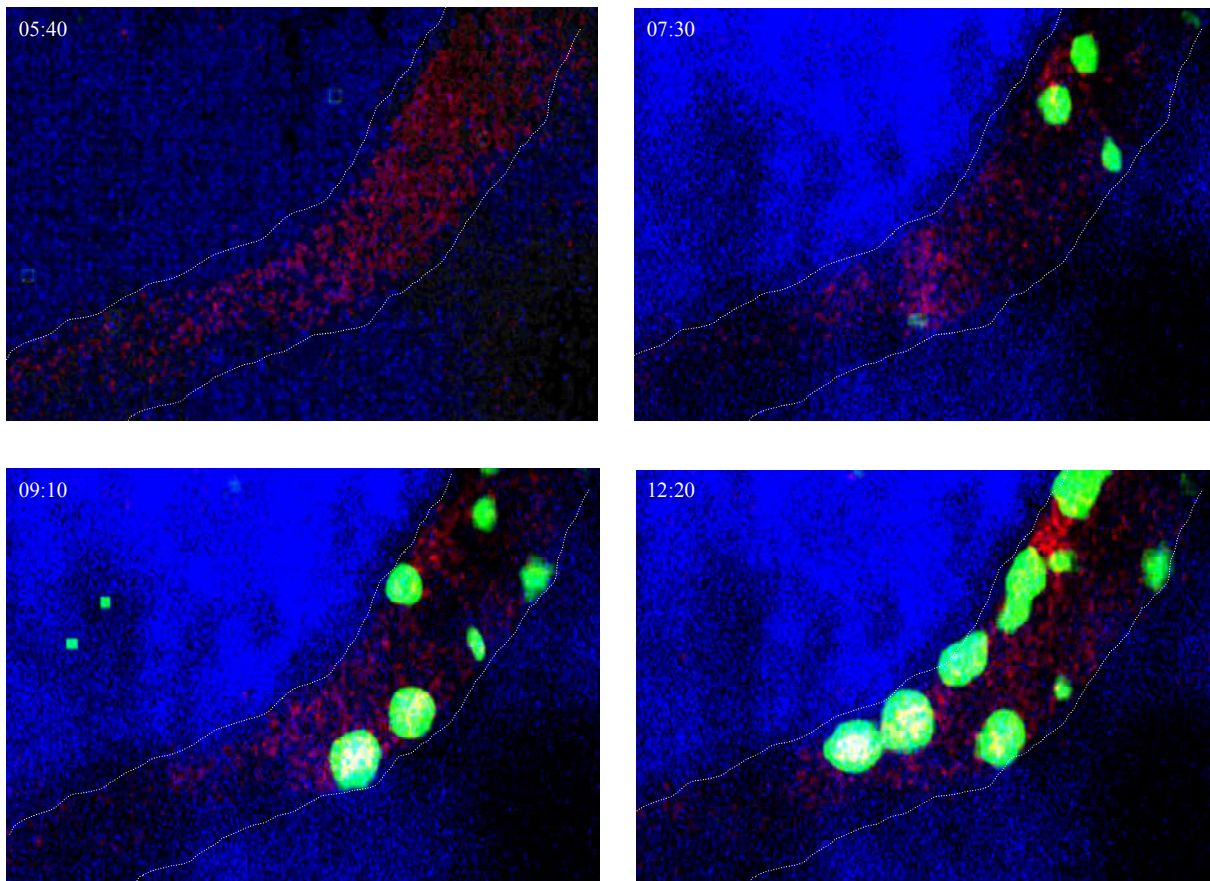


Abbildung 24: Phototoxische Schädigung, Zweiphotonenmikroskopie einer postkapillären Venole einer LysM eGFP/eGFP Maus bei einer angewandten Laserstärke von 5-10%; Im Verlauf beginnt eine zunehmende Zahl Neutrophiler Granulozyten adhären zu werden und zu crawlen

Zusammenfassend zeigten die Versuche dieses Abschnitts, dass die Wahl des Versuchsaufbaus die Ergebnisse signifikant verändern kann. Sowohl die verwendete Färbung als auch eine Erhöhung der Laserstärke des Mikroskops sind im Stande das Crawlingverhalten der Leukozyten zu beeinflussen.

4.4 Crawling während einer akuten Entzündung

Crawling stellt sich in unterschiedlicher Form dar, abhängig davon, ob die Umgebung im *Steady-State* oder entzündlich verändert ist. Deshalb verwendeten wir im nächsten Schritt eine Versuchsanordnung, in der die leukozytäre Bewegung während einer akuten Entzündung beobachtet werden konnte. Das Ziel dieses Teils der Arbeit war zu untersuchen, auf welche Art die verschiedenen Zellpopulationen auf veränderte Umgebungsbedingungen reagieren.

4.4.1 Schaffung einer inflammatorischen Reaktion durch Gabe von KC und Überprüfung des Wirkmechanismus

Um eine entzündliche Umgebung zu schaffen, verwendeten wir das Chemokin KC (CXCL1). Die in der Literatur beschriebenen Wirkungen von KC wurden in Vorversuchen an C57BL/6-Wildtypmäusen bei Färbung mit Rh6G überprüft. Hierbei bestätigte sich der schnelle Anstieg von transmigrierenden Zellen und damit auch des Crawlens als Antwort auf die Applikation. Im Vorfeld wurde überprüft, ob Crawling ein chemokin- beziehungsweise GPCR-abhängiger Prozess ist. Hierfür verwendeten wir das Bordetella-pertussis-Toxin PTX, das Einfluss auf diese Rezeptoren hat. (s. Abb. 8)

Nach der Gabe von PTX zeigte sich, dass in den beobachteten Gefäßen weniger Zellen crawlten als bei den durchgeführten Kontrollen. Hierbei wurden die Versuchsgruppen nach dem beobachteten Intervall nach PTX-Gabe eingeteilt. Ausgewertet wurden Experimente nach drei Stunden und weitere nach sechs Stunden. (s. Abb. 25)

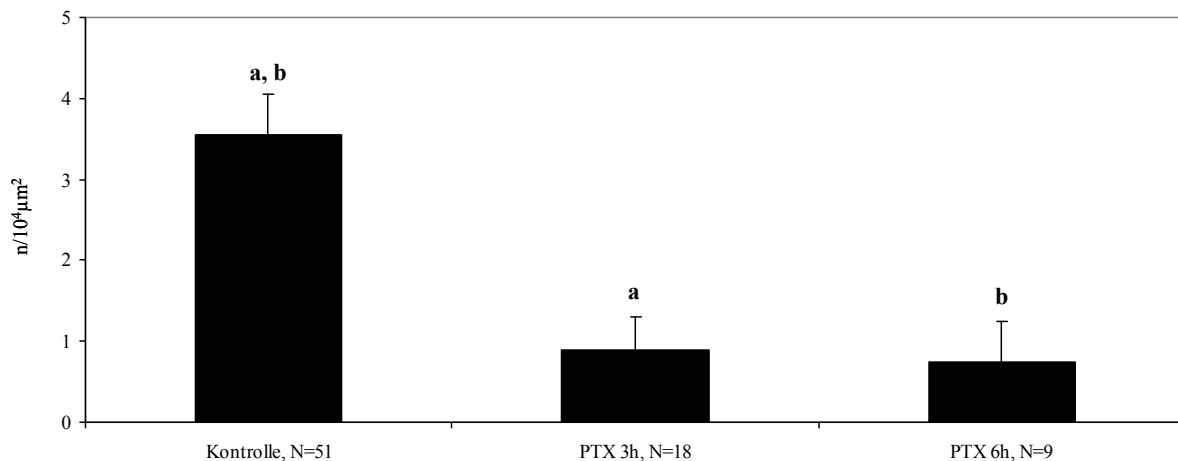


Abbildung 25: Überprüfung der KC-Wirkung durch die Gabe von Pertussistoxin. Es kam zu einer anhaltenden Reduktion des Crawlings von Leukozyten in C57BL/6 Wildtypmäusen bei Färbung mit Rh6G im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte +/- Standardabweichung; Anova-Test, mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Gruppen unterscheiden sich mit einer Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$), N=Anzahl der Gefäße

4 ERGEBNISSE

Die gezeigte signifikante Reduktion crawlender Zellen erklärt sich daraus, dass PTX G-Protein-gekoppelte Rezeptoren hemmt, über die KC seine „entzündliche“ Wirkung entfaltet. Damit bestätigte sich die inflammatorische Wirkung des Chemokins über GPCR-Rezeptoren, seine Wirkung auf die leukozytäre Migration und damit das Crawling.

4.4.2 Crawlingverhalten nach KC-Entzündungsreiz: Unterschiede zwischen Neutrophilen Granulozyten und Monozyten

Im nächsten Schritt sollte die Frage beantwortet werden, ob leukozytäre Subpopulationen eine induzierte Entzündung auf verschiedene Arten beantworten und worin diese Unterschiede gegebenenfalls bestehen.

Den Versuchstieren wurde hierfür intraarteriell einmalig 600ng KC appliziert. Nach diesem Entzündungsreiz wurden 60-minütige intravitalmikroskopische Aufnahmen gestartet.

Bei der Gegenüberstellung von *Steady-State* und Entzündung zeigte sich ein Unterschied im Verhalten der Leukozytensubpopulationen. Während unabhängig vom Entzündungsgeschehen vergleichbare Zahlen von Monozyten Crawling zeigten (2,3 und 2,2/10⁴µm²), war bei Neutrophilen Granulozyten ab KC-Gabe ein deutlicher Anstieg zu beobachten (von 0,8 auf 4,4/10⁴µm²). (s. Abb. 26)

Auch bei der Geschwindigkeit zeigte sich eine Veränderung bei Neutrophilen Granulozyten (Abnahme von 17,8 µm/min auf 9,8µm/min) unter Entzündungsbedingungen. Sie glichen sich hierbei den Monozyten an, deren Crawlinggeschwindigkeit sich im Vergleich zwischen *Steady-State* und Entzündung nicht signifikant veränderte (10,8 und 11,1µm/min). (s. Abb. 20)

4 ERGEBNISSE

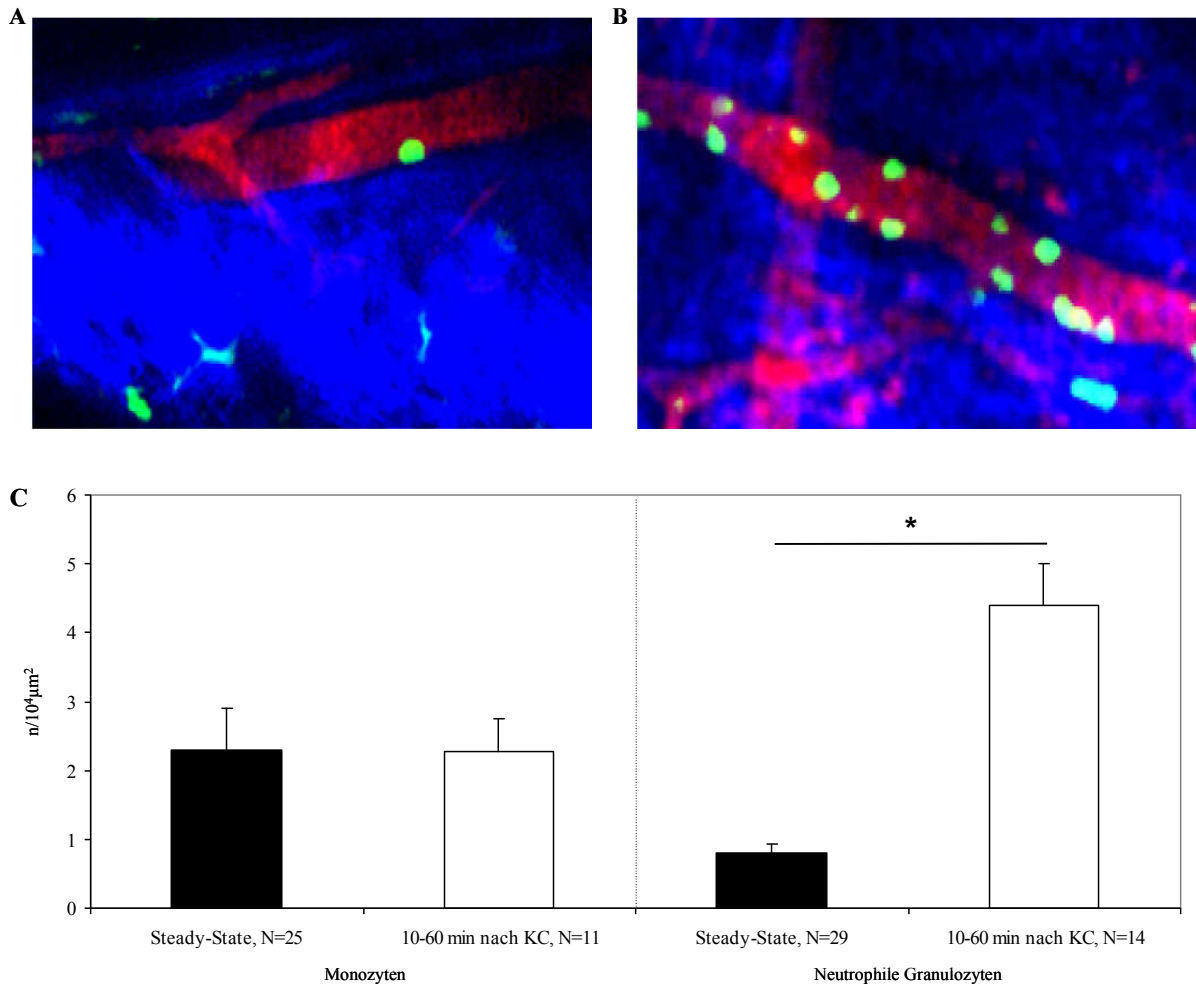


Abbildung 26: Vergleich der Anzahl crawlender Leukozyten zwischen *Steady-State* und *KC-induzierter Entzündung* (A)intravitalmikroskopische Aufnahme crawlender Monozyten nach *KC*-Applikation in einer *Cx3CR1 eGFP/+* Maus (B)intravitalmikroskopische Aufnahme crawlender PMNs nach *KC*-Applikation in einer *LysM eGFP/eGFP* Maus (C)quantitative Auswertung crawlender Monozyten und Neutrophiler Granulozyten, *Steady-State* vs. *Entzündung* (C: Mittelwert +/- Standardabweichung, *t*-Test; * $p < 0,05$), *N*=Anzahl der GefäÙe

Im Anschluss analysierten wir Richtung und Muster der Crawlingbewegung. (s. Abb. 27)

Nach *KC*-Applikation crawlten Monozyten und Neutrophile Granulozyten im Vergleich zum *Steady-State* vermehrt auch gegen die BlutfluÙrichtung oder senkrecht dazu.

Bei der Analyse der Crawlingmuster ergaben sich Unterschiede zwischen Monozyten und Neutrophilen Granulozyten. Während Neutrophile Granulozyten im *Steady-State* vorwiegend kurze Strecken während des Crawlens zurücklegten (Hauptmuster *short*), crawlten nach *KC*-Gabe die meisten Zellen in der Form *hairpin*. Bei Monozyten war dies die Hauptbewegungsform, sowohl im *Steady-State*, als auch während der Entzündung, wobei sich nach dem Setzen des Entzündungsreizes die Variabilität der Muster erhöhte. Dies zeigte sich daran, dass sich der prozentuale Anteil der Hauptmuster verringerte und in zusätzlichem Umfang weitere Muster auftraten.

4 ERGEBNISSE

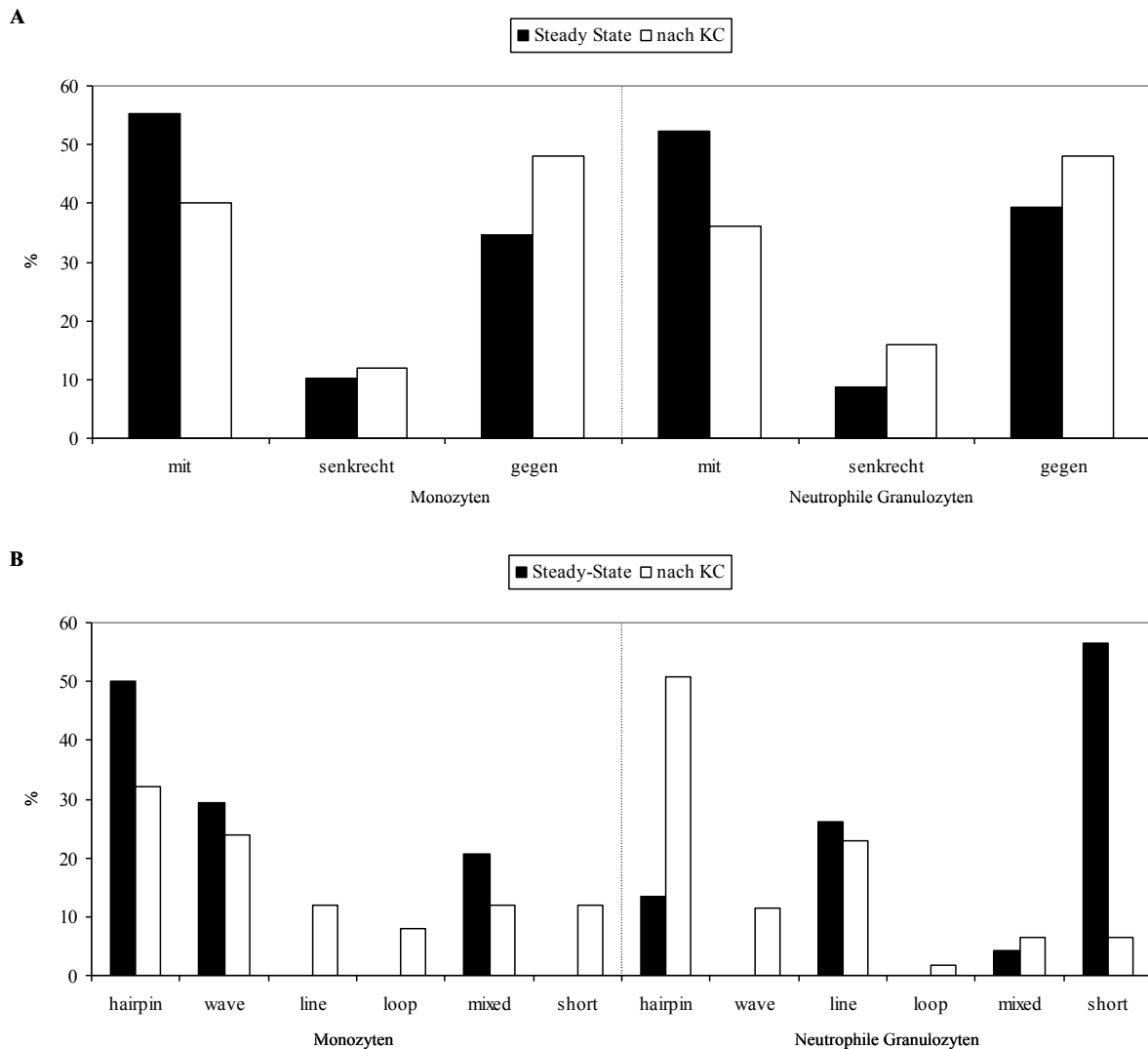


Abbildung 27: Gegenüberstellung von Crawlingrichtung (A) und -muster (B) im unstimulierten Steady-State und während einer KC-induzierten Entzündung, $n(\text{Monozyten Steady-State})=58$, $n(\text{Monozyten KC})=25$, $n(\text{PMN Steady-State})=23$, $n(\text{PMN KC})=61$

Die vorliegenden Daten untermauern die Hypothese, dass sich Crawling zwischen *Steady-State*-Bedingungen und im Rahmen einer Entzündung zwischen den Leukozytenpopulationen unterscheidet. Neutrophile Granulozyten crawlten nach KC sowohl in größerer Anzahl als auch langsamer. Monozyten und Neutrophile Granulozyten bewegten sich nach dem Entzündungsreiz vor allem im Muster *hairpin* und vermehrt auch entgegengesetzt des Blutflusses.

4.5 Die Wirkung blockierender Antikörper auf das Crawlingverhalten leukozytärer Subpopulationen unter *Steady-State*-Bedingungen und während einer Entzündung

Im nächsten Teil der Studie untersuchten wir die Rolle der Beta2-Integrine LFA-1 und Mac-1 und ihres endothelseitigen Liganden ICAM-1 auf das Crawling Neutrophiler Granulozyten

4 ERGEBNISSE

und Monozyten mittels spezifischer Antikörper und durch das von uns etablierte *Single-Cell-Tracking*.

Im Anschluss wurden Geschwindigkeit, Strecke, Richtung, Muster, Bewegung pro Zeiteinheit und Dauer des Crawlings analysiert. Aufgrund der Ergebnisse des vorangegangenen Abschnitts wurden Monozyten unter *Steady-State*-Bedingungen und Neutrophile Granulozyten nach KC-Stimulation untersucht.

4.5.1 Der Effekt von Anti-CD11a-Antikörpern auf Crawling

Im folgenden Abschnitt lag der Fokus auf der Rolle von LFA-1 (im Speziellen seiner Untereinheit CD11a) für das Crawlingverhalten von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten.

Analysiert wurden hier die leukozytären (Crawlingdauer, -geschwindigkeit, -richtung, -muster) und hämodynamischen Parameter. Sie waren vergleichbar zwischen den Versuchsgruppen. (s. Tab. 9, 10)

Die durchschnittlich gemessenen Bewegungsgeschwindigkeiten zeigt Abbildung 28.

	CX3CR1 eGFP/+ IgG2a-AK/ vor AK	CX3CR1 eGFP/+ Nach Anti- CD11a	LysM eGFP/eGFP IgG2a-AK/ vor AK	LysM eGFP/eGFP Nach Anti- CD11a
n (Anzahl der Zellen)	58	18	61	11
Mittlere Crawlinggeschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{min}$)	10,8 \pm 1,1	9,4 \pm 3,2	9,8 \pm 0,9	12,2 \pm 1,6
Hauptcrawlingrichtung zum Blutfluss (n)	Gegen 20, senkrecht 6, mit 32	Gegen 4, senkrecht 4, mit 10	Gegen 29, senkrecht 10, mit 22	Gegen 4, senkrecht 1, mit 6
Hauptmuster	<i>Hairpin, wave, mixed</i>	<i>Hairpin, wave, short, mixed</i>	<i>Hairpin, wave line</i>	<i>Hairpin, wave line, short</i>

Table 10: *Crawlingparameter der durchgeführten Versuche mit CX3CR1 eGFP/+ und LysM eGFP/eGFP Tieren und Anti-CD11a-Antikörpern in Gegenüberstellung mit den Kontrollen (in die Auswertung miteinbezogen sind auch die kurzen Bewegungen der Zellen unmittelbar vor AK-induzierter Ablösung)*

4 ERGEBNISSE

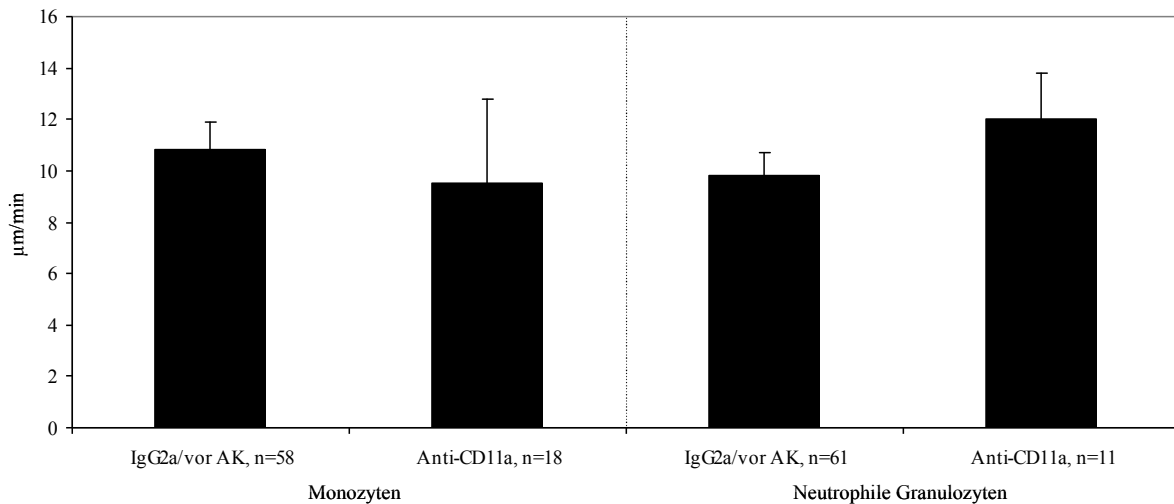


Abbildung 28: Analyse der Crawlinggeschwindigkeiten nach Antikörperapplikation (CD11a) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert +/- Standardabweichung; t-Test, * $p < 0,05$)

Nach Gabe von gegen CD-11a-gerichteten Antikörpern nicht jedoch in den Kontrollgruppen änderten einige Leukozyten ihr Crawlingverhalten. 61,1% der Monozyten und 72,7% der Neutrophilen Granulozyten lösten sich vom Endothel. (s. Abb. 29)

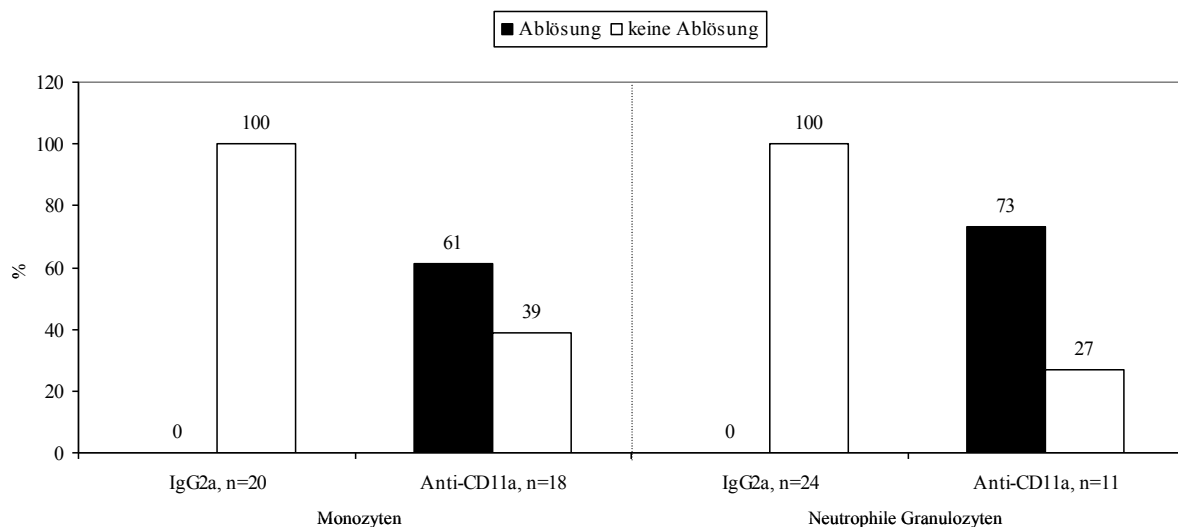


Abbildung 29: Ablösender Effekt von CD11a auf crawlende Leukozyten; Im Vergleich zu den IgG2a-Kontrollgruppen lösten sich nach Anti-CD11a-Applikation vermehrt Monozyten und Neutrophile Granulozyten vom Endothel

Wenn aber, wie diese Reaktion vermuten lässt, CD11a obligat für Crawling ist, stellt sich die Frage, warum sich nicht alle beobachteten Leukozyten vom Endothel lösten und der Antikörperereffekt so unerwartet schwach war.

Da in früheren Studien in vitro bei T-Zellen eine scherkraftabhängige Signalgebung von LFA-1 gezeigt werden konnte (Shulman et al., 2009), wurden in diesem Abschnitt unserer

4 ERGEBNISSE

Versuche Gruppen - definiert durch die Höhe der Scherkräfte - gebildet und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Das Verhalten der crawlenden Zellen wurde abhängig davon untersucht, ob sie sich in Gefäßen mit schneller oder langsamer Fließgeschwindigkeit aufhielten, und welche Scherkräfte beziehungsweise welche Zugspannung in diesem Zusammenhang auftraten. Verglichen wurde das Verhalten von Monozyten (im *Steady-State*) mit dem von Neutrophilen Granulozyten (im Entzündungsmodell).

Beim Vergleich des Crawlings aller untersuchten Zellen in den scherkraftdefinierten Gruppen (*low-shear* und *high-shear*, Grenze/*Cut off* bei 400s^{-1}) zeigten sich vor Gabe eines Antikörpers ähnliche Crawlinggeschwindigkeiten um $10\mu\text{m}/\text{min}$. (s. Abb 30)

An diesem Parameter änderte sich im Rahmen der LFA-1-Versuchsgruppen nichts, unabhängig von der Höhe der Scherrate.

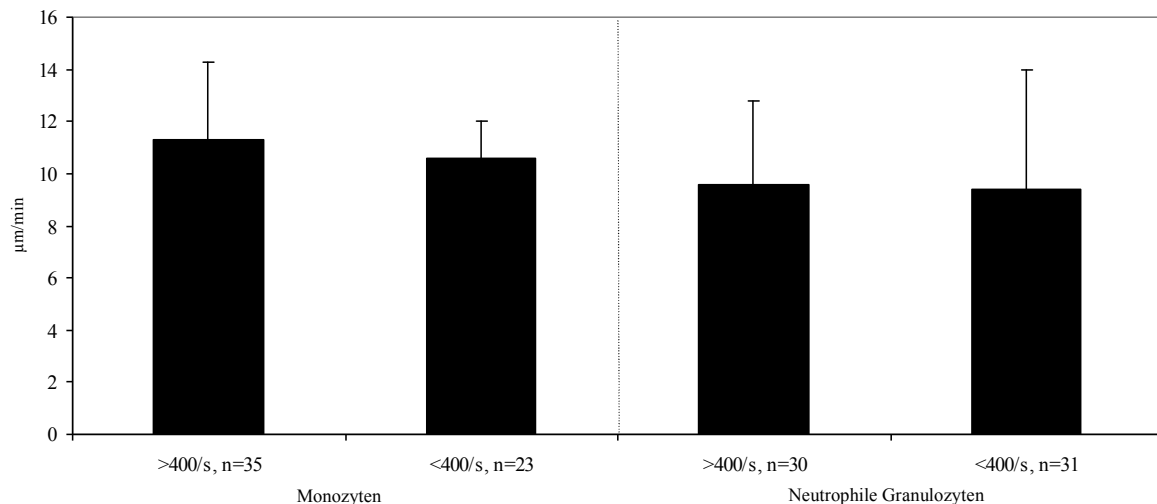


Abbildung 30: Vergleich der Crawlinggeschwindigkeiten von Leukozyten abhängig von ihrer Zuordnung zur entsprechenden *shear*-Gruppe; Crawlinggeschwindigkeit von Monozyten unter *Steady-State*-Bedingungen und von Neutrophilen Granulozyten im Entzündungsmodell; (Mittelwert +/- Standardabweichung, *t*-Test; $*p < 0,05$), *n*=Anzahl der Zellen

Eine interessante Beobachtung hierbei jedoch war, dass die ablösende Wirkung von Anti-CD11a-Antikörpern hauptsächlich in Gefäßen hoher Scherrate auftrat. Sowohl Monozyten im *Steady-State* als auch Neutrophile Granulozyten nach KC-Stimulation lösten sich hier häufiger als im Gesamtkollektiv kurz (durchschnittlich $0,82\text{min}$) nach der Applikation des CD11a-Antikörpers vom Endothel. (s. Abb. 31, 32)

84,6% der Monozyten und alle PMNs zeigten ein derartiges Verhalten. Nach Anti-LFA-1-Gabe crawlten deutlich weniger Leukozyten in diesen Gefäßen. Dies äußerte sich auch darin, dass keine neuen Zellen begannen zu crawlen.

4 ERGEBNISSE

In Gefäßen mit niedriger Scherrate war dieser Effekt bei Monozyten nicht sichtbar. Hier crawlten die Zellen unverändert in Richtung und Geschwindigkeit. (s. Abb. 32)

Monozyten crawlten nach Antikörperapplikation mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $9,4\mu\text{m}/\text{min}$ vor allem mit dem Blutfluss in den Mustern *hairpin*, *wave*, *short* und *mixed*. (s. Tab. 10)

In der Gruppe der Neutrophilen Granulozyten löste sich jedoch die Hälfte der crawlenden Zellen auch in Gefäßen niedriger Scherrate. (s. Abb. 32)

Neutrophile Granulozyten bewegten sich unter KC-Stimulation nach Applikation von Antikörpern mit einer mittleren Geschwindigkeit von $12,2\mu\text{m}/\text{min}$. Sie taten dies vorwiegend mit dem Blutfluss und in den Mustern *hairpin*, *wave*, *short* und *line*. (s. Tab. 10)

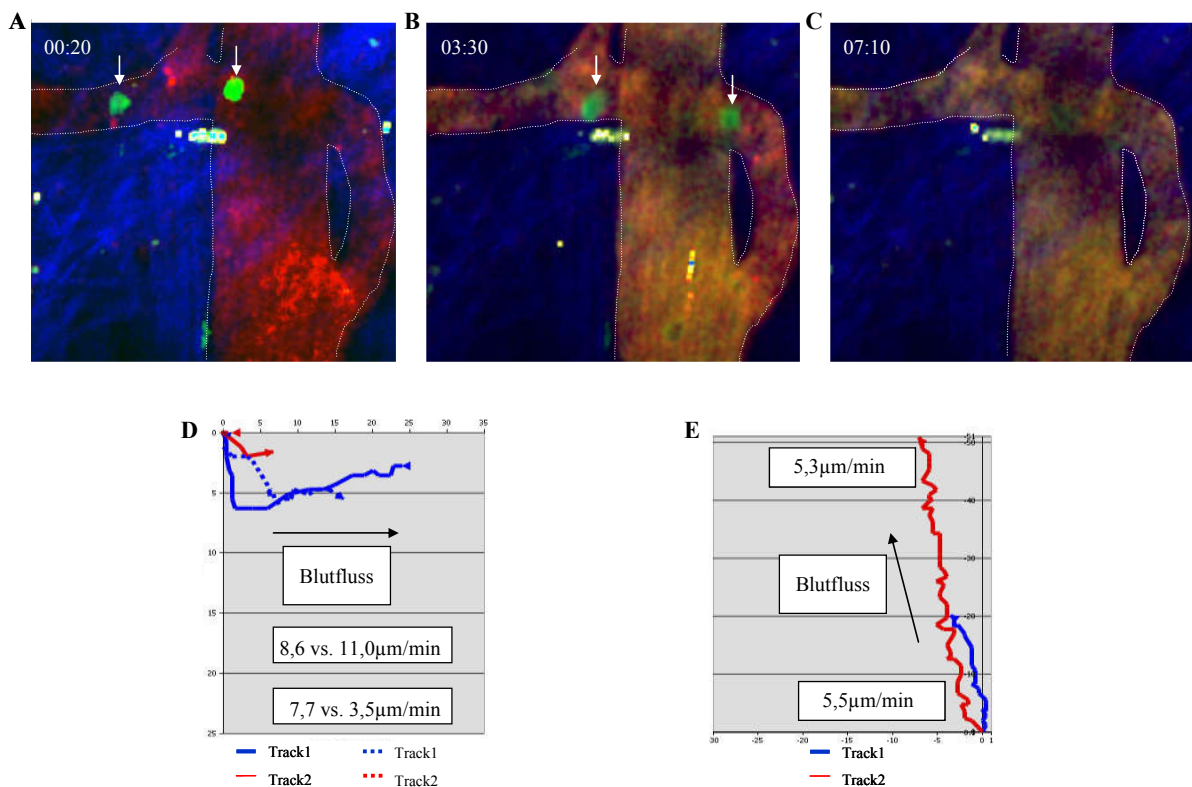


Abbildung 31: Zweiphotonenmikroskopische Aufnahmen und Beispieltracks crawlender Monozyten (Markierung durch Pfeile) der Versuche mit CD11a-blockierenden Antikörpern, Steady-State (A) Crawlende Monozyten während Steady-State vor Gabe eines Anti-CD11a-Antikörpers (B) Crawlende Monozyten während Gabe eines Anti-CD11a-Antikörpers (C) Ablösung im Anschluss der Gabe eines Anti-CD11a-Antikörpers (D) die Zellen lösten sich nach Gabe des blockierenden Antikörpers gegen LFA-1 in high-shear-Gefäßen ab. (E) Im Gegensatz dazu blieb die Geschwindigkeit der Crawlingbewegung in einem low-shear-Gefäß nach Antikörpergabe unverändert, die crawlende Zelle löste sich nicht vom Endothel (blaue Linien kennzeichnen den Weg der Zelle vor Gabe des Antikörpers, rote Linien den Weg danach)

4 ERGEBNISSE

Ob sich eine crawlende Zelle ablöste, stand in unseren Versuchen in keinem Zusammenhang mit ihrer primären Bewegungsrichtung bezogen auf den Blutfluss, ein Richtungswechsel in direktem Zusammenhang mit Injektion des Antikörpers war nicht zu beobachten (Daten nicht dargestellt).

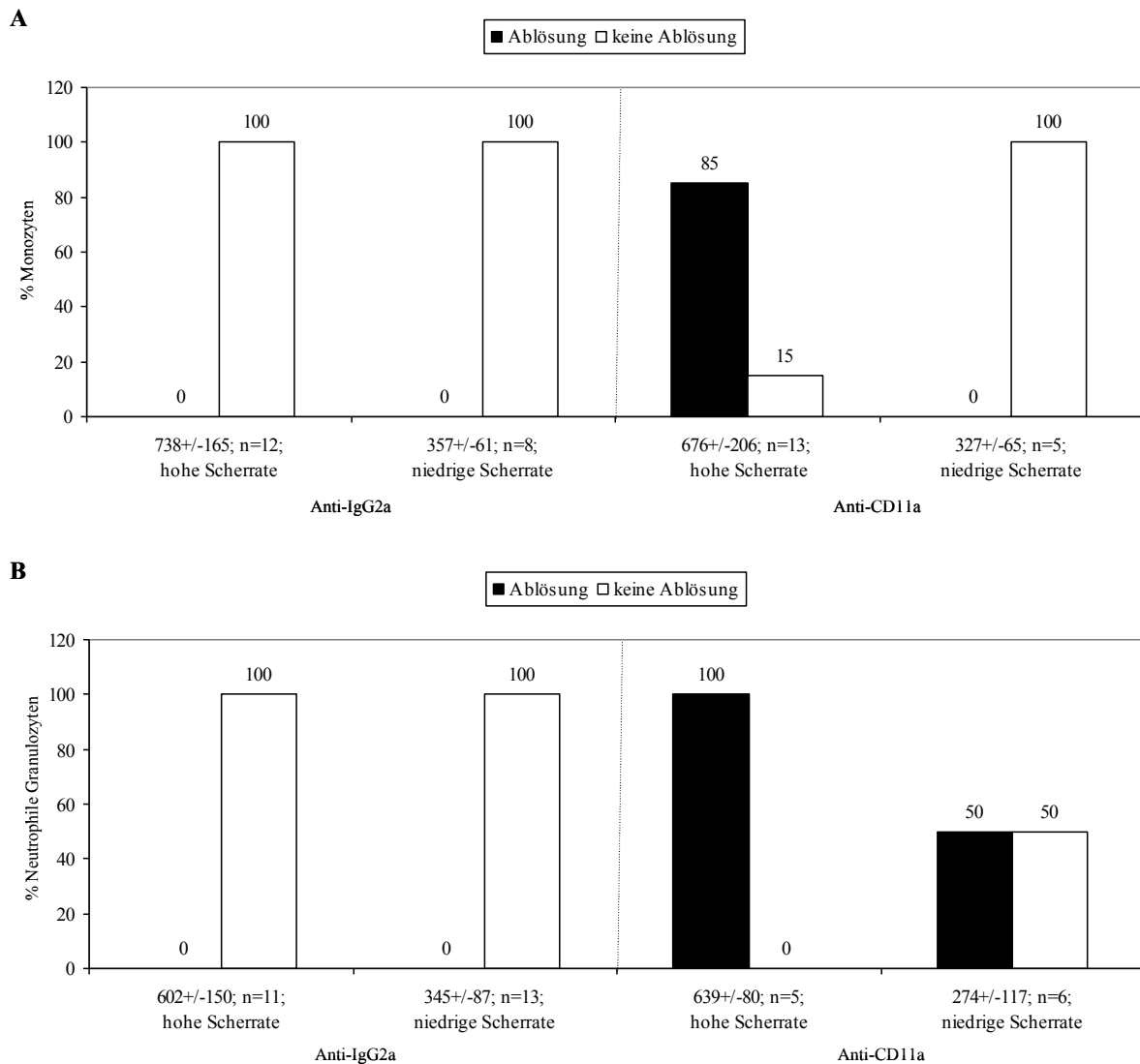


Abbildung 32: Effekt von Anti-CD11a auf das Crawlingverhalten von Leukozyten abhängig von der Scherrate: (A) Der Großteil der Monozyten in Gefäßen mit hoher Scherrate löste sich bei Gabe von CD11a-blockierenden Antikörpern vom Endothel oder hielt an. Dieses Phänomen zeigte sich in keinem Gefäß mit niedriger Scherrate. (B) Alle Neutrophilen Granulozyten in Gefäßen mit hoher Scherrate lösten ihre Verbindung mit dem Endothel und crawlten nicht mehr, nachdem der Antikörper appliziert wurde. Dieses Verhalten wurde auch bei 50% der Neutrophilen Granulozyten in Gefäßen mit niedriger Scherrate beobachtet, n=Anzahl der Zellen

Die Ergebnisse aus diesem Teil der Studie zeigen die Abhängigkeit leukozytären Crawlens von CD11a bei beiden untersuchten Populationen, abhängig von den im Gefäß herrschenden Scherkräften. Vorwiegend bei hoher Scherrate konnten sich crawlende Zellen nach der

4 ERGEBNISSE

Applikation blockierender Anti-CD11a-Antikörper nicht mehr am Endothel halten und lösten sich ab. In Gefäßen niedriger Scherrate hingegen scheint LFA-1 eine untergeordnete Rolle in der Crawlingregulation zu spielen.

4.5.2 Der Effekt von Anti-CD11b-Antikörpern auf Crawling

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Wirkung von Mac-1 auf das Crawling.

Die entsprechenden leukozytären und hämodynamischen Parameter waren vergleichbar zwischen den Versuchsgruppen. (s. Tab. 9, 11)

	CX3CR1 eGFP/+ IgG2a-AK/ vor AK	CX3CR1 eGFP/+ Nach Anti- CD11b	LysM eGFP/eGFP IgG2a-AK/ vor AK	LysM eGFP/eGFP Nach Anti- CD11b
n (Anzahl der Zellen)	58	15	61	19
Mittlere Crawlinggeschwindigkeit (µm/min)	10,8+/-1,1	9,9+/-3,5	9,8+/-0,9	9,3+/-5,5
Hauptcrawlingrichtung zum Blutfluss (n)	Gegen 20, senkrecht 6, mit 32	Mit 13 Angehalten:2	Gegen 29, senkrecht 10, mit 22	Gegen 2, senkrecht 2 , mit 15
Hauptmuster	<i>Hairpin, wave, mixed</i>	<i>Hairpin, wave, mixed</i>	<i>Hairpin, wave line</i>	<i>Hairpin, wave line</i>

Table 11: *Crawlingparameter der durchgeführten Versuche mit CX3CR1 eGFP/+ und LysM eGFP/eGFP Tieren und Anti-CD11b-Antikörpern in Gegenüberstellung mit den Kontrollen*

Monozyten zeigten vor allem *hairpin*, *wave* und *mixed*, Neutrophile Granulozyten *hairpin*, *wave* und *line*, unabhängig von dem Anti-Mac-1-AK.

Eine Ablösung der crawlenden Leukozyten trat weder in Zusammenhang mit Anti-Mac-1 noch mit dem Kontrollantikörper auf. (s. Abb. 33)

Auch die Geschwindigkeit der Crawlingbewegung blieb von der Gabe eines gegen CD11b-gerichteten Antikörpers weitestgehend unbeeinflusst. (s. Abb. 34, Tab. 11)

4 ERGEBNISSE

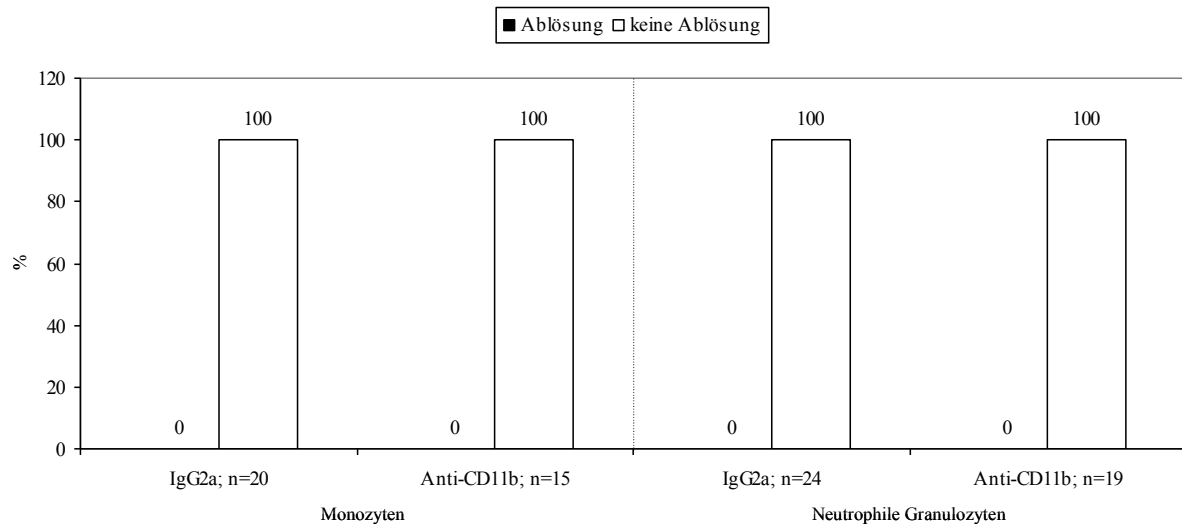


Abbildung 33: Darstellung des Verhaltens von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten nach Anti-CD11b-Applikation in Bezug auf eine mögliche AK-bedingte Ablösung, n= Anzahl der Zellen

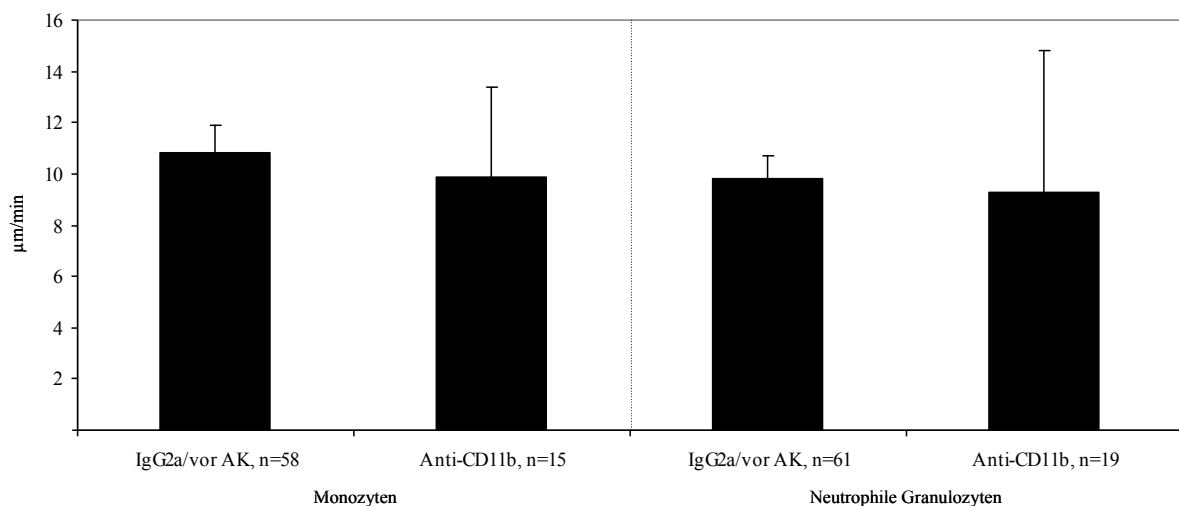


Abbildung 34: Analyse der Crawlinggeschwindigkeit nach Antikörperapplikation (CD11b) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert +/- Standardabweichung; t-Test, * $p < 0,05$), n=Anzahl der Zellen

Nach der Applikation zeigten sich jedoch unterschiedliche Phänomene, abhängig davon, in welche Richtung die Zellen im Vorfeld gecrawlt waren. (s. Abb. 35, 36)

Während sich bei den Leukozyten, die mit der Blutflussrichtung crawlten, keine signifikanten Unterschiede zeigten, war bei der Mehrheit der primär gegen die Flussrichtung crawlenden Zellen zu beobachten, dass sie ihre Bewegungsrichtung änderten. 22% der richtungswechselnden Neutrophilen Granulozyten bewegten sich im Anschluss senkrecht zum Blutfluss, die übrigen 78% und alle richtungswechselnden Monozyten mit der Blutflussrichtung. (s. Tab. 11)

4 ERGEBNISSE

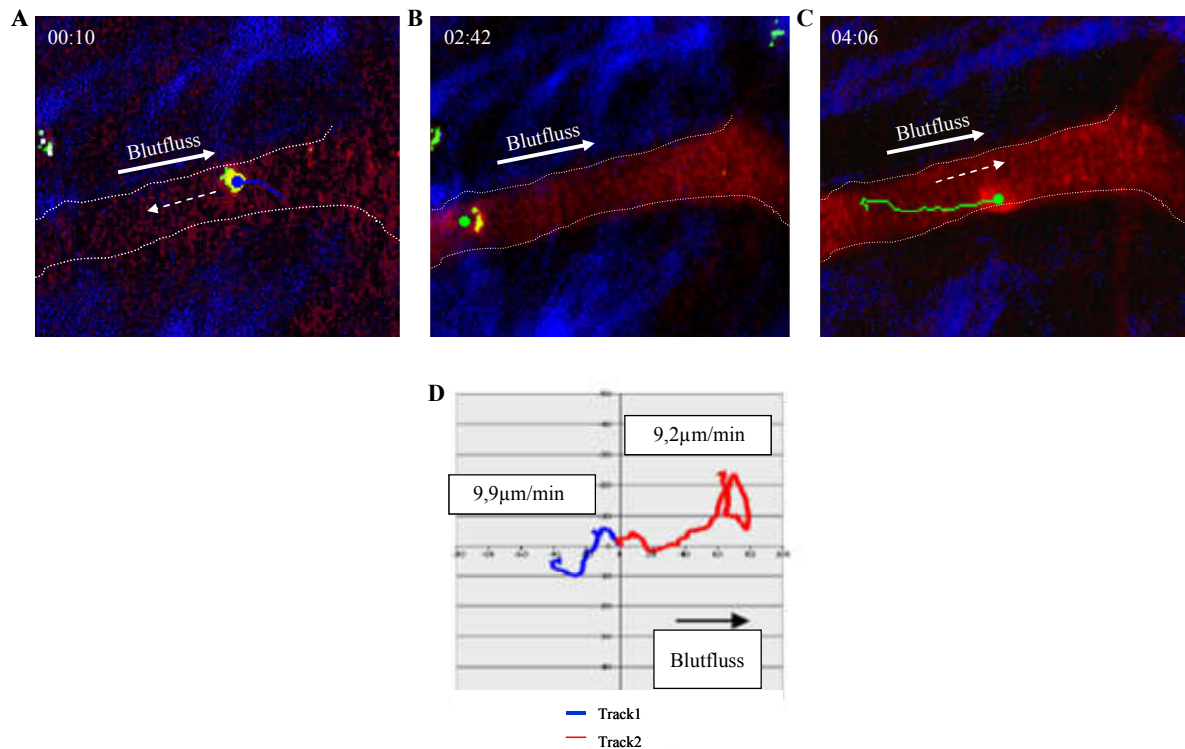


Abbildung 35: Zweiphotonenmikroskopische Bilder eines crawlenden Monozyten in einer postkapillären Venole einer CX3CR1 eGFP/+ Maus unter Steady-State-Bedingungen (A) vor Injektion des blockierenden Antikörpers gegen CD11b (Zellbewegung blau) (B) während Injektion des blockierenden Antikörpers gegen CD11b und (C) nach Injektion des blockierenden Antikörpers gegen CD11b (Zellbewegung grün) (Pfeile kennzeichnen die Richtung des Blutflusses und der Crawlingbewegung) (D) Einzelanalyse der Crawlingbewegung mittels Single-Cell-Tracking (die blaue Markierung entspricht der Crawlingbewegung des Monozyten gegen den Blutfluss vor der Gabe des Antikörpers, die rote Markierung dem Pfad nach Richtungswechsel als Folge der Intervention)

Interessanterweise zeigte sich dieses Phänomen des Richtungswechsels sowohl bei Monozyten unter *Steady-State*-Bedingungen als auch bei PMNs nach KC-Stimulation. So änderten 77,8% dieser Monozyten ihre Bewegungsrichtung und crawlten nach CD11b-AK-Gabe in Richtung des Blutflusses, 22,2% der Monozyten hielten an. (s. Abb. 36)

Diese Reaktion konnte in keinem der Fälle beobachtet werden, in denen die Zellen primär mit dem Blutfluss gecrawlt waren oder in denen ein Kontrollantikörper gegeben wurde. (s. Abb. 36)

Neutrophile Granulozyten zeigten ein ähnliches Verhalten. Ein Großteil (81,8%) der zu Beginn gegen den Fluss crawlenden Zellen wechselte die Richtung. Kein Effekt zeigte sich bei Zellen, die sich von Anfang an mit dem Blutfluss bewegten. Kein Neutrophiler Granulozyt hielt als Reaktion auf den Antikörper an. (s. Abb. 36)

Das Phänomen des Richtungswechsels konnte auch in 33,3% der LysM eGFP/eGFP Kontrollversuche beobachtet werden. (s. Abb. 36)

4 ERGEBNISSE

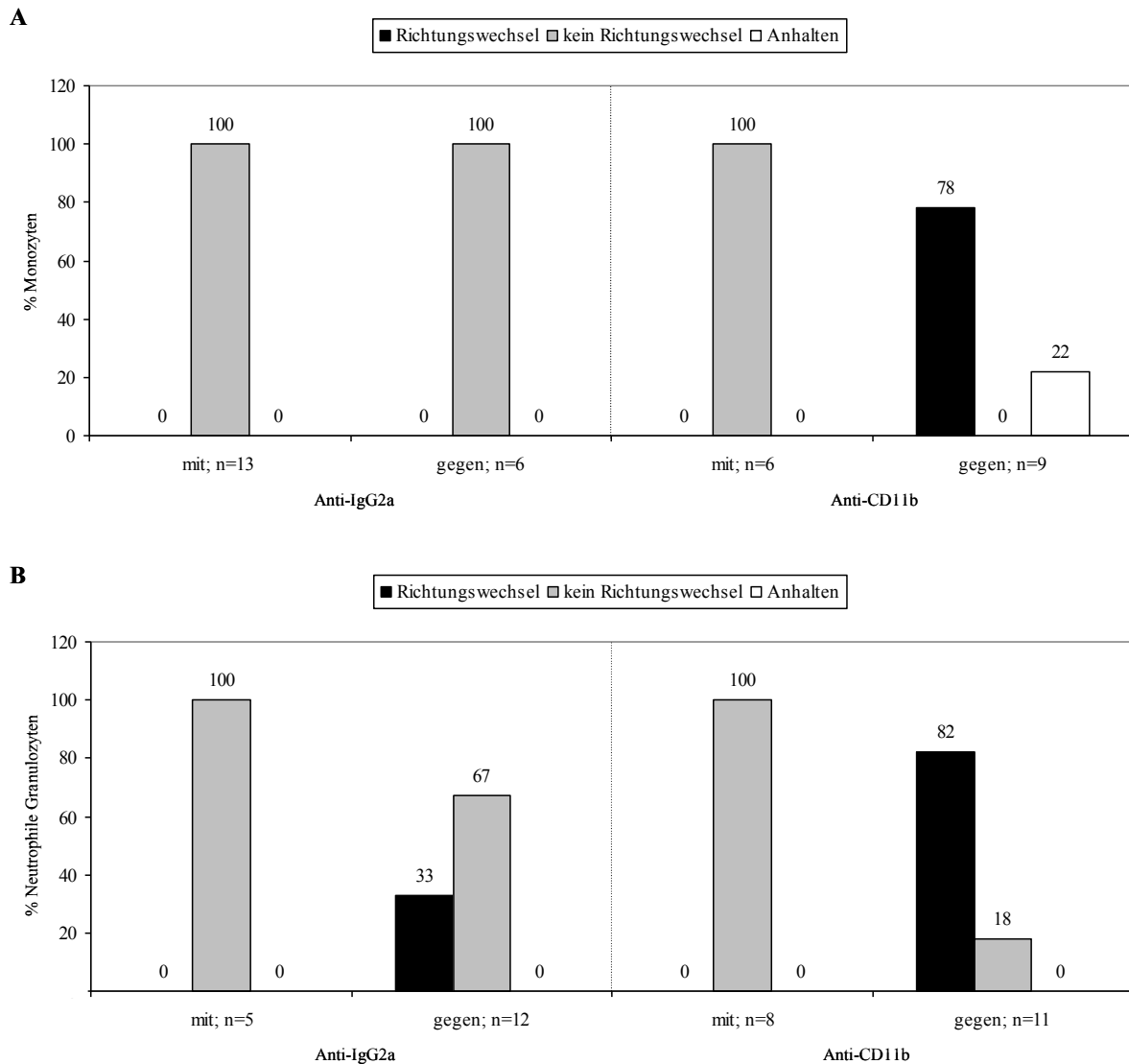


Abbildung 36: Wirkung von Anti-CD11b auf crawlende Leukozyten in Bezug auf einen Richtungswechsel, abhängig von ihrer ursprünglichen Bewegungsrichtung zum Blutfluss. (A) Die Mehrzahl der Monozyten unter Steady-State-Bedingungen reagierte mit einer Richtungsänderung auf die Gabe von gegen CD11b-gerichteten Antikörpern, wenn sie im Vorfeld gegen die Blutflussrichtung gecrawlt war, die übrigen dieser Monozyten hielten an. (B) Ein Großteil der Neutrophilen Granulozyten unter Entzündungsbedingungen reagierte ebenso mit einer Richtungsänderung auf AK-Gabe, Ein Teil der Zellen zeigte dieses Verhalten auch bei der Gabe eines Kontrollantikörpers, n=Anzahl der Zellen

Wurden bei den primär gegen den Blutfluss crawlenden Leukozyten analog zu den LFA-1-Versuchen durch die Höhe der Scherrate determinierte Gruppen gebildet, zeigte sich, dass Monozyten sowohl in Gefäßen mit hoher als auch mit niedriger Scherrate die Richtung änderten oder anhielten. (s. Abb. 37)

4 ERGEBNISSE

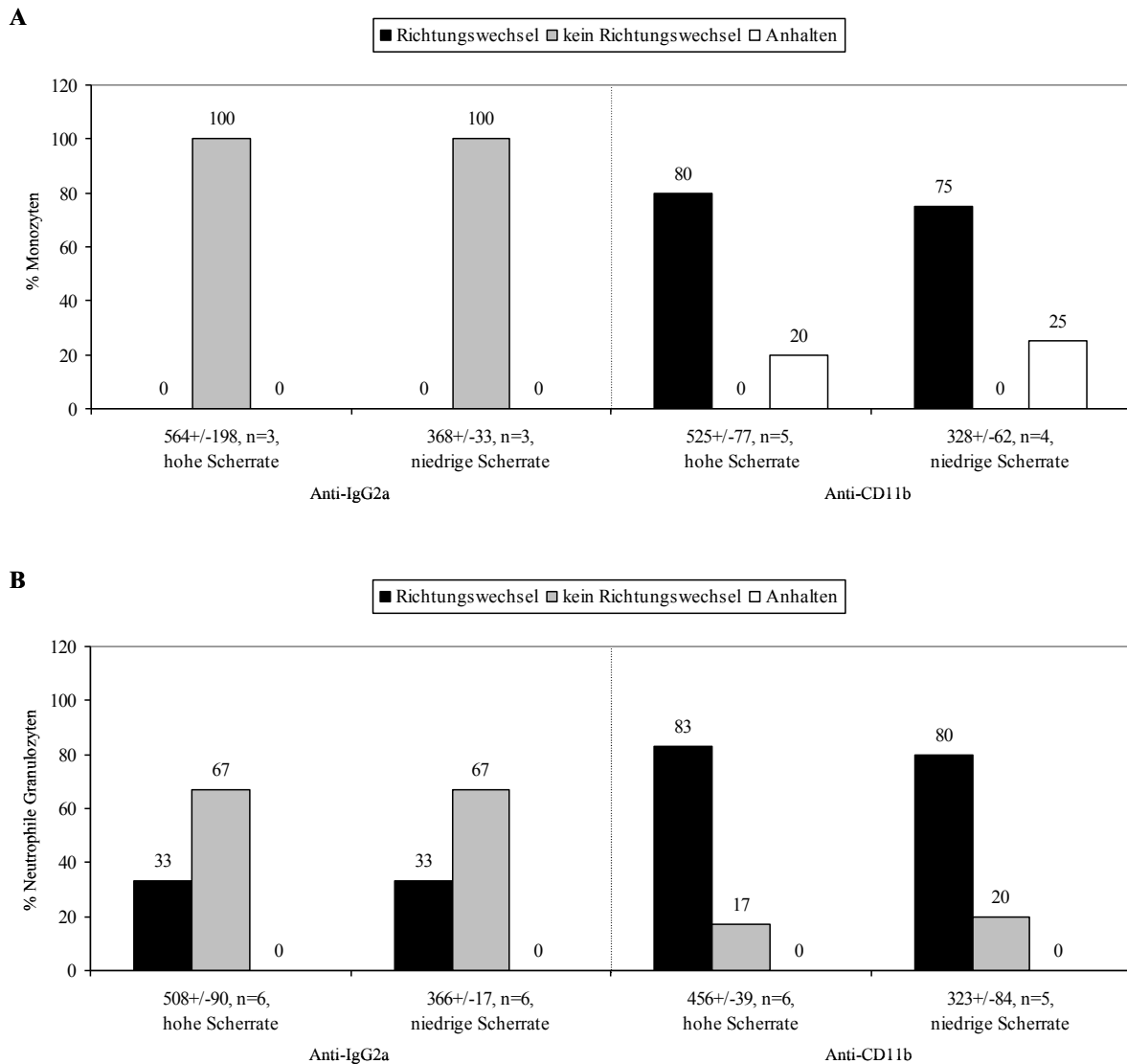


Abbildung 37: Wirkung von Anti-CD11b auf gegen den Blutfluss crawlende Leukozyten abhängig von der auftretende Scherrate: (A) Unterteilung der Versuche zur Untersuchung von Monozyten (B) Unterteilung der Versuche zur Untersuchung von Neutrophilen Granulozyten, n=Anzahl der Zellen

Die Neutrophilen Granulozyten, die den Richtungswechsel in der Kontrollgruppe zeigten, taten dies ebenfalls unabhängig von der im entsprechenden Gefäß herrschenden Scherrate.

Die Ergebnisse aus diesem Teil der Studie zeigen, dass die selektive Blockierung von CD11b häufig zu einem Richtungswechsel der crawlenden Zelle führte, wenn diese sich im Vorfeld entgegengesetzt der Blutflussrichtung bewegt hatte. Der Einfluss der im Gefäß wirkenden Scherkräfte auf die Bewegungsrichtung beziehungsweise einen Richtungswechsel scheint vernachlässigbar.

4.5.3 Der Effekt von Anti-ICAM-1-Antikörpern auf Crawling

Nachdem sich in den vorangegangenen Versuchen gezeigt hatte, dass die Blockierung sowohl von LFA-1 als auch von Mac-1 mittels Antikörpern Einfluss auf crawlende Zellen hat, wurde im nächsten Abschnitt der Stellenwert eines ihrer endothelseitigen Liganden untersucht.

Die Applikation eines Antikörpers gegen CD54 zeigte eine deutliche Wirkung auf die crawlende Leukozyten. Die Bewegungsgeschwindigkeit verminderte sich signifikant. (s. Abb. 38, Tab. 12)

Crawlten Monozyten in CX3CR1 eGFP/+ Mäusen in Kontrollen beziehungsweise im Vorfeld der Applikation mit 10,8µm/min, taten sie dies nach Gabe des blockierenden Antikörpers nur noch mit 1,3µm/min. PMNs crawlten normalerweise 9,8µm/min, nach AK-Gabe 1,2µm/min. Beide Populationen bewegten sich nach AK-Gabe unverändert im Verhältnis zum Blutfluss, Monozyten bevorzugt in den Mustern *hairpin*, *wave* und *mixed*, Neutrophile Granulozyten in *wave*, *hairpin* und *line*. (s. Tab. 12)

	CX3CR1 eGFP/+ IgG2a-AK/ vor AK	CX3CR1 eGFP/+ Nach Anti- CD54	LysM eGFP/eGFP IgG2a-AK/ vor AK	LysM eGFP/eGFP Nach Anti- CD54
n (Anzahl der Zellen)	58	5	61	7
Mittlere Crawlinggeschwindigkeit (µm/min)	10,8+/-1,1	1,3+/-0,6	9,8+/-0,9	1,2+/-0,4
Hauptcrawlingrichtung zum Blutfluss (n)	Gegen 20, senkrecht 6, mit 32	Gegen 1, senkrecht 1, mit 3	Gegen 29, senkrecht 10, mit 22	Gegen 2, senkrecht 2, mit 3
Hauptmuster	<i>Hairpin,</i> <i>wave, mixed</i>	<i>Hairpin,</i> <i>wave,</i> <i>mixed</i>	<i>Hairpin, wave</i> <i>line</i>	<i>Hairpin, wave</i> <i>line</i>

Table 12: *Crawlingparameter der durchgeführten Versuche mit CX3CR1 eGFP/+ und LysM eGFP/eGFP Tieren und Anti-CD54-Antikörpern in Gegenüberstellung mit den Kontrollen*

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sowohl die Beta2-Integrine LFA-1 und Mac-1 als auch der endothelseitige Ligand ICAM-1 wichtige Funktionen in der Regulation leukozytären Crawlings erfüllen. Ihr Einfluss scheint jedoch, abhängig von Charakteristika der Zelle und deren Umgebung, verschieden zu sein.

4 ERGEBNISSE

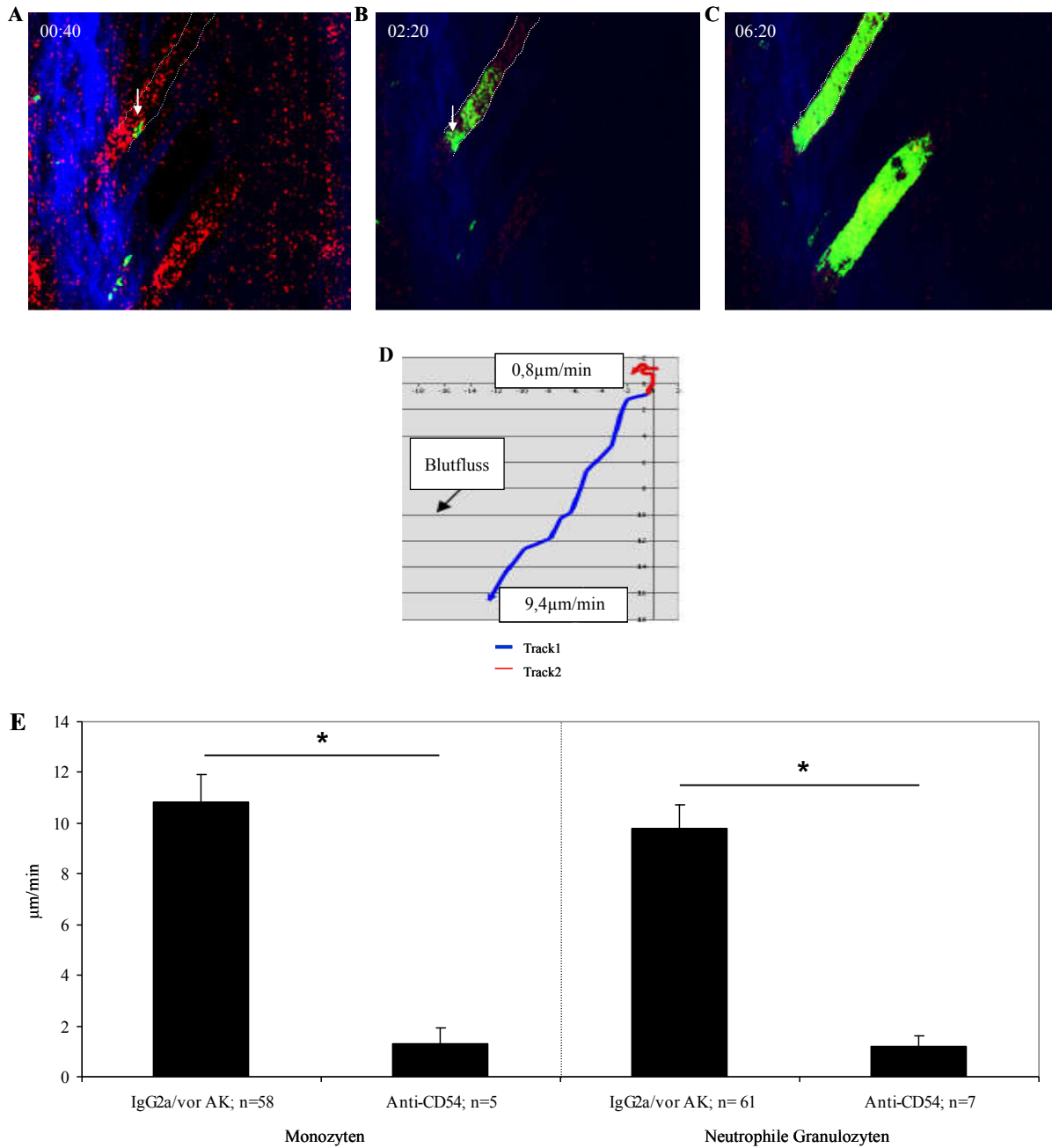


Abbildung 38: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines crawlenden Monozyten in einer CX3CR1 eGFP/+ Maus im Steady-State vor (A), während (B) und nach (C) Applikation des Anti-CD54-Antikörpers; (D) Single-Cell-Tracking (die blaue Markierung entspricht der Bewegung vor Antikörpergabe, die rote derjenigen im Anschluss daran); der Monozyt bewegt sich nach der Applikation des AK sehr langsam und crawlt letztendlich nicht mehr (E) Analyse der die Crawlinggeschwindigkeit (Mittelwert +/- Standardabweichung; t-Test, * $p < 0,05$) n =Anzahl der Zellen

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion von Material und Methoden

Mikroskopie

Um das Verhalten von Leukozyten zu untersuchen, stehen in vivo- und in vitro-Protokolle zur Verfügung. Die der Migration zugrundeliegenden Mechanismen unterscheiden sich allerdings zwischen diesen beiden Prinzipien (Nourshargh and Marelli-Berg, 2005, Colditz et al., 2007, Khandoga et al., 2009). In vitro-Analysen vernachlässigen die funktionalen und morphologischen Veränderungen, die Leukozyten aufgrund von Wechselwirkungen, beispielsweise mit dem Endothel, durchlaufen (Khandoga et al., 2009). Ein klarer Vorteil eines in vivo-Versuchsmodells ist demnach, dass Zellen in ihrer komplexen natürlichen Umgebung unter Einfluss von Faktoren beobachtet werden können, wie sie im lebenden Organismus herrschen.

Die Zweiphotonenmikroskopie ermöglicht eine dynamische Analyse bei hervorragender Auflösung und Penetrationstiefe. In vitro bleiben solche Umgebungseinflüsse und systemischen Einwirkungen, die das Verhalten der Zellen modifizieren können, wie zum Beispiel der Einfluss durch Scherkräfte, weitgehend unberücksichtigt. Molekulare Mechanismen werden unter Vernachlässigung organspezifischer Aspekte untersucht. (Cahalan et al., 2002, Marquardt and Siegfried, 1994)

Da jedoch eine Abwehr- oder Entzündungsreaktion aus dem Zusammenwirken verschiedener komplexer und dynamischer Faktoren, wie etwa der Interaktion verschiedener Zellen oder gelöster Stoffe im fließenden Blut entsteht und durch viele Umgebungsfaktoren beeinflusst wird (Cahalan et al., 2002), wurden unsere Untersuchungen in vivo durchgeführt. Diese Methode machte die Analyse des Crawlings im natürlichen Mikromilieu unter physiologischen Bedingungen möglich.

Zur Beantwortung der Fragestellungen, unter welchen Bedingungen Neutrophile Granulozyten, T-Lymphozyten und Monozyten crawlen, war die intravitalmikroskopische Analyse ihres Verhaltens in unseren Augen am besten geeignet.

Die IVM-Fluoreszenzmikroskopie stellt eine etablierte Methode dar, um die Mikrozirkulation direkt zu untersuchen. Andere denkbare Methoden zur Untersuchung der leukozytären Migration wären zum Beispiel das Myeloperoxidase-Assay (MP-Assay), das Peritonitismodell und immunhistochemische Verfahren.

5 DISKUSSION

(Immun)Histochemische Färbungen werden auch verwendet, um Gewebsschnitte mittels verschiedener Mikroskopiearten zu untersuchen und erlauben hierbei die räumliche Verteilung zellulärer Antigene zu analysieren (Coons et al., 1941, Moon et al., 2010). Oberflächenstrukturen und spezifische Zellfunktionen können sichtbar gemacht werden und damit in Zusammenhang mit der Crawlingfähigkeit verschiedener Zellen gebracht werden. Hierbei ist es mit relativ geringem Aufwand möglich auch Leukozytensubpopulationen zu klassifizieren. Möchte man jedoch einen dynamischen Prozess wie das Crawling oder andere Transmigrationsschritte untersuchen, reicht die hierdurch erreichbare punktuelle Erfassung der Leukozyten nicht aus.

Beim Peritonitismodell wird durch Applikation inflammatorische Mediatoren künstlich eine Entzündung des Peritoneums induziert. Indem der Bereich anschließend gespült und der Inhalt mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) untersucht wird, sind Aussagen über das Ausmaß der Migration von Entzündungszellen möglich (Laurila et al., 2009, Henderson et al., 2003). Für die Untersuchung des Crawlings ist auch diese Methode ungeeignet, da sie keine selektive Betrachtung eines Schritts ermöglicht.

Beim Myeloperoxidase-Assay (MPO-Assay) werden rekrutierte und transmigrierte Leukozyten nachgewiesen, indem das Enzym an Gewebepreparaten quantifiziert wird. MPO ist ein in Neutrophile Granulozyten hochexprimiertes lysosomales Protein, das den Grad neutrophiler Aktivierung widerspiegeln soll. (Kupczyk et al, 2002, Bozeman et al., 1990, Pulli et al., 2013, Graff et al., 1998).

Für unsere Fragestellung war diese Methode nicht geeignet, da auch hierbei nur das Ausmaß der Entzündungsreaktion in Form der transmigrierten Neutrophilen Granulozyten bestimmt wird, nicht jedoch ein Einzelschritt der Kaskade - hier das Crawling - analysiert werden kann. Ein weiterer Nachteil ist, dass artifizielle Leukozytenanhäufungen in den Gewebeproben die Enzymaktivität und damit das Ergebnis verändern und diese Untersuchung weitgehend spezifisch für Neutrophile Granulozyten ist.

Bei der von uns gewählten Methode, der Intravitalmikroskopie, werden zwei Prinzipien unterschieden, Transillumination und Epiillumination (Krukemeyer, 2005). Bei der Epiillumination wird das Licht durch die Probe reflektiert, bei der Transillumination wird es durch die Probe geleitet, um einen Kontrast zu erzeugen, der Detektor befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite (Syngene, 2010, Webb and Brown, 2013). (s. Abb. 39)

Im Allgemeinen befindet sich die Lichtquelle bei der Transillumination näher an der zu untersuchenden Probe. Dies hat den Vorteil einer höheren Energieübertragung und damit

5 DISKUSSION

eines größeren Kontrasts. Der Vorteil der Epiillumination liegt in der Betrachtung nicht transilluminierbarer Strukturen. (Syngene, 2010, Krukemeyer, 2005)

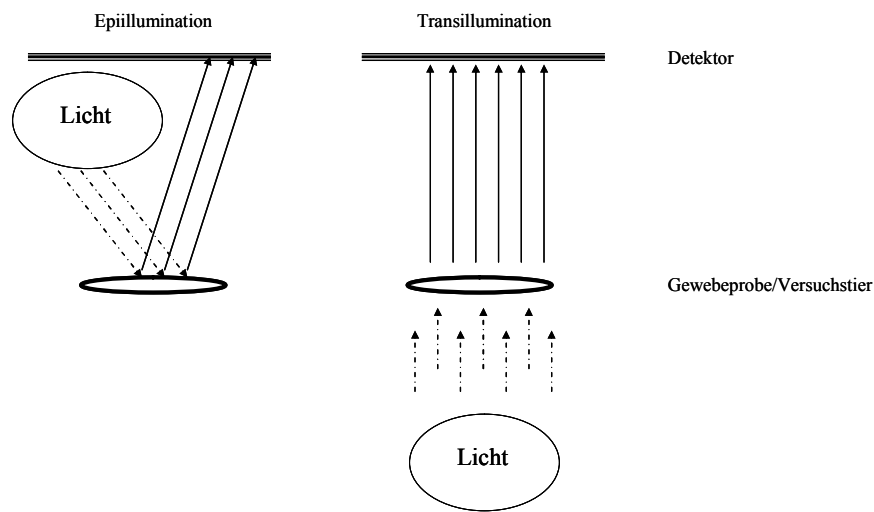


Abbildung 39: Mikroskopische Prinzipien, Epiillumination/Transillumination (modifiziert nach Syngene, 2010, Webb and Brown, 2013)

Als mögliche mikroskopische Methoden kommen Lichtmikroskopie, klassische Fluoreszenzmikroskopie, RLOT (*Reflected light oblique transillumination*), Konfokalmikroskopie und Multiphotonenmikroskopie in Frage.

Konventionelle Lichtmikroskopie birgt unter anderem die Problematik der Überlagerung von Ebenen. Das heißt, Strukturen im Mittelpunkt und Strukturen außerhalb dieses Fokus und damit scharfe und unscharfe Bildpunkte liegen übereinander.

Intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist eine Form der Lichtmikroskopie und bedeutet, dass lebende Strukturen durch eine externe Strahlungsquelle dazu gebracht werden, für die Dauer der Bestrahlung zu leuchten. Sie ermöglicht eine unmittelbare Betrachtung der Mikrozirkulation im lebenden Organismus. Hierbei ist eine zeitgleiche, empfindliche, spezifische Darstellung und Analyse von Zellen - in unserem Fall Leukozyten - und Blutfluss möglich. Das Prinzip beruht darauf, dass längerwelliges Licht ausgesendet wird als eingestrahlt wurde (Stokes), durch das Mikroskop wird die Fluoreszenz (zum Beispiel durch ein Fluorchrom wie Acridin Orange) des Substrats detektierbar, Ein Strahlteiler trennt das Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht. Probleme bei dieser Methode bereitet die Eigenfluoreszenz mancher Strukturen. (Spektrum Akademischer Verlag, 2000, Yuste, 2005, Lichtman and Conchello, 2005)

Ein Hauptproblem der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie ist, dass eine scharfe Fokussierung nur bis in eine Tiefe von unter 100µm von der Gewebsoberfläche möglich ist,

5 DISKUSSION

und die Tatsache, dass über die Dauer der Anwendung das Licht den instabilen Fluoreszenzfarbstoff ausbleicht und Lichtschäden im Gewebe entstehen. Darüber hinaus streuen die meisten Gewebe das Licht, so dass Kontrast und Auflösung mit der Scharfstellung auf tiefere Gewebeschichten abnehmen. (Cahalan et al., 2002, Helmchen and Denk, 2005)

Für unsere Studie beziehungsweise für Langzeitanalysen des Crawlings im *Steady-State* ist dies kritisch, da über die Photobleichung mit einer Aktivierung von fokussierten Zellen zu rechnen ist.

Das Prinzip der RLOT-Mikroskopie ist die Erzeugung eines Phasengradienten, der Lichtstrahl läuft zweimal durch die Probe. Durch optische Interferenzphänomene wird eine verstärkte Kontrastierung erreicht, indem feinste Gradienten von Brechungsindizes in Geweben sichtbar gemacht werden. Morphologische Strukturen werden durch Phasenunterschiede gebrochenen und ungebrochenen Lichts abgebildet. (Dirksen et al., 1978, MacVicar, 1984, Mempel et al., 2003).

Ein Schema zur RLOT-Mikroskopie zeigt Abbildung 40.

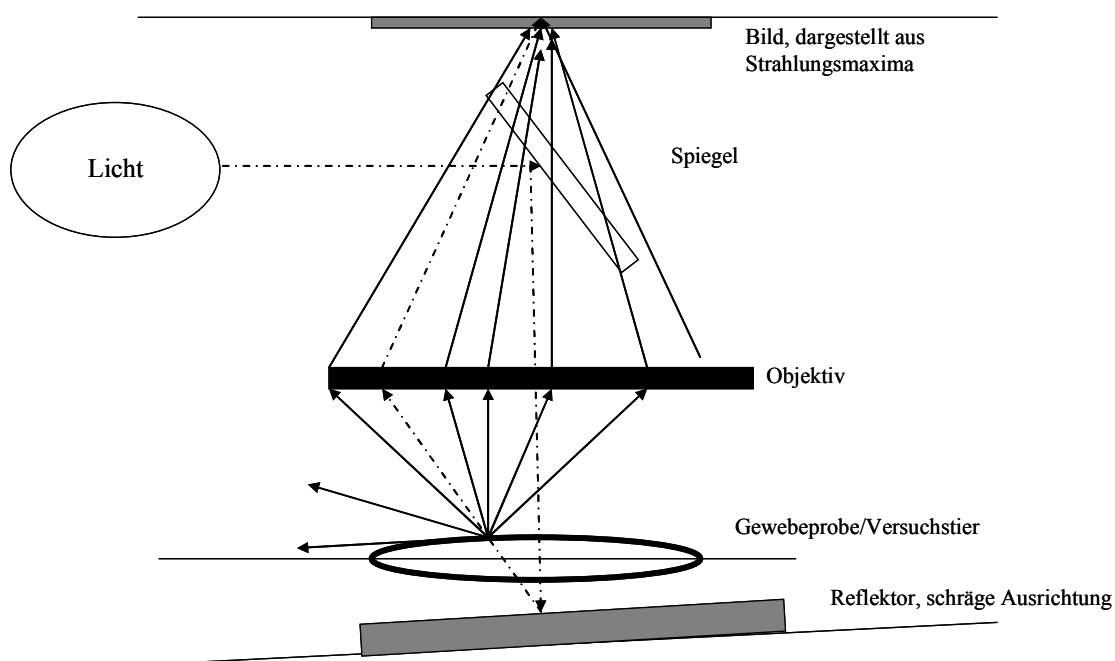


Abbildung 40: Schema RLOT-Mikroskopie. Eine Lichtquelle entsendet Licht der Wellenlänge 700nm. Dieses Licht trifft zuerst auf einen Teilerspiegel, dann auf einen in schräger Ebene stehenden Reflektor, bevor es durch die Probe gebeugt wird. Die Strahlengänge, die durch das Objektiv laufen, ergeben das Bild (modifiziert nach Mempel et al., 2003, Dirksen et al., 1978, MacVicar, 1984)

Die erforderliche Wellenlänge für eine optimale Auflösung und Penetration beträgt 700 nm (MacVicar, 1984). Vorteile der RLOT-Mikroskopie sind bei transilluminierbaren Geweben die höhere Bildqualität und die relativ längere Beobachtungszeit bei reduzierter

5 DISKUSSION

Lichtschädigung im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie. (Rehberg et al., 2011, Mempel et al., 2003, Dirksen et al., 1978, MacVicar, 1984).

Ein gut etabliertes Modell im Rahmen der RLOT ist die Präparation des Musculus Cremaster. Gegen die Anwendung der RLOT im Rahmen unserer Fragestellung sprach, dass durch sie allein keine Unterscheidung der leukozytären Subpopulationen möglich ist. Hierfür wäre eine nachfolgende histologische Betrachtung nötig. Dazu kommt, dass Crawling ein verhältnismäßig langsamer Prozess ist und eine bessere Kontrastierung von Endothel- und Entzündungszellen durch Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen zu erreichen ist.

Bei der Konfokalmikroskopie wird die Probe sukzessive durch den Lichtstrahl abgetastet. Die Beleuchtung des Präparats wandert durch eine punktförmige Beleuchtungsquelle, das Licht wird durch unterschiedliche Ebenen des Präparats gebündelt. Gemessen werden ausgesandtes Licht und Fluoreszenz. Die unscharf abgebildeten Randbezirke werden im Unterschied zur konventionellen Lichtmikroskopie durch den Einsatz der Detektionslochblende ausgeschlossen. Ein dreidimensionales Bild entsteht aus dem relativ kleinen Bildbereich, der scharf abgebildet wird. (Egelman, 2012, Muller, 2006, Pawley, 2006, Spektrum Akademischer Verlag, 2000, Fries Research & Technology, 2014, Price and Jerome, 2011)

Ein Vorteil der Konfokalmikroskopie ist die hohe numerische Apertur und der damit verbundene Strahleneinfallswinkel. Hierdurch ist es möglich auch Strukturen, die hinter dichten Elementen liegen, darzustellen, die große Empfindlichkeit ermöglicht eine gute Bildqualität (Egelman, 2012, Muller, 2006, Pawley, 2006, Spektrum Akademischer Verlag, 2000, Fries Research & Technology, 2014, Price and Jerome, 2011).

In unseren Versuchen entschieden wir uns gegen diese Art der Mikroskopie, da sie der Multiphotonenmikroskopie in Bezug auf die Eindringtiefe unterlegen ist und die aufgrund längerer Beobachtungsdauer bei niedriger Intensität bedingte Phototoxizität zu verfälschten Ergebnissen führen kann und ein *Steady-State* so nicht möglich wäre.

Ein Schema zur Konfokalmikroskopie zeigt Abbildung 41.

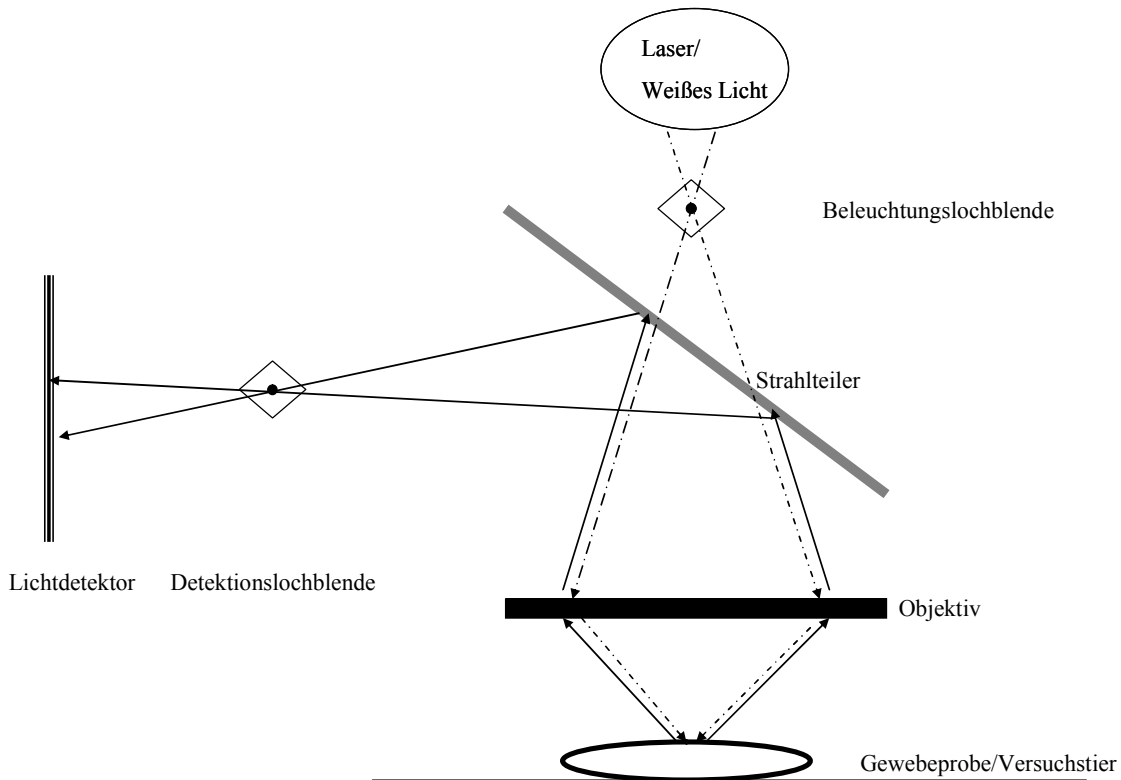


Abbildung 41: Schema Konfokalmikroskopie. Ein nach der Anregungslochblende punktförmiger Lichtstrahl trifft Objektiv und Präparat, das reflektierte Licht nach dem Objektiv den Strahlteiler, der einen Teil des Lichts spiegelt, und läuft dann durch eine Lochblende auf den Lichtdetektor. Das eingestrahelte Licht hat eine kleinere Wellenlänge als das ausgestrahlte. Der Detektionfokus ist konfokal zum Objektivfokus (Modifiziert nach Egelman, 2012, Muller, 2006, Pawley, 2006, Spektrum der Wissenschaft Verlag, 2000, Fries Research & Technology, 2014, Price and Jerome, 2011)

Im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie war es durch die Anwendung der Zweiphotonenmikroskopie möglich, auch längere Aufnahmen, wie sie für das intravaskuläre Crawling nötig sind, bei geringerer phototoxischer Schädigung anzufertigen.

Wichtige Charakteristika der Zweiphotonenmikroskopie sind die Multiphotonenfluoreszenz und die *Higher Harmonic Generation* (s. Abb. 11). Bei der Multiphotonenfluoreszenz wird ein Elektron durch mehrere Photonen simultan angeregt. Die *Higher Harmonic Generation* impliziert eine Frequenzvervielfachung. Entsprechend stellt die *Second Harmonic Generation* eine Verdopplung der Frequenz dar. Die SHG tritt ausschließlich im Laserfokus, nicht jedoch peripher davon auf. Die entstehenden optischen Schwingungsfrequenzen liegen über denen des Lasers selbst. Die Wellenlänge der SHG entspricht 50% des eingestrahelten Lichts. (Cox, 2007)

Diese Mikroskopieart erzeugt zwar auch Schnittbilder, aber durch die energieärmere fokussierte Anregung, die damit minimale Streustrahlung und die sehr kurzen aber intensiven Lichtimpulse, die bei der Multiphotonenmikroskopie verwendet werden, ist es möglich,

5 DISKUSSION

lebende Gewebe im *Steady-State* direkt in einer größeren Tiefe und bei einer im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie reduzierten Ausbleichung und Phototoxizität zu beobachten (Cahalan et al., 2002, Helmchen and Denk, 2005).

Durch die größere Eindringtiefe von bis zu mehreren hundert Mikrometern ist die Multiphotonenmikroskopie auch für Proben größerer Dicke geeignet. Eine Vielzahl an Farbstoffen, unter anderem UV-Farbstoffe können angeregt werden. Darüber hinaus entsteht ein weitaus geringeres Maß an Autofluoreszenz, und eine sehr hohe dreidimensionale Auflösung ist möglich. (Universität Wien, 2014, Drobizhev et al., 2011, Kawakami et al., 2013)

Die im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie deutlich höhere Tiefenauflösung bei vergleichbarer Auflösung in der x- und y- Ebene ist bedingt durch die quadratische Abhängigkeit der Signalstärke von der Pulsleistung (Gericke, 2014, Mulisch and Welsch. 2010).

Durch einen punktgenau konzentrierbaren Laserstrahl mit hoher Energiedichte ist es möglich, die Anregung und damit die sichtbare Fluoreszenz im Zentrum der Aufnahme zu konzentrieren. Ober- und unterhalb des fokussierten Areals fällt die Photonendichte rapide ab. (Cahalan et al., 2002)

Über diese Vorteile der Multiphotonenmikroskopie können auch tieferliegende Gewebe wie lymphatische Organe, Nieren, Herz, Haut und Gehirn im Detail untersucht werden, ohne das Gewebe zu beschädigen (Helmchen and Denk, 2005).

Nachteile der Multiphotonenmikroskopie sind die hohen Anschaffungskosten, im speziellen des Lasers und die noch undefinierten Eigenschaften für die Anregung diverser Farbstoffe (Universität Wien, 2014).

Tiere

Für alle Versuche dieser Studie verwendeten wir Mäuse. Ein entscheidender Vorteil, die intravitalmikroskopischen Aufnahmen an ihnen durchzuführen, ist, dass eine langjährige Erfahrung aus Versuchen besteht und diese Tierart immunologisch gut verstanden ist.

Durch die verhältnismäßig kurze Zeit, die für die kostengünstige Züchtung nötig ist, hatten wir die Möglichkeit, quantitativ wie qualitativ aussagekräftige Versuchsreihen mit hohen Gruppenzahlen durchzuführen. Hierdurch konnte der Einfluss von Zufallserscheinungen und Fehlern minimiert werden.

5 DISKUSSION

Ein weiterer Grund für die Wahl der Maus war die Verfügbarkeit von transgenen Versuchstieren (GFP, RFP) und *knockout*-Varianten sowie der entsprechenden Antikörper, deren Wirkungen auf das Crawling Inhalt unserer Fragestellungen war.

Ein grundsätzliches Problem bei der Durchführung von Tierversuchen zur Erforschung physiologischer wie pathologischer Mechanismen ist, dass die Ergebnisse nicht pauschal auf den Menschen übertragen werden können. Die zwischen Mensch und Tier bestehenden Unterschiede in Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie und Stoffwechsel machen einen direkten Transfer der Ergebnisse unmöglich. Die Kombination mit klinischen Studien relativiert diese Problematik.

Wichtig war, dass wir nach den Ergebnissen mit konventionellen Färbungen aus unseren Vorversuchen die Option hatten, einen alternativen Versuchsaufbau mit genetisch veränderten Tierstämmen zu verwenden. So war es möglich, die Phototoxizität, wie wir sie im Vorfeld bei Anwendung konventioneller Fluoreszenzfarbstoffe beobachtet hatten, zu reduzieren.

Phänotyp, Gesundheitszustand und Fertilität aller verwendeten Tierstämme waren mit Kontrollen aus C57BL/6-Wildtypen vergleichbar.

Die Kollektivgrößen der einzelnen Versuchsgruppen wurden nach statistischer Begutachtung so berechnet, dass aussagekräftige allgemeingültige Angaben gemacht werden konnten.

Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden an Tieren folgender Stämme durchgeführt.

CX3CR1 eGFP/+ Tiere wurden zur Analyse des Crawlings von Monozyten verwendet.

Monozyten aus homozygoten CX3CR1 eGFP-*knockin* Mäusen crawlen quantitativ und qualitativ in veränderter Form, da kein regulärer Fraktalkine-Rezeptor mehr vorhanden ist. Dieser ist an Adhäsion und Crawling von Monozyten unter *Steady-State*-Bedingungen beteiligt. (Hickey and Kubes, 2009, Auffray et al., 2007, Auffray et al., 2009a, Geissmann et al., 2003)

Dieser Zusammenhang der monozytären Transmigration im allgemeinen und des Crawlings im speziellen mit Fraktalkine verbot die Verwendung homozygoter Tiere (CX3CR1 eGFP). Wir verwendeten für unsere Versuche heterozygote Mäuse (CX3CR1 eGFP/+), weil Fraktalkine bei diesen erhalten bleibt und die Monozyten dieser Tiere in ihrer ursprünglichen Form crawlen.

Eine alternative Färbung von Monozyten wäre mittels Fluoreszenzfarbstoffen oder Antikörpern möglich (Carlin et al., 2013), jedoch wären auch hierbei artefizielle Veränderungen des Crawlings nicht auszuschließen. Eine Anfärbung mittels gegen F4/80-gerichteten Antikörpern wäre eine solche Option. Dies wird unter anderem von Monozyten

5 DISKUSSION

exprimiert, jedoch in geringerem Maße als von Gewebsmakrophagen (Austyn and Gordon, 1981). Darüber könnte eine solche Markierung von Monozyten nicht ausreichend stabil sein. Wie beschrieben, existieren zwei monozytäre Subpopulationen, niedrig- und hoch-gfp-exprimierende. Beide konnten durch die intravitalmikroskopische Bildgebung visualisiert werden. Unsere Analysen beziehen sich jedoch auf die residenten hoch-GFP-Monozyten, weil diese die Hauptfraktion crawlender Monozyten allgemein, im *Steady-State* speziell, stellen, und im Anschluss schnell ins Gewebe migrieren, wohingegen niedrig-GFP-Zellen vorwiegend rollen (Auffray et al., 2007). Die Identifizierung von GFP-*low* und GFP-*high* Monozyten war optisch sehr gut möglich.

Für die Darstellung des Crawlings von Neutrophilen Granulozyten wurden in unseren Experimenten LysM eGFP/eGFP Tiere verwendet. Myelomonozytäre Zellen sind in diesem Mausstamm markiert, endogene Neutrophile Granulozyten leuchten stärker, wohingegen Monozyten und Makrophagen in einem geringeren Maß angefärbt sind (Kreisel et al., 2010, Faust et al., 2000, Chtanova et al., 2008, von Bruehl et al. 2012).

Eine Alternative hierzu wäre eine fluoreszierende oder radioaktive Markierung der Neutrophilen Granulozyten, die aber die physiologische Funktion beeinflussen könnten. Eine weitere Möglichkeit stellt die ex vivo-Färbung der Neutrophilen Granulozyten dar. Allerdings bestünde hier das Risiko eines veränderten Bewegungsverhaltens (Kreisel et al., 2010). Die Bedingung für diese Technik oberflächliche Gefäße zu verwenden, wäre beim Ohrmodell gegeben.

Der Vorteil des verwendeten GFP-Stamms liegt klar darin, dass wir endogene Neutrophile Granulozyten ohne artifizielle Veränderungen in ihrer natürlichen Bewegung vorliegen hatten und Fluoreszenzschäden umgingen. Ein Nachteil dieses Modells ist, dass die Proportion von GFP-positiven Zellen im peripheren Blut einer großen interindividuellen Variabilität unterliegt (Faust et al., 2000). Darüber sind in diesen Tieren auch kleine Mengen an Erythrozyten und B-Zellen GFP-positiv, was an unspezifischer Bindung oder Aggregation liegen könnte (Faust et al., 2000). LysM ist wie erwähnt auch in monozytären Subgruppen aktiv (von Bruehl et al., 2012). Da es sich hierbei aber nur um eine geringe Anfärbung eines Teils der Monozyten handelt und die Anzahl an Monozyten an den zirkulierenden Leukozyten verhältnismäßig gering ist (5%) (Sumagin et al., 2010, Voisin et al., 2009), sollte dies bei den vorliegenden Fallzahlen keine Verfälschung der Ergebnisse bedingen.

5 DISKUSSION

T-red-high Mäuse haben rote T-Lymphozyten. Eine Variante eines rotfluoreszierenden Proteins (*Ds-RedIII*) wird einheitlich und selektiv in T-Zellen exprimiert und kennzeichnet diese fluoreszierend (Mempel et al., 2006). Dies bringt den Vorteil, dass keine zusätzliche Färbung nötig ist, birgt allerdings die Gefahr von Veränderungen der beobachteten Mechanismen durch den genetischen Eingriff, beziehungsweise unterschiedliche Expressionsmuster zwischen den Untergruppen von T-Zellen.

Versuchsanordnung

Für die vorliegende mikrozirkulatorische Fragestellung, welche Zellen vermittelt durch welche Mechanismen in welchen Gefäßen crawlen, kamen unterschiedliche Versuchsaufbauten in Frage, so zum Beispiel die Modelle von M. Cremaster, Mesenterium und Ohr.

Vorteile sind die gute chirurgische Zugänglichkeit, die Applikationsmöglichkeiten von Substanzen, lokal, systemisch oder per Superperfusion und das Vorhandensein der verschiedenen Teile der Mikrozirkulation.

Das Musculus Cremaster-Modell ist eine gut etablierte Methode, die in der Vergangenheit in vielen Untersuchungen der Mikrozirkulation Anwendung fand. Viele Gefäße auf einer kleinen überschaubaren Fläche mit einer annähernd zweidimensionalen Gefäßarchitektur bieten nahezu ideale Bedingungen. Durch eine geringe Gewebedichte werden Überlagerungsartefakte minimiert. (Hickey and Kubes, 2009, Dangerfield et al., 2002, Ozer et al., 2002, Bastiaanse et al., 2006, Lister et al. 2007, Yazici and Siemionow, 2006).

Ein zu bedenkender Nachteil ist die Abhängigkeit der Präparationsqualität von dem Geschick und den Fähigkeiten des Operateurs. So kann eine unterschiedlich starke Gewebetraumatisierung zu nicht validen und reliablen Ergebnissen führen. Auch bei geübter sorgfältiger Präparation ist bei dieser Methode nie eine gänzlich atraumatische Situation zu schaffen. Durch Gewebsschädigungen verändert sich aber die Leukozytenaktivität, eine *Steady-State*-Situation ist nicht möglich. Somit wird dieses Modell als sogenanntes „Trauma Model“ verwendet (Frommhold et al., 2010, Sperandio et al., 2001, Frommhold et al., 2011).

Auch die Untersuchung des Mesenteriums ist ein gut erprobtes Verfahren zur Prüfung der Mikrostrombahn, da dieses Gewebe ebenso transilluminierbar ist (Ding et al., 2013, Kozlov and Banin, 1975, Schneider et al., 2012, Zweifach, 1973, Boros et al., 1998, Gonzalez et al., 1994, Massberg et al., 1998a, Massberg et al., 1998c). Vorteile dieses Modells sind die relativ geringen Artefakte durch Traumatisierung aufgrund der guten Zugänglichkeit und der damit

5 DISKUSSION

verbundenen wenig aufwändigen Präparation, jedoch ist auch hier kaum ein vollständiger *Steady-State* möglich, Bewegungsartefakte erschweren die Analyse.

Weitere Orte zur Untersuchung mikrozirkulatorischer Vorgänge sind Gehirn (Kawamura et al., 1990), Leber (Vollmar et al., 1994), Bauchspeicheldrüse (Hoffmann et al., 1995), quergestreifte Skelettmuskulatur (Menger et al., 1988) und Lunge (Kuebler et al., 1994).

Ein Nachteil dieser Modelle ist die, bedingt durch die Lage, aufwändigere Präparation. Für unsere Versuche war es jedoch wichtig, mit dem Ziel eines *Steady-State* möglichst atraumatisch zu arbeiten.

Ein klarer Vorteil des verwendeten Ohrmodells, des M. Cremaster und des Mesenteriums liegt in der zweidimensionalen Gefäßarchitektur, die es erlaubt, alle bekannten Stufen der Migrationskaskade zu analysieren. Ein weiterer Grund das Ohr zu wählen, war die hierfür nötige minimale chirurgische Präparation. Im Vergleich zum Modell des M. Cremaster konnten so entzündliche Reaktionen und Artefakte als Reaktion auf die chirurgische Manipulation vermieden werden. Hierdurch war die definitive Festlegung eines entzündungsfreien *Steady-State*-Status erst möglich. Der dritte Grund für die Wahl des Ohrmodells als für uns idealen Versuchsaufbau war, dass hier nach Fixierung des Präparats kaum Bewegungsartefakte auftreten, die stabile Aufnahmen des Crawlings erschweren und eine Vergleichbarkeit der Versuche unmöglich machen würden. Dies war eine essentielle Voraussetzung für die spätere genaue Analyse der Bewegung im Rahmen des *Single-Cell-Trackings*.

Die Auslösung einer Entzündung via intraarteriell appliziertes KC erwies sich als sinnvoll. Es ist bekannt, dass KC/CXCL1 mit einer Einwanderung von Leukozyten assoziiert ist (Carollo et al., 2001).

Chemokine sind hochspezifisch, induzieren Chemotaxis, können Zellen aktivieren und koordinieren so die Entzündung. CXCL agieren vor allem auf Neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten, CXC sind *Chemoattractants* unter anderem für Monozyten. (Baglioni 1998, Zlotnik and Yoshie, 2000)

Um zu testen, ob KC in der Lage ist über GPCRs Crawling zu induzieren, wurden die obengenannten Versuche mit Pertussistoxin durchgeführt. (s. Abb. 25)

PTX wirkt antagonistisch zu CXCR2 (Huo et al., 2001) In unseren Vorversuchen reduzierte/verhinderte PTX Crawling. Da das Toxin Einfluss auf die Wirkung von KC hat, ist wiederum ein Zusammenhang zwischen KC und Crawling wahrscheinlich.

5 DISKUSSION

Wir entschieden uns die Entzündung in unseren Versuchen mit KC zu schaffen, weil es schnell, gut steuerbar und vorhersagbar zu einer Rekrutierung und nachfolgend einer Transmigration von Entzündungszellen im allgemeinen, PMNs und Monozyten im speziellen führte.

Die Wirkung blockierender Antikörper wurde von uns an CX3CR1 eGFP/+ im *Steady-State* und an LysM eGFP/eGFP Tieren nach Entzündungsinduktion untersucht. Hierfür entschieden wir uns nach den Ergebnissen aus den Vorversuchen. Dabei hatte sich, wie oben beschrieben, gezeigt, dass sich das Crawling von Monozyten in *Steady-State* und einer Entzündung in keinem der Parameter maßgeblich unterscheidet. In der Gruppe der Neutrophilen Granulozyten jedoch schien aufgrund der quantitativen wie qualitativen Unterlegenheit im Crawling während des *Steady-State* eine Analyse nach einem Entzündungsreiz sinnvoll.

Unsere Vorversuche hatten gezeigt, dass die Verwendung konventioneller Fluoreszenzfärbungen wie zum Beispiel Rhodamin 6G und Acridin Orange, die Stärke der Laserkraft und die Färbung mittels Anti-Gr-1-Antikörpern kritisch zu hinterfragen sind, wenn eine *Steady-State*-Situation geschaffen werden soll. Geschwindigkeit und Dauer von Crawling waren in unseren Versuchen stark abhängig von der Art der Färbung. Die Laserstärke hatte einen größeren Einfluss auf crawlende Neutrophile Granulozyten als auf Monozyten.

Wie beschrieben, konnte eine Minimierung phototoxischer Effekte maßgeblich durch die Anwendung des Zweiphotonenmikroskops erreicht werden. In Vorversuchen verwendeten wir Rhodamin 6G und Acridin Orange für die Bildgebung von Leukozyten unter physiologischen Bedingungen in aus der Literatur bekannten Konzentrationen (AO 0,05ml 0,05% i.a., entsprechend 1µmol/kg Körpergewicht, Rh6G 0,1ml 0,05% i.a. entsprechend 15mg/kg Körpergewicht).

Hier zeigte sich jedoch eine Potenzierung des phototoxischen Effektes des Lasers und somit eine schnelle (innerhalb von etwa fünf bis zehn Minuten) inflammatorische Reaktion mit vermehrter Adhäsion von Leukozyten. Deshalb verglichen wir im Anschluss phototoxische Effekte von Rhodamin6G und Acridin Orange auf die leukozytäre Adhäsion, indem wir diese Ergebnisse Versuchgruppen GFP-markierter Stämme gegenüberstellten. Die Einstellungen der Zweiphotonenintravitalmikroskopie sowie Laserstärke und Exzitationswellenlänge waren in beiden Gruppen identisch.

Bei einer in weiteren Versuchen durchgeführten Reduzierung der Laserstärke (von 5-10% auf 2-5%) und der Konzentration von Rh6G (von 20µg auf 2µg) war die Anzahl crawlender Leukozyten nur etwa halb so groß.

5 DISKUSSION

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass die Anzahl adhärenter und crawlender Leukozyten mit der eingestellten Laserstärke und der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs zunimmt. Phototoxische Effekte führen folglich zu einem veränderten Crawling von Leukozyten.

Auch in der Literatur existieren Hinweise auf einen fluoreszenzbedingten Einfluss von Rhodamin 6G bei längerer Aufnahmedauer auf Leukozyten und Endothel (Saetzler et al., 1997, Yuan and Fleming, 1990, Massberg et al., 1998b, Lehmann et al., 2001).

Wenn das Ziel wie in unserem Fall die Schaffung eines möglichst unveränderten unstimulierten Zustandes ist, in dem Zellen während ihres physiologischen Verhaltens beobachtet werden sollen, müssen störende Einflüsse beziehungsweise artifizielle Veränderungen vermieden werden. Deshalb war es sinnvoll Versuchprotokolle zu erstellen, die a) ohne konventionelle Fluoreszenzfarbstoffe auskommen (GFP-Tierstämme), b) die Aufnahmedauer und Laserstärke begrenzen (maximal 90Minuten, LP 2,5-5%) und c) eine möglichst atraumatische Präparation (Ohrmodell) vorsehen. Nur so kann ein tatsächlicher *Steady-State* erreicht werden.

Unsere Vorversuche zeigten weiter einen hemmenden Effekt fluoreszierender Anti-Gr-1/Ly6G-Antikörper auf neutrophiles Crawling. Durch Reduktion der Konzentration des Antikörpers (von 10µg auf 2µg) stieg die Anzahl crawlender PMNs moderat an (von durchschnittlich 2 auf über $3/10^4 \mu\text{m}^2$). Wir vermuten, dass bereits geringe Dosen des Gr-1-Antikörpers neutrophile Funktionen hemmen können, weswegen wir in unseren Hauptversuchsgruppen von dieser Färbung absahen.

Im Widerspruch hierzu stehen die 2013 von Yipp und Kubes veröffentlichten Daten. Beim Vergleich von LysM eGFP/eGFP Tieren mit und ohne Ly6G-Antikörper zeigten sich nach Emigration keine Unterschiede in Bezug auf Geschwindigkeit und Ortsänderung. Konstatiert wurde, dass Anti-Gr-1/Ly6G-Antikörper in niedrigen Dosierungen (1-40µg) nicht in die Rekrutierung und das Verhalten von Neutrophilen eingreifen (Yipp and Kubes, 2013).

Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass hier die Antikörper im Rahmen eines *Staphylococcus aureus*-Modells mit exzessiver inflammatorischer Reaktion und einem massiven Anstieg der Migration von PMNs intradermal appliziert wurden, wobei die Unterschiede sehr schwer zu erkennen sind, wohingegen wir sie in einer *Steady-State*-Situation systemisch über einen in der A. femoralis liegenden Katheter injizierten.

In den bisherigen Studien wurden zur Analyse der Rolle der Beta2- Integrine LFA-1 und Mac-1 *knockout*-Tiere verwendet oder die mikroskopischen Aufnahmen wurden erst im Anschluss an eine Vorbehandlung mit blockierenden Antikörpern gestartet. (s. Abb. 7)

5 DISKUSSION

Eine Möglichkeit für ein Nichtauftreten oder eine Verminderung von Crawling in diesen Versuchsprotokollen könnte durch Einflussnahme auf einen früheren Schritt zum Beispiel von Beta2-Integrinen und ICAM-1 auf die primäre Adhäsion bedingt sein. Wenn allerdings schon zu einem Zeitpunkt in die Migrationskaskade eingegriffen wird, der in der Abfolge der Migrationsschritte zeitlich vor dem Crawling liegt, kann nicht mehr davon ausgegangen werden, Crawling in seiner tatsächlichen Form vorzufinden.

Phillipson et al. (2006) arbeiteten unter anderem mit LFA-1- und Mac-1-defizienten Tieren. Hierbei lässt sich sehr gut die Rolle der beiden Beta2-Integrine für die Transmigration im allgemeinen betrachten, aber der unmittelbare Einfluss auf das Crawling ist schwer abzuschätzen.

Wenn wie in anderen Versuchsreihen (z.B. Phillipson et al., 2009) nach einer vorangegangenen Aufnahme im unbeeinflussten Zustand die entsprechenden Antikörper appliziert werden und erst nach einer Pause die Videoaufnahmen starten, kann ebenfalls nicht zuverlässig beurteilt werden, worin die direkte Wirkung des Antikörpers auf den crawlenden Leukozyten liegt. Der Beobachter kann nicht sicher sein, nach der Applikationspause die gleiche Zelle im Fokus zu haben wie im Vorfeld. Antikörperabhängig oder antikörperunabhängig könnte sich die primär beobachtete Zelle zwischenzeitlich abgelöst haben und im nachhinein eine andere Zelle im gleichen Bereich zu crawlen begonnen haben. Die Dauer der Crawlingbewegung der einzelnen Zelle ist zeitlich begrenzt. Monozyten crawlen durchschnittlich zwölf Minuten und Neutrophile Granulozyten durchschnittlich bis sechs Minuten (Ryschich et al., 2006, Auffray et al., 2007). So ist die Aussagekraft von Aufnahmen mit Pausen über 15 bis 20 Minuten nur bedingt. (s. Abb. 7)

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, ein neues Versuchsprotokoll zu kreieren und zu etablieren.

In unseren Experimenten wird ein Einfluss auf einen früheren Migrationsschritt als Ursache für ein modifiziertes Crawlingverhalten ausgeschlossen. Darüber hinaus ist die definitive Identifikation der zu analysierenden Zelle über eine pausenlose Aufnahme vor, während und nach der Antikörperapplikation und das anschließende *Tracking* jeder einzelnen crawlenden Zelle möglich.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Frühe Beschreibungen des Crawling-Phänomens finden sich in den Arbeiten von Schenkel et al. 2004. Mittels *Real-Time*-Mikroskopie auf HUVEC wurde Crawling für Monozyten in vitro beschrieben, damals noch unter der Bezeichnung Lokomotion. Die Autoren zeigten, dass sich Monozyten zytokinaktiviert effektiv zu nahegelegenen Zellverbindungen bewegten, bevor sie das Endothel überschritten und dass dieser Schritt abhängig von Wechselwirkungen zwischen CD11a/CD18 (LFA-1) und CD11b/CD18 (Mac-1) mit ICAM-1 und ICAM-2 war (Schenkel et al., 2004).

Etwa 60% aller Leukozyten in nicht lymphatischem Gewebe, die in Wechselwirkung mit der Gefäßwand treten - sei es in Form von Rollen, Adhärenz oder Crawling - sind Neutrophile Granulozyten, etwa 20% Monozyten und die restlichen 20% Lymphozyten (Sumagin et al., 2010).

Crawling wurde bisher für Monozyten, Neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten, teils in vitro, teils in vivo, vor allem jedoch im Rahmen von akuten Entzündungen beschrieben. Die Frage, welche leukozytären Subpopulationen im *Steady-State* crawlen und wie sie in ihrem Bewegungsverhalten untereinander differieren, ist nicht im Detail erforscht und mitunter Inhalt der vorliegenden Arbeit.

Anhand der bereits bekannten Fakten und auf unseren Vorversuchen beruhenden Überlegungen stellen wir die Hypothese auf, dass intravaskuläres Crawling von Leukozyten als Voraussetzung der TEM ein umfassender, möglicherweise kaskadenartig aufgebauter Prozess ist, dessen Regulation durch eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren auf Leukozyten- wie auf Endothelseite stattfindet.

Wir postulieren, dass im *Steady-State* regelmäßig monozytäres, jedoch kaum neutrophiles Crawling stattfindet, und dass unter diesen Bedingungen verschiedene Oberflächenmoleküle verschiedene Funktionen erfüllen.

Die Bewegungsrichtung der crawlenden Zelle zum Blutfluss, das Vorhandensein von Scherkräften und nicht zuletzt die leukozytäre Subpopulation haben Einfluss auf Qualität und Quantität des Crawlings.

Crawling als obligate Vorstufe der Diapedese

Aktuell bestehen noch Unklarheiten bezüglich der genauen biologischen Relevanz und der differenzierten Mechanismen leukozytären Crawlings. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass Zellen nicht primär an der für sie optimalen Emigrationsstelle anhalten und diese mittels Crawling, unabhängig von einwirkenden hämodynamischen Kräften, erst ausfindig machen

5 DISKUSSION

(Wong et al., 2010, Xu et al., 2013). Das Sich-Ausbreiten, das Absuchen mittels intraluminalen Crawlings von Zellen nach stattgehabter Adhärenz wird als essentiell für die transendotheliale Migration gesehen (Schenkel et al., 2004, Wojciechowski and Sarelius, 2005).

Dass transmigrierende Zellen offensichtlich spezielle Bereiche bevorzugen, um die Endothelbarriere zu überwinden, gibt Hinweise auf den physiologischen Einfluss einer mannigfaltigen Morphologie des Endothels wie auch seiner molekularen Zusammensetzung (Shaw et al. 2004, Burns et al., 2000, Burns et al., 1997, Allport et al., 2001, Luscinskas et al., 2002).

Unsere intravitalmikroskopischen Aufnahmen bestätigen Crawling als Voraussetzung der Transmigration. Wir konnten keine Zelle ausfindig machen, die transmigrierte ohne im Vorfeld gecrawlt zu sein, Leukozyten krabbelten von ihrem primären Anhaltort zur Stelle, an der sie über das Endothel transmigrierten. Aber nicht jede Zelle, die crawlte, transmigrierte automatisch anschließend.

Einige Studien zeigten, dass, wenn Crawling von Neutrophilen Granulozyten in vivo unterbunden wurde, weniger Zellen emigrierten, die Diapedese verzögert und vor allem transzellulär stattfand, jedoch nicht gänzlich verhindert wurde (Massena et al., 2010, Phillipson et al., 2006, Phillipson et al., 2009, Wong et al., 2010). Dies entspricht nicht vollständig unseren Beobachtungen. Ein Grund hierfür könnte das angewandte *Single-Cell-Tracking*-Versuchsprotokoll sein, bei dem wir ausschließen konnten einen anderen Schritt der Migrationskaskade zu blockieren.

Es wird vermutet, dass die Richtung des Crawlings sowohl durch mechanotaktische als auch durch haptotaktische Signale beeinflusst wird. Mechanotaktisch, weil crawlende Neutrophile Granulozyten in vivo auch senkrecht zur Blutflussrichtung crawlen, bis sie auf einen Knotenpunkt zwischen zwei Endothelzellen treffen (Phillipson et al., 2009, Massena et al., 2010). Bei der Mechanotaxie folgen die Leukozyten einem selbsttätigen Signal wie zum Beispiel der rheologischen Scherspannung (Li et al., 2002, Lo et al., 2000). Haptotaktisch, weil sich die Bewegungsrichtung änderte, sobald die crawlende Entzündungszelle dieser interendothelialen Verbindung folgte (Phillipson et al., 2009, Massena et al., 2010). Bei der Haptotaxie folgt die Zelle einem zum Beispiel an Zelloberflächen gebundenen Signalmolekül (z.B. PECAM-1), im Gegensatz zur Chemotaxie, bei der sie ein Gefälle löslicher Chemokine leitet (Egger, 2005, McCarthy et al., 1983). Angehäuft auf dem lumenseitigen Endothel vermögen Chemokine die Konformation Neutrophiler Beta2-Integrine zu verändern und so

5 DISKUSSION

Adhäsion und Crawling zu beeinflussen (Phillipson and Kubes, 2011). Allein die endotheliale Anwesenheit von Chemokinen führt allerdings nicht zu Crawling und Transmigration, vielmehr bedarf es eines chemotaktischen Gradienten über der Gefäßwand, wobei die Chemokinzentration in Richtung Gewebe ansteigt (Phillipson et al., 2009, Massena et al., 2010, Granger and Kubes, 1994).

Es ist wahrscheinlicher, dass sich Chemokine in gebundener Form auf dem Endothel befinden und dort proadhäsiv wirken, als dass sich lösliche Chemokingradienten auf der lumenzugewandten Seite des Gefäßendothels befinden, da sie dort leicht durch den Blutfluss weggespült würden (Tanaka et al., 1993, Rot, 1992, Middleton et al., 2002). Ein so geschaffener Gradient auf der Endothelfläche bietet die Möglichkeit Entzündungszellen über die endotheliale Oberfläche hin an bestimmte bevorzugte Stellen zu locken und auf diese Weise promigratorisch zu wirken. Die Auslösung einer Entzündung durch das Chemokin KC in unseren Versuchen führte zu vermehrtem leukozytären Crawling.

Auch Massena et al. konnten 2010 zeigen, dass es bei einer ortsgebundenen extravaskulären Chemokinfreisetzung zu einer vermehrten leukozytären Rekrutierung aus den Gefäßen ins Gewebe kommt. Die crawlenden Neutrophilen Granulozyten wandern, gesteuert über das chemotaktische Gefälle, in Richtung einer Chemokinquelle. Zwischen den endothelialen Zell-Zell-Verbindungen angekommen, wird die Entzündungszelle dann durch chemotaktische Signale weitergeleitet. (Massena et al., 2010)

Möglicherweise exprimieren die Endothel-Zell-Verbindungen, die die Transmigration von Leukozyten fördern, auch höhere Spiegel an Adhäsionsmolekülen, die einen haptotaktischen Gradienten für crawlende Zellen schaffen (Coleman and Tsongalis, 2009).

Als mögliche Kandidaten sind hier VCAM-1, CD11c, JAM-A, -B, -C und VLA-4 denkbar. Es ist auch wahrscheinlich, dass das von Zellverbindungen unabhängige Crawling, wie wir es im *Steady-State* vermuten, während einer Entzündung in ein an die Zellverbindungen gebundenes Crawling übergeht, bevor es letztendlich im Verlauf der Migrationskaskade zur parazellulären Diapedese kommt.

Nach der Emigration aus den Gefäßen wandern die Zellen weiter im Gewebe entlang eines chemotaktischen Gradienten in Richtung der höheren Chemokinkonzentration (Cara et al., 2001, Kay et al., 2008, Massena et al., 2010, McDonald et al., 2010).

Eine Entzündungszelle muss, um zum Ort des Geschehens, sprich der Entzündung, zu gelangen, zwischen verschiedenen zeitlich parallelen chemotaktischen Signalen wie bakteriellen Peptiden und MIP-2 (*macrophage inflammatory protein-2*) unterscheiden (Heit et al., 2008, Massena et al., 2010, Billadeau, 2008).

5 DISKUSSION

Sowohl mechanotaktische, als auch chemotaktische/haptotaktische Zeichen helfen Leukozyten also, geeignete Verbindungsstellen im Endothelverlauf und in unmittelbarer Nähe zur Chemokinquelle zu erkennen, zu erreichen und letztendlich dort zu transmigrieren. Denkbar ist, dass abhängig davon, welche Signalgebung überwiegt, Crawling auf verschiedene Arten imponieren (beispielsweise differente Muster) oder auch unterschiedlich reguliert sein könnte. Exemplarisch sei hier die Konformationsänderung von Beta2-Integrinen unter Chemokineinwirkung auf Eosinophilen Granulozyten genannt (Weber et al., 1996). Diese Aspekte bei den unterschiedlichen Subpopulationen genauer zu analysieren, ist Inhalt eines möglichen Folgeprojektes.

Der dem Crawling nachgeschaltete Schritt der transendothelialen Migration wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht explizit untersucht.

Welche leukozytären Subpopulationen crawlen im *Steady-State* und wie unterscheidet sich das Bewegungsverhalten untereinander?

Einige Leukozyten crawlen nicht ausschließlich unter Entzündungsbedingungen, sondern können auch im *Steady-State* durch das Gefäßsystem patrouillieren (Hickey and Kubes, 2009, Auffray et al., 2007, Sumagin et al., 2010, Geissmann et al. 2003, Schenkel et al., 2004).

Es ist wichtig, nicht nur zwischen leukozytären Subpopulationen zu unterscheiden, sondern auch zwischen Crawling im Rahmen einer stimulierten Entzündung und dem im unstimulierten *Steady-State*.

Auf Grundlage der bisherigen Erkenntnisse war es am Beginn unseres Projektes wichtig zu prüfen, welche Zellpopulationen überhaupt die Fähigkeit haben zu crawlen und welche hiervon dies physiologischerweise auch ohne Stimulation tun.

Nur residente Monozyten scheinen die einzigartige Fähigkeit zu haben, auf diese Weise gesundes Gewebe zu erkunden, zu kontrollieren und auf mögliche Schädigungen hin abzusuchen (Sumagin et al., 2010, Auffray et al., 2007, Geissmann et al., 2003, Hickey and Kubes, 2009). Die Art und Weise wie sie patrouillieren, aber auch die Regulation dessen unterscheidet sich sowohl von monozytärem inflammatorischem Crawling, als auch von Crawling bei Neutrophilen Granulozyten (Sumagin et al., 2010).

Unsere Aufnahmen zeigen ebenfalls residente Monozyten, die im *Steady-State* ohne gegebenen Entzündungsreiz crawlen, meistens ohne im Anschluss zu transmigrieren, wohingegen PMNs dies entsprechend früherer Angaben nicht taten. Während des *Steady-State* krabbelten sie kaum und wenn dann mit einer deutlich erhöhten Geschwindigkeit, so

5 DISKUSSION

dass fraglich ist, ob Crawling hierbei die gleiche Rolle im Rahmen der Transmigration spielt wie bei Monozyten oder während einer Entzündung.

Sumagin, et al. veröffentlichten 2010 Daten, wonach ohne dass ein Entzündungsreiz gesetzt wurde, 13,6% der Neutrophilen Granulozyten fest adhären wurden, um im Anschluss zu crawlen. Hingegen zeigten 58,2% der Monozyten diese Adhärenz, wovon 48,0% danach crawlten. Wichtig bei der Interpretation dieser Ergebnisse und einem Vergleich mit unseren Daten ist, dass diese Versuche als Musculus Cremaster-Modell durchgeführt wurden. Dies schließt nicht aus, dass eventuell eine entzündlich-traumatische Reizung Einfluss auf die Resultate hatte.

Unsere Daten am Ohrmodell zeigen, dass im *Steady-State* kaum Neutrophile Granulozyten crawlten (Anzahl $0,8/10^4\mu\text{m}^2$) in über 70% der Gefäße fand überhaupt kein Crawling Neutrophiler Granulozyten statt. Die Zellen, die crawlten, taten dies schnell („*rolling-like*“) über eine kurze Strecke (*short*) und Dauer (meist unter einer Minute).

Hingegen erfolgt das überwachende Crawling residenter Monozyten im *Steady-State* über weitere Strecken, die Bewegung führt nicht auf direktem Wege zum Zielort und wird vornehmlich durch LFA-1 reguliert, wohingegen das effektivere, kürzere und direktere, fast geradlinige Crawling nach einem Entzündungsreiz Mac-1-abhängig ist und die wenigen in unstimulierten Gefäßen crawlenden Zellen eine größere Varianz an Bewegungsmustern zeigen (Sumagin et al., 2010).

Wenn eine Entzündungszelle in variablen indirekten Mustern um endotheliale Verbindungsstellen „herumcrawlt“, könnte sie einerseits die nähere Umgebung absuchen, aber auch gleich einen optimalen Ausgangspunkt für die TEM ausmachen.

In unseren Versuchen crawlten Monozyten weitschweifender (größtenteils zwischen fünf und zwölf Minuten) als Neutrophile Granulozyten.

Sumagin et al. zeigten 2010, dass sich die Crawlingmuster inflammatorischer Monozyten denen von Neutrophilen Granulozyten ähneln, nachdem mit TNF-alpha eine Entzündung induziert wurde. Auch in unseren Versuchen veränderten sich die Crawlingmuster, PMNs crawlten selten (in knapp 30% der beobachteten Gefäße) im *Steady-State*. Nach einem Entzündungsreiz durch KC crawlten sie insgesamt vermehrt und auch häufiger im Muster *hairpin*. Monozyten bewegten sich im *Steady-State* vorwiegend in dieser Form.

Die patrollierende Aktivität der residenten Monozyten scheint unter dem Aspekt sinnvoll, dass auch sie es sind, die vor allen anderen Abwehrzellen zur Stelle sind, wenn tatsächlich eine Schädigung des Gewebes eingetreten ist (Auffray et al., 2009b, Auffray et al. 2007). Über eine zeitige Ausschüttung von Entzündungsmediatoren aktivieren sie weitere

5 DISKUSSION

Effektorzellen des Immunsystems und tragen somit entscheidend zu einer schnellen effizienten Reaktion bei (Auffray et al., 2009b, Auffray et al. 2007, Hickey and Kubes, 2009).

Shulman et al. beobachteten 2009 in einem in vitro-Modell für lymphozytäre Adhäsion und transendotheliale Migration auf HUVEC crawlende T-Lymphozyten in Lymphknoten. Soriano et al zeigten 2011 in vivo mittels dynamischer Zweiphotonenmikroskopie crawlende T-Zellen in lymphatischem Gewebe ohne das Setzen eines zusätzlichen Entzündungsreizes.

Mittels eines Mausstamms, in welchem T-Zellen RFP exprimieren, überprüften wir entsprechend, ob T-Lymphozyten in vivo unter physiologischen Bedingungen in der Mikrozirkulation des Ohrs crawlen. In Venolen und Arteriolen waren keine Adhäsion und kein Crawling darstellbar. Ein möglicher Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist das verwendete Versuchsprotokoll. Während wir unsere Experimente mit *T-red-high* Tieren im *Steady-State* durchführten, verwendeten Soriano et al. 2011 gereinigte T-Zellen, färbten diese mit einem Fluoreszenzfarbstoff und injizierten sie in Mäuse vom Wildtyp. Im Gegensatz zum von uns verwendeten atraumatischen Ohrmodell wurde durch Soriano et al. 2011 der rechte popliteale Lymphknoten für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen operativ freigelegt.

Unter diesen Aspekten sind die Ergebnisse von Soriano et al. 2011 nicht mit unseren Resultaten vergleichbar, da wir kein lymphatisches Gewebe im speziellen, sondern die Mikrozirkulation im allgemeinen untersuchten, nicht in beiden Fällen eine vergleichbare atraumatische Präparation stattfand und weitere Reize durch die Fluoreszenzfärbung der T-Lymphozyten möglich erscheinen.

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsgruppen zu gewährleisten, aber auch um eine Abhängigkeit des Crawlings von diesen Umständen zu untersuchen, analysierten wir verschiedene Parameter wie den Gefäßdurchmesser, die Bewegungsrichtung, -geschwindigkeit und -muster und die Scherrate.

In unseren Versuchen crawlten im nicht stimulierten Ohr durchschnittlich $2,3/10^4 \mu\text{m}^2$ Monozyten. Diese eigenen Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen aus der Literatur, in denen beschrieben wurde, dass einzelne GFP-positive Monozyten in postkapillären Venolen und Kapillaren crawlenderweise patrouillieren (Auffray et al., 2007).

In früheren Studien werden leukozytäre Crawlinggeschwindigkeiten von $4-20 \mu\text{m}/\text{min}$ genannt (Ryschich et al., 2006, Auffray et al., 2007). Diese sind vergleichbar mit unseren Ergebnissen. Wie beschrieben, waren die Geschwindigkeiten bei Monozyten im *Steady-State* und PMNs nach KC- Gabe weitgehend ausgeglichen.

5 DISKUSSION

Der prozentuale Anteil an den verschiedenen Crawlingmustern und -richtungen zeigte ebenso eine weitgehende Übereinstimmung zwischen der Literatur (Auffray et al., 2007) und unserer Studie. So waren in unseren Versuchen vornehmlich *wave* und *hairpin* bei residenten Monozyten zu sehen. Neutrophile Granulozyten crawlten in unseren Versuchen (nach KC) vor allem als *hairpin*, *line* und *wave*. Die Crawlingrichtung unter *Steady-State*-Bedingungen war in alle Richtungen möglich, fand jedoch sowohl bei Monozyten als auch bei Neutrophilen Granulozyten vornehmlich (>50%) mit dem Blutfluss statt.

In der Vergangenheit wurde beschrieben, dass Crawling gegen und senkrecht zur Flussrichtung des Blutes eine wichtige Voraussetzung für die intravaskuläre leukozytäre Migration zu den interendothelialen Verbindungen im Rahmen einer Entzündung sei (Schenkel et al., 2004, Wong et al., 2010, Phillipson et al., 2006, Ryschich et al., 2006, Wojciechowski and Sarelius, 2005). Phillipson et al. zeigten 2009, dass adhärente Neutrophile Granulozyten aus Wildtyp-Tieren *in vivo*, aber auch *in vitro* unter der Einwirkung von Scherkräften senkrecht zum Blutfluss crawlten, jedoch häufig die Richtung änderten, wenn sie endotheliale Verbindungszonen erreichten. Unsere Ergebnisse an LysM eGFP/eGFP Tieren können diese Beobachtung nicht bestätigen. Im *Steady-State* crawlte über die Hälfte der PMNs mit dem Blutfluss, nur ein kleiner Teil senkrecht dazu. Ein möglicher Grund für diese Unterschiede ist das verwendete Versuchsprotokoll, im Gegensatz zu unseren Experimenten wurde hier Crawling unter inflammatorischen Umgebungsbedingungen untersucht.

Wie unterscheidet sich Crawling von Monozyten und Neutrophilen während einer akuten Entzündung im Vergleich zum *Steady-State*?

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse stellte sich die Frage, wie sich die Populationen unter veränderten äußeren Bedingungen, sprich als Antwort auf einen Entzündungsreiz verhalten, und ob sich die Regulation des Crawlings als essentielle Voraussetzung der Transmigration hierbei zwischen den beiden Zellgruppen unterscheidet.

Untersucht wurde dies für PMNs (Phillipson et al., 2006, Phillipson et al., 2009, Ryschich et al., 2006, Wojciechowski and Sarelius, 2005, Sumagin et al., 2010) und residente (GFP *high*-) Monozyten (Sumagin et al., 2010, Ryschich et al., 2006, Auffray et al., 2007).

Neutrophile Granulozyten scheinen fast ausschließlich im Anschluss an einen inflammatorischen Reiz das klassische Crawlingphänomen zu zeigen. Es wurde beschrieben, dass nach Gabe des Chemokins MIP-2 (*Macrophage inflammatory protein 2*) oder TNF-alpha im M. Cremaster von Wildtyp-Tieren alle adhärent gewordenen Zellen auch unmittelbar crawlten (Phillipson et al., 2006, Phillipson et al., 2009).

5 DISKUSSION

Auch in unseren Untersuchungen zeigte sich eine veränderte Situation nach dem Setzen eines Entzündungsreizes durch KC oder fMLP (im Rahmen von Kontrollversuchen, nicht dargestellt).

Crawling während einer Entzündung unterschied sich zwischen PMNs und Monozyten. Die Injektion von KC induzierte nach 10-60 Minuten einen Anstieg crawlender Neutrophiler Granulozyten (von 0,8 auf $4,4/10^4 \mu\text{m}^2$), aber die Zahl der residenten Monozyten blieb weitgehend konstant (bei 2,3 und $2,2/10^4 \mu\text{m}^2$).

Bei Monozyten zeigten sich in unseren Experimenten ähnliche Verhältnisse und Verhaltensweisen wie bei Neutrophilen Granulozyten nach KC. Sie behielten größtenteils ihre Bewegungsgeschwindigkeit im Vergleich zum *Steady-State* bei. Im Gegensatz dazu fielen bei den Neutrophilen Granulozyten starke Veränderungen nach KC auf. Sie bewegten sich langsamer als im Vorfeld ($18 \mu\text{m}/\text{min}$ zu $10 \mu\text{m}/\text{min}$). Monozyten änderten ihre Bewegungsgeschwindigkeit nicht ($11 \mu\text{m}/\text{min}$).

Neutrophile Granulozyten zeigten im *Steady-State* kein klassisches Crawling, sondern vielmehr ein kurzes und schnelles „*rolling-like-crawling*“ (s.o.), bei dem sich die Zellen häufig und zügig wieder vom Endothel ablösen.

In unseren Versuchen zeigte sich sowohl bei Monozyten als auch bei Neutrophilen Granulozyten nach KC-Applikation eine gesteigerte Bewegung gegen den Blutfluss. Fast die Hälfte der nun crawlenden Zellen bewegte sich nun in dem Blutfluss entgegengesetzter Richtung. Ebenfalls, wenngleich prozentual geringer, erhöhte sich der Anteil von Leukozyten, die senkrecht zum Fluss crawlten.

Exemplarisch seien hier auch LysM eGFP/eGFP Neutrophile Granulozyten aus unseren (in dieser Arbeit nicht genauer besprochenen) Kontrollversuchen mit fMLP genannt. Eine Stunde nach fMLP-Gabe bewegten sich nur noch 37% mit dem Blutfluss, die verbleibenden 63% bewegten sich gegen oder senkrecht zum Blutfluss, bei Monozyten waren die Ergebnisse nicht vergleichbar deutlich.

Dass die Bewegung zum Blutfluss variierte, je nachdem ob die Aufnahme im *Steady-State* oder einer entzündlichen Umgebung angefertigt wurde, könnte als Anpassungsvorgang an die veränderten Bedingungen und damit als eine andere Art des Crawlings interpretiert werden. Auch die möglicherweise von der Art der Entzündungsinduktion abhängigen differierenden Verhaltensweisen der Subpopulationen sollten weiter hinterfragt und anhand größerer Fallzahlen überprüft werden.

5 DISKUSSION

Da Neutrophile Granulozyten nach einem Entzündungsreiz auch ihr Crawlingmuster dem der Monozyten anpassten (von *short* zu *hairpin*) und Monozyten die Varianz ihrer Muster erweiterten - die Hauptmuster *hairpin* und *wave* verminderten sich zugunsten anderer, z.B. *loop* - kann vermutet werden, dass auch die Form der Bewegung von den Erfordernissen an die Zelle abhängt und eventuell auch hier ein Charakteristikum effizienten Crawlens vorliegt. Eine interessante Fragestellung ist auch, inwiefern monozytäres Crawling das von PMNs beeinflusst. Eine Depletion von Blutmonozyten behinderte in in vivo-Versuchen auch die Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten in der Lunge, woraus sich auch zwangsläufig ein starker Einfluss auf die transendotheliale Migration ergibt (Kreisel et al., 2010). Ob daraus auch ein Einfluss auf Crawling resultiert, und wenn ja in welcher Form, bleibt jedoch ungeklärt.

Ein anderer Aspekt ist die Frage nach weiteren Akteuren in der Steuerungsschleife des Crawlings. So könnten nicht nur Endothelzellen, sondern auch Perizyten - die Bindegewebszellen, die das Endothel von Gewebsseite her umschließen – an der TEM und dem Crawling beteiligt sein.

Proebstl et al zeigten 2012, dass subendotheliales Neutrophiles Crawling durch Perizyten beeinflusst wird. Über die Wechselwirkung mit den Leukozyten faszilierten Perizyten die Transmigration in vivo (Proebstl et al., 2012). Auf ihrem Weg vom Gefäßlumen über Endothel, Perizyt und Basalmembran wird die Entzündungszelle durch verschiedene Mechanismen geleitet. Die Autoren der obengenannten Studie konnten zeigen, dass Neutrophile Granulozyten entlang perizytärer Fortsätze crawlten, um Lücken zwischen zwei Perizyten ausfindig zu machen. Dies war abhängig von LFA-1, Mac-1 und ICAM-1. (Proebstl et al., 2012)

Wenn, wie hier gezeigt, Perizyten subendotheliales Crawling beeinflussen, wäre auch eine Wirkung auf intravasales Crawling denkbar.

Ein möglicher Grund, warum PMNs vor allem nach Stimulation crawlen, könnte sein, dass sich die Abstände zwischen benachbarten Perizyten bei gegebener Entzündung vergrößern, indem sich die Perizyten selbst verändern und so neue potentielle Austrittspunkte schaffen (Proebstl et al., 2012).

Wird nun die Hypothese aufgestellt, dass eine solche perizytäre Formveränderung Voraussetzung für Neutrophiles Crawling und, damit gekoppelt, der anschließenden Migration ist, wäre dies eine logische Erklärung dafür, warum Neutrophile Granulozyten

5 DISKUSSION

kaum im *Steady-State* crawlen. Daraus ergäbe sich auch ein rückwirkender Einfluss auf die Migrationskaskade.

Diesen Ansatz in Bezug auf intraluminales Crawling genauer zu untersuchen, wäre eine interessante Fragestellung im Rahmen künftiger Projekte.

Diskussion der Wirkungen der blockierenden Antikörper – Die Rolle von Beta2-Integrinen und deren Ligand ICAM-1 auf das Crawling von Leukozyten

Die Schnelligkeit transendothelialer Migration wird durch das Niveau von Integrinen, ihren Liganden und deren Affinität zueinander beeinflusst (Valignat et al., 2013, Palecek et al., 1997).

Der Beitrag von Adhäsionsmolekülen auf Seiten des Endothels und auch des Leukozyten auf das Crawlingphänomen wurde hier durch die Anwendung spezifischer monoklonaler Antikörper im Rahmen des *Single-Cell-Tracking*-Protokolls untersucht.

In der Vergangenheit wurde beschrieben, dass es für Monozyten nach Blockade des Crawlings durch Anti-LFA-1- und Anti-Mac-1-Antikörper auf diesen Zellen selbst oder ICAM-1 und ICAM-2-Antikörper auf den Endothelzellen schwieriger war zu emigrieren. Jene Monozyten wurden zwar adhärenz und polarisierten auch, waren aber unfähig auf dem Endothel zu crawlen. (Wong et al., 2010, Schenkel et al., 2004)

Crawling war in den *in vitro*-Versuchsreihen von Schenkel et al. 2004 obligat für eine Migration über die Endothelbarriere. Neutrophile Granulozyten konnten bei *in vivo*-Betrachtungen durch Phillipson et al., 2006 jedoch in vergleichbarer Quantität bei reduzierter Geschwindigkeit migrieren (Wong et al., 2010).

Gründe hierfür könnten einerseits die unterschiedlichen Versuchbedingungen (*in vivo/in vitro*) sein, aber auch populationsspezifische Variationen der Leukozyten im Bereich beteiligter Integrine und ihrer Liganden sind denkbar. So wurde in früheren Veröffentlichungen ein unterschiedlicher konformationsabhängiger Aktivierungsstatus von LFA-1 auf Monozyten und Neutrophilen Granulozyten und dadurch ein verändertes Bindungsverhalten als Grund für die Unterschiede in deren Crawlingverhalten genannt (Sumagin et al., 2010, Shimaoka et al., 2006, Luo et al., 2007).

Beta2-Integrine

Weber und Springer vermuteten 1998, dass vaskuläre Integrine eine Rolle für das Crawling von Monozyten spielen, Schenkel et al. (2004) benannten LFA-1 als Bedingung für Crawling auf unstimuliertem Endothel (Weber and Springer, 1998, Schenkel et al., 2004, Alon and

5 DISKUSSION

Feigelson, 2009). Es wird vermutet, dass leukozytäres Crawling auch während einer Entzündung ein integringesteuerter mechanotaktischer Prozess ist (Phillipson et al., 2009, Wong et al., 2010, Massena et al., 2010, Valignat et al., 2013).

Monozyten und Neutrophile Granulozyten exprimieren Beta2-Integrine situationsabhängig in unterschiedlicher Menge. Sumagin et al. beschrieben 2010 davon abhängig eine differierende Regulation des Crawlings zwischen Monozyten und Neutrophilen Granulozyten. Sie zeigten durch Flusszytometrie, dass die Expression von Mac-1 sowohl auf Monozyten als auch auf PMNs nach Zugabe von TNF-alpha deutlich anstieg (Monozyten: $26,9 \pm 1,5 \times 10^4$ Moleküle/Zelle, nach TNF-alpha: $50,0 \pm 1,4 \times 10^4$ Moleküle/Zelle; PMNs: $33,1 \pm 1,2 \times 10^4$ Moleküle/Zelle, nach TNF-alpha: $56,7 \pm 0,8 \times 10^4$ Moleküle/Zelle). Die LFA-1-Expression dagegen blieb auf PMNs unverändert, war aber auf Monozyten nach Stimulation mit TNF-alpha im Gegensatz zum *Steady-State* (eventuell durch Internalisation) deutlich geringer ($9,9 \pm 0,4 \times 10^4$ Moleküle/Zelle, nach TNF-alpha: $2,9 \pm 0,3 \times 10^4$ Moleküle/Zelle). Insgesamt ergab dies bei Monozyten nach Stimulation mit TNF-alpha eine eineinhalbfach höhere Beta2-Integrindichte als im *Steady-State*. Nach Sumagin et al. (2010) ändern sich die Regulationsmechanismen monozytären Crawlings im Rahmen einer Entzündung von LFA-1 hin zu Mac-1. (Sumagin et al., 2010)

Hierfür spricht auch, dass auf durch einen Entzündungsreiz hin aktivierten Leukozyten entsprechende Mengen LFA-1, aber größere Mengen Mac-1 exprimiert werden (Jacobson and Schrier, 1993, Crucian et al., 2006).

Im Hinblick auf diese Erkenntnisse wäre es sinnvoll, unsere zukünftigen Versuche auch mit durchflusszytometrischen Analysen zu kombinieren, um so die intravitalmikroskopischen Beobachtungen in Zusammenhang mit genauen Werten zur Beta2-Integrinexpression setzen zu können. Auch die Überprüfung anderer Oberflächenmoleküle, wie ICAM- 1 und -2, VLA aber auch JAMs wäre in Kombination mit der Zweiphotonenmikroskopie interessant.

LFA-1, CD11a/CD18

LFA-1 liegt seit einiger Zeit im Blickpunkt der Analysen leukozytärer Rekrutierung im allgemeinen wie auch des Crawlings im speziellen und wurde bereits in vielen in vivo- und in vitro-Studien untersucht. Da die Analysen der Rolle von LFA-1 in vivo jedoch entweder an *KO*-Tieren oder erst nach AK-Applikation angefertigt wurden, ist die Frage, wie sich eine Hemmung von LFA-1 unmittelbar auf die Crawlingbewegung auswirkt, weiterhin ungeklärt. Deshalb führten wir mikroskopische Aufnahmen durchgehend nach unserem *Single-Cell-Tracking*-Protokoll durch.

5 DISKUSSION

Rollende Leukozyten werden dort adhären, wo sie endothelgebundene Chemokine entdecken, das wiederum wird durch LFA-1 auf Leukozyten vermittelt (Hickey and Kubes, 2009). Da der stabile Adhäsionskomplex als Startpunkt der Bewegung in unmittelbarem Zusammenhang mit der Fähigkeit zu Crawlen steht, war es wichtig die Rolle von CD11a hierfür zu analysieren.

Unter anderem Sumagin et al. zeigten 2010 eine dominante Stellung von LFA-1 für monozytäres Crawling im unstimulierten Zustand, allerdings anhand des M. Cremaster-Modells. Schenkel et al. schrieben LFA-1 bereits 2004 eine Schlüsselrolle im Rahmen monozytären Crawlings zu. Antikörper, gerichtet gegen CD11a, führten in früheren Studien zu quantitativen Einbußen crawlender Monozyten (Auffray et al., 2007).

Auch ist bekannt, dass LFA-1 unter Scherkräfteinfluss die Adhäsion von T-Effektorzellen an endotheliales ICAM-1 stärkt (Lek et al., 2013). Unter crawlenden T-Zellen fanden sich viele dynamische LFA-1/ICAM-1-Anhäufungen, die in Zusammenhang mit der Ausbildung ventraler Filopodien standen, und den Aufbau adhäsiver Ausläufer ermöglichten (Shulman et al., 2009).

Der Effekt von Anti-LFA-1-AK war in unseren Versuchen weniger ausgeprägt als erwartet. Um die Reaktionsweisen der Leukozyten genauer einordnen zu können, wurden sie in scherkraftgebundene Gruppen eingeteilt. Hierbei zeigte sich eine klare Zuordnung der Gefäße zum Verhalten der crawlenden Zelle. Nach der Gabe von Anti-CD11a-Antikörpern lösten sich sowohl residente Monozyten (unter *Steady-State*-Bedingungen) als auch Neutrophile Granulozyten (während einer Entzündung), die in Gefäßen mit hoher Scherrate gecrawlt waren, größtenteils kurz nach der Applikation des CD11a-Antikörpers vom Endothel, neue begannen nicht zu crawlen. Da dies nicht in Gefäßen mit niedriger Scherrate gezeigt werden konnte, ist eine Schlüsselrolle von Scherkräften in der LFA-1-Anhäufung und Signalgebung in der Crawlingsregulation in diesen Gefäßen wahrscheinlich. Demnach könnte sich die Steuerung der Bewegung unterscheiden, abhängig davon, in welchem Gefäß sich die crawlende Zelle befindet. LFA-1 (CD11a/CD18) scheint der Entzündungszelle eine sowohl dynamische als auch stabile Bewegung am Endothel entlang zu ermöglichen, den durch den Blutstrom einwirkenden Scherkräften zum Trotz.

Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass Scherkräfte im Stande sind, LFA-1 zu regulieren, LFA-1 für eine erneute Adhäsion während des Crawlings zuständig ist und in Gefäßen mit niedriger Scherrate die Rolle von LFA-1 möglicherweise von anderen Integrinen (wie beispielsweise VLA-4 oder MAC-1) übernommen wird.

5 DISKUSSION

Es gibt zwei unterschiedliche Adhäsionswege, auf denen Leukozyten emigrieren können, einen, der den CD11a/CD18-Adhäsionskomplex benötigt, und einen anderen, der das nicht tut, abhängig vom jeweiligen Stimulus und Signalweg (Doerschuk et al., 2001).

Dies ist ein möglicher Ansatz, die unterschiedlichen Effekte blockierender Antikörper unter differierenden äußeren Bedingungen zu erklären. Unterschiedliche Auslöser oder eingeschlagene Signaltransduktionswege, eventuell auch beeinflusst durch die Stärke der einwirkenden Scherkraft, würden erklären, warum LFA-1-AK einmal zu einer Ablösung führen, ein andermal ohne jeglichen Effekt bleiben.

Die Crawlinggeschwindigkeiten von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten selbst scheinen unabhängig von der Scherrate. Sie unterschieden sich in unseren Auswertungen gruppenübergreifend nicht wesentlich in Gefäßen mit hoher Scherrate von Gefäßen mit niedriger Scherrate.

Mac-1, CD11b/CD18

Mac-1 ist dafür bekannt, Crawling neutrophiler Granulozyten im Rahmen einer Entzündung zu regulieren (Phillipson et al., 2006, Ryschich et al., 2006, Ley et al., 2007, Phillipson et al., 2009). Antikörper gegen Mac-1 reduzierten in anderen Untersuchungen zum Beispiel die Geschwindigkeit der Bewegung, schränkten die Emigration ein und konnten die Anzahl der crawlenden Zellen nach TNF-alpha-Gabe reduzieren (Phillipson et al., 2006, Pick et al., 2013, Sumagin et al., 2010).

Monozytäres Crawlen zeigte sich in einer entzündlichen Umgebung ebenfalls Mac-1-abhängig (Sumagin et al., 2010, Hickey and Kubes, 2009). Diese Beobachtungen bestätigten Mac-1 als wahrscheinlichen Crawlingregulator. Jedoch sind die Daten insgesamt inkongruent, da LFA-1 und Mac-1 auch eine Rolle in der Adhäsion von Leukozyten spielen (Dunne et al., 2003). Frommhold et al. zeigten 2010, dass lösliches RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) als Mac-1-Ligand unter Flußbedingungen während eines Traumamodells die Adhäsion von Leukozyten Mac-1-, jedoch nicht LFA-1-abhängig steuerte.

Eine Blockade von Mac-1 hemmte in den Versuchen von Ueno et al. 2014 Crawling und TEM *Toxoplasma gondii*-infizierter Monozyten in einem größeren Umfang als von nicht infizierten. Die Toxoplasmeninfektion führte zur vermehrten Expression der hochaffinen Mac-1-Konformation und zu seiner Anhäufung in der Nähe endothelialer Verbindungszonen (Ueno et al., 2014). Infektionen im allgemeinen oder spezielle Formen scheinen also Einfluss auf den Affinitätszustand und die Anordnung von Mac-1 zu haben. Dies bestätigt unsere Theorie, dass Mac-1-gesteuertes Crawling abhängig von den Umgebungsbedingungen ist.

5 DISKUSSION

Das Problem an den bisherigen in vivo-Studien, in denen Mac-1 als möglicher Crawlingregulator untersucht wurde, ist, vergleichbar mit LFA-1, dass entweder *knockout*-Tiere verwendet oder die Antikörper vor der mikroskopischen Aufnahme appliziert wurden. Wie bereits erwähnt, verfehlen diese Methoden den direkten Beweis, dass das ausgeschaltete Adhäsionsmolekül Crawling selbst und nicht vielleicht schon die Adhäsion davor blockiert.

Dies war der Grund, warum wir den Effekt von Mac-1 auf das Crawling von Leukozyten auch mit Hilfe der *Single-Cell-Tracking*-Methode intravitalmikroskopisch untersuchten.

Die Experimente mit Mac-1-blockierenden Antikörpern zeigten unterschiedliche Reaktionen der crawlenden Zellen, abhängig von der Richtung, in der sie sich vor der Intervention bewegten. Wir beschreiben einen Richtungswechsel primär gegen den Blutfluss crawlender Monozyten (78%) und Neutrophiler Granulozyten (82%) bei Blockade von Mac-1. Crawlende Zellen gaben in unseren Versuchen eine Bewegungsrichtung gegen den Fluss auf. Ein Teil der Monozyten (22%) hielt an, darüber hinaus änderte sich die Geschwindigkeit der Crawlingbewegung nicht nach Gabe des Antikörpers. Der vorbeschriebene Einfluss von Anti-Mac-1-AK auf die Crawlinggeschwindigkeit konnte von uns demnach nicht bestätigt werden. Da sich die Bewegungsgeschwindigkeit der Zellen aber in unseren Versuchen unter Anti-CD54 deutlich reduzierte, kommt gegebenenfalls eine antikörperbedingte Störung des Miteinanders der Bindungspartner Mac-1 und ICAM-1 als Ursache der unterschiedlichen Erscheinungen in Frage.

Der Großteil der Zellen bewegte sich nach Applikation von Anti-Mac-1-Antikörpern mit dem Blutfluss, kein Effekt zeigte sich bei Zellen, die sich von Anfang an mit dem Blutfluss bewegten.

Dass auch einige Neutrophile Granulozyten nach Gabe eines Kontrollantikörpers scherkraftunabhängig die Richtung änderten, lässt sich hieraus nicht erklären. Da es sich im Vergleich zu den Ergebnissen nach Anti-Mac-1-AK bei Monozyten und den übrigen PMNs aber um die Reaktionen weniger Einzelzellen handelte, ist eine zufällige Erscheinung möglich.

Die Abhängigkeit der Crawlingregulation durch Mac-1 und LFA-1 von der primären Bewegungsrichtung, wie in unseren Versuchen dargestellt, wurde in früheren Studien noch nicht gezeigt.

Crawling gegen den oder senkrecht zum Blutfluss scheint einen komplexen Mechanismus darzustellen und durch andere Moleküle reguliert zu werden als die Bewegung mit dem Fluss. Crawlende Zellen sind offensichtlich gezwungen, wenn die Crawlingsteuerung über CD11b

5 DISKUSSION

blockiert wurde, in eine andere Ausgangsposition zu wechseln (hier die entgegengesetzte Richtung), um weiterzucrawlen.

Die Crawlingrichtung unterliegt variablen Einflüssen, PMNs crawlen nach Massena et al., 2010 in vivo vorwiegend mechanotaktisch gesteuert bis sie eine passende Junktionsstelle entdecken und bewegen sich dabei teils auf direktem Wege und aktiv gegen den Strom des vorbeifließenden Bluts dorthin. Haben sie die Grenze zwischen zwei Endothelzellen erreicht, folgen sie ihr haptotaktisch reguliert (Phillipson et al., 2009, Massena et al., 2010). Wenn eine perpendikuläre Bewegung im Rahmen einer Mechanotaxie stattfindet – dies bekräftigen auch die Ergebnisse von in vitro-Versuchen unter Scherkraft- aber ohne Chemokineinfluss von Massena et al. (2010) – und sich das ändert, wenn Mac-1 blockiert wird, ist eine tragende Rolle von Mac-1 und seinen Bindungspartnern ICAM-1, ICAM-2 und JAM-C in dieser Form höchstwahrscheinlich. Die Vermutung liegt nahe, dass Crawling gegen den Blutfluss in zwei Phasen eingeteilt werden kann, eine nichtjunktionale mechanotaktische und eine funktionale, die gegebenenfalls auch einer unterschiedlichen Regulierung unterliegen.

Wenn sich eine Zelle nicht mit dem Blutfluss bewegt, hat sie zwei Möglichkeiten, sie kann senkrecht auf direktem Weg zu einer Junktionsstelle oder gegen den Blutfluss auf „Umwegen“ an ihren definitiven Transmigrationsort crawlen.

Dass die Art der Endothelüberquerung – transzellulär oder parazellulär - zwischen den leukozytären Subpopulationen variiert, wenn ein wichtiger Regulator wie Mac-1 blockiert wird, könnte auch ein Hinweis auf differierende Steuerungsmechanismen sein. Wurde Crawling von Neutrophilen Granulozyten durch eine Blockade von Mac-1 gehemmt, migrierten sie vermehrt transzellulär. (Phillipson et al., 2006, Wong et al., 2010)

In unseren Versuchen crawlten nach der Gabe von Mac-1-Antikörpern keine Monozyten aber zwei Neutrophile Granulozyten perpendikulär, die sich im Vorfeld gegen den Fluss bewegt hatten. Wenn man die Hypothese aufstellt, dass perpendikuläres Crawlen im Zusammenhang mit einer transendothelialen Migration steht, könnte ein Grund für den Unterschied zwischen den Leukozytenpopulationen sein, dass Monozyten unter Umständen nicht in der Form transzellulär zu migrieren im Stande sind wie Neutrophile Granulozyten (Wong et al., 2010).

Entsprechend könnte die Art und Weise der Endothelüberquerung auch Einfluss auf die Crawlingrichtung gegen den oder senkrecht zum Fluss haben. Eine Zelle die auch transzellulär emigrieren kann, kann direkt (senkrecht) zum Endothel crawlen, eine andere, die erst eine Junktionsstelle suchen muss, wird sich eventuell gegen den Fluss bewegen.

5 DISKUSSION

Bezugnehmend auf den Einfluss von Mac-1 ist auch eine genauere Betrachtung seiner Bindungspartner indiziert. Eine veränderte Expression von JAM-C an interendothelialen Verbindungszonen während Ischämie-Reperfusion-Versuchen, seine Blockade und genetische Deletion führten in der Vergangenheit zu einer zögerlichen oder verkehrten polarisierten transendothelialen Migration von PMNs, was für eine maßgebliche Beteiligung von JAM-C an der Migration während Entzündungen spricht (Woodfin et al., 2011).

Die mögliche Rolle von JAM-C auch für das Crawling von Leukozyten lenkt die Aufmerksamkeit allgemein auf die Verbindungsstellen zwischen Endothelzellen und andere dort lokalisierte Adhäsionsmoleküle wie *Junctional Adhesion Molekuls A* und B, ESAM, Okkludine und Claudine und ihre mögliche Rolle als Steuerungseinheiten. Diese junktionsassoziierten Moleküle könnten im Fokus weiterer Analysen von Crawling und TEM stehen.

Die Richtungswechsel von primär gegen den Fluss crawlenden Zellen als Antwort auf die Applikation eines CD-11b-Antikörpers waren in unseren Versuchen unabhängig von der Größe der einwirkenden Scherkräfte. Zwischen 75% und 83% der Leukozyten änderten ihre Crawlingrichtung in beiden Scherkräftegruppen. Auch das Anhalten von Monozyten unter *Steady-State*-Bedingungen konnte in beiden Gruppen gesehen werden.

Allerdings ist hierbei die Aussagekraft eingeschränkt, da insgesamt nur zwei Monozyten als Reaktion auf den AK anhielten, davon jeweils einer in den beiden *shear*-Gruppen. Ob die Fortführung der begonnenen Bewegung davon abhängt in welchem Gefäß (hohe oder niedrige Scherrate) sie stattfindet und gegebenenfalls unterschiedlich reguliert wird, kann aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden. Dies anhand weiterer Versuche ausreichender Fallzahl mit besonderem Augenmerk auf den Abbruch einer begonnenen Crawlingbewegung zu untersuchen, wäre ein interessanter Aspekt möglicher Folgeprojekte.

ICAM-1

Werden CD11a oder CD11b durch monoklonale Antikörper blockiert, können sie nicht mehr mit ihren Liganden interagieren. Daraus ergibt sich die Frage, ob nicht das Ausschalten von Mac-1/LFA-1 selbst die Ursache des Richtungswechsels, Anhaltens oder Ablösens ist, sondern vielleicht das Problem darin liegt, dass der endothelseitige Ligand ob seiner mangelnden Bindung an das Beta2-Integrin in Wahrheit der maßgebliche Regulator ist.

Die Immunglobuline ICAM werden unter anderem auf Leukozyten und Endothelzellen exprimiert (Long, 2011, Huang et al., 2006, Lehmann et al., 2003). Die Wirkung von beispielsweise ICAM-1 auf die leukozytäre Migration ist sehr gut untersucht. So ist es unter

5 DISKUSSION

anderem wichtig für die Aufrechterhaltung der Bindung zwischen Endothel und Leukozyt (Smith et al., 1989, Smith et al., 1988). In den Untersuchungen von Ryschich et al. 2006 verhinderten entsprechende ICAM-1-Antikörper größtenteils Crawlen. Anzahl, Strecke und Geschwindigkeit nahmen im Vergleich zur Kontrolle ab, die durchschnittliche Crawlingdauer jedoch variierte zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant (Ryschich et al., 2006).

Trotz der vielfältigen Daten in bisherigen Studien war es für uns wichtig, eigene Ergebnisse unseren Versuchsprotokollen entsprechend zu erhalten. Unsere Experimente zeigen, dass ICAM-1 als Hauptligand der Beta2-Integrine zwar das Crawling von Monozyten und PMNs beeinflusst, sich aber prozentual nach Antikörpergabe nicht mehr Zellen beispielsweise mit oder gegen den Blutfluss bewegten als davor. Bei keiner intravitalmikroskopischen Aufnahme und dem anschließenden *Tracking* war ein Richtungswechsel zu sehen. Auch in der Literatur ist kein Richtungswechsel bei AK-Gabe gegen ICAM-1 erwähnt.

Wir beobachteten jedoch in diesen Versuchen, dass Zellen der verschiedenen Populationen auf die Gabe von ICAM-1-blockierenden Antikörpern mit einer Verlangsamung (Monozyten von 11µm/min und Neutrophile Granulozyten von 10µm/min auf 1µm/min) und teils mit einer allgemeinen Reduktion der Crawlingbewegung reagierten. Diese eigenen Ergebnisse sind vergleichbar mit den bekannten Ergebnissen früherer Studien (Ryschich et al., 2006).

Eine mögliche Interpretation dieses Phänomens ist, dass ICAM-1 als ein essentieller Bestandteil Mac-1- und LFA-1-abhängigen Crawlings gesehen wird (Phillipson et al., 2009).

Wird nun die Funktion von ICAM-1 gestört, kann Crawling trotz intakten Mac-1 nicht mehr in der ursprünglichen Quantität und Qualität stattfinden, da es an einem funktionstüchtigen Liganden mangelt. ICAM-1 scheint eine wichtige Voraussetzung für zielgerichtetes Crawling *in vivo* zu sein.

Auch ICAM-2 ist ein potentieller Kandidat in der Steuerung leukozytären Crawlens (Hickey and Kubes, 2009, Schenkel et al. 2004, Halai et al., 2014), wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Diskussion der Wirkung von Scherkräften auf den Crawlingprozess

Scherkräfte haben einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Migrationskapazität von Leukozyten (Shulman et al., 2009, Phillipson et al., 2006, Cuvelier and Patel, 2001, Sumagin et al., 2010). Im Gegensatz zur interstitiellen Leukozytenmigration untersteht die Migrationskaskade stark dem Einfluss einwirkender Scherkräfte (Shulman et al., 2009, Phillipson et al., 2006, Cuvelier and Patel, 2001, Cinamon et al. 2001, Cinamon et al., 2004).

5 DISKUSSION

Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Frage, welche Auswirkungen Scherkräfte einerseits auf die Entzündungszelle, andererseits auf das vaskuläre Endothel haben und inwiefern hierdurch andere membrangebundene Proteinaktivitäten, wie beispielsweise die Expression von Wachstumsfaktoren beeinflusst werden (Valignat et al., 2013).

In vitro wurde ohne das Einwirken von Scherkräften die Beobachtung gemacht, dass Monozyten nach einer Art „basalen“ Crawlings nicht migrierten. Es könnte sich hierbei um eine Crawlingform handeln, die in unstimulierten Gefäßen stattfindet, ohne zu einer Zelldiapedese zu führen. Jedoch stellt sich die Frage, ob es sich hierbei um ein physiologisches Phänomen handelt, da der Einfluss der in diesem Fall nicht vorhandenen Scherkräfte wie erwähnt nicht zu unterschätzen ist. Scherkräfte können einerseits zu einer Ablösung der crawlenden Monozyten führen, in vivo jedoch auch die Bereitschaft der Zelle steigern zu transmigrieren. (Cuvelier and Patel, 2001, Hickey and Kubes, 2009)

Valignat et al. (2013) prüften die Auswirkungen von Veränderungen der lokalen Scherkräfte auf migrierende T-Lymphozyten. Die hierfür benötigte Zeit blieb unabhängig von der Stärke der Scherkräfte, möglicherweise weil die entgegengesetzten Kräfte von Fortbewegungslamellipodien diese überstiegen. Jedoch passten die Lymphozyten ihre Migration schnell und reversibel an veränderte Scherkräfte an. (Valignat et al., 2013, Rainger et al., 1999).

In unseren in vivo-Versuchsreihen standen die Leukozyten immer unter dem Einfluss von Scherkräften. In einer physiologischen Umgebung ist es nicht möglich, diese zu eliminieren. Das wäre im Rahmen unserer Fragestellung auch nicht sinnvoll gewesen. Um den Einfluss von Scherkräften zu quantifizieren, unterschieden wir Gefäße mit hoher von Gefäßen mit niedriger Scherrate und analysierten die crawlenden Zellen darin auf mögliche Unterschiede. Ist wie in diesem Fall, die Scherrate die einzige Variable bei sonst gleichen Bedingungen, sind differierende Ergebnisse ihrem Einfluss zuzuordnen.

Scherkräfte scheinen Beta2-Integrin-reguliertes Crawling zu beeinflussen, die Wirkung LFA-1-blockierender Antikörper war in unseren Versuchen im Gegensatz zu der von Mac-1-Antikörpern scherkraftabhängig.

Unter anderem induzieren Scherkräfte die nötige Zellverformung, können sowohl fördernd als auch hemmend auf Selektin-Selektinliganden-Brücken wirken, vermitteln Expressionsveränderungen leukozytärer Adhäsionsrezeptoren und ermöglichen so erst Adhäsion, Rollen und Transmigration (Sundd et al., 2011, Lei et al., 1999, Finger et al., 1996, Lawrence et al., 1997, Simon and Goldsmith, 2002, Sampath et al., 1995, Cuvelier and Patel, 2001, Luscinskas et al., 2001).

5 DISKUSSION

Da für Scherkräfte eine Wirkung auf die Integrinregulierung und damit indirekt auf die Crawlingbewegung, aber *in vitro* auch auf das Crawlen selbst beschrieben wurde (Lee et al., 2009, Shulman et al., 2009, Marschel and Schmid-Schonbein, 2002), prüften wir den Einfluss dieses Parameters auch in unseren *in vivo*-Versuchsreihen. Die unmittelbare Abhängigkeit des Crawlings von auf die Zellen einwirkenden Scherkräften wurde bisher intravital-mikroskopisch nicht gezeigt.

Im Rahmen unserer Experimente konnten im Vergleich zu den Ergebnissen aus einigen *in vitro*-Studien, in denen Scherkräfte als essentiell für Crawling beschrieben wurden, das gänzlich unabhängig von einem chemotaktischen Gradienten war, bei beiden Zellpopulationen keine Unterschiede in den bewerteten Bewegungscharakteristika (z.B. Muster, Richtung, Geschwindigkeit) gezeigt werden.

Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Beobachtungen ist, dass die Integrinregulierung auf Leukozyten als Voraussetzung für eine crawlinglimitierende Filopodienausbildung scherkraftabhängig ist.

Es ist kein unmittelbarer Widerspruch der Ergebnisse untereinander zu konstatieren. Jedoch ist festzuhalten, dass die *in vitro*-Ergebnisse nicht direkt auf lebende Organismen übertragbar sind, und zur genauen Crawlinganalyse *in vivo*-Versuchsreihen unverzichtbar sind.

Während die Applikation von blockierenden Antikörpern gegen LFA-1 eine Ablösung der Monozyten vom Endothel in postkapillären Venolen mit hoher Scherrate induzierte, konnte eine derartige Wirkung in Venolen mit niedriger Scherrate nicht gezeigt werden, eventuell bedingt durch in diesen Gefäßen unterschiedlich wirkenden Scherkräfte. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass für eine Ansammlung und Aktivierung von LFA-1 intravasale Scherkräfte nötig sein könnten. Bei ausreichend hoher Zugspannung wäre dies im Vergleich zu Gefäßen niedriger Scherrate, in denen diese deutlich geringer ausgeprägt ist, ein möglicher Grund für das beobachtete unterschiedliche Crawlingverhalten von Monozyten dort. Da blockierende Antikörper gegen LFA-1 keine Auswirkung auf das Crawling in Gefäßen niedriger Scherkraft hatten, ist zu vermuten, dass es hier LFA-1-unabhängig durch andere Mechanismen reguliert wird.

5.3 Mögliche Folgeprojekte

Nach der Beendigung unseres in dieser Arbeit beschriebenen Projekts sind weitere Ansätze beziehungsweise Versuchsaufbauten denkbar.

5 DISKUSSION

Um eine noch genauere Aussage zur Regulation des Crawlings zu erhalten, wäre es sinnvoll, die Wirkung von Beta-Integrinen auf monozytäres Crawling auch unter den Bedingungen einer Entzündung genauer zu untersuchen.

Darüber hinaus wäre auch eine Analyse des Einflusses von CD11c, VLA-4, VCAM-1, JAM- und A, -B, -C auf das Crawling der leukozytären Subpopulationen im *Steady-State* und während einer Entzündung denkbar. Der Einfluss von Selektinen auf das Crawling wurde von uns teils im Vorfeld dieser Arbeit untersucht. Antikörper gegen P-, L- und E-Selektine hatten hierbei keine Wirkung auf crawlende Leukozyten.

Durch die Technik der Konfokalmikroskopie könnte die Verteilung von JAMs in Bezug auf die Übergänge und Verbindungen zwischen den Endothelzellen untersucht werden.

Mittels Flusszytometrie könnte sowohl die Aktivität und Reinheit der Leukozyten als auch die Bindung der gegebenen Antikörper überprüft werden.

Von großem Interesse ist auch eine spezielle Analyse des Crawlings während der Atherosklerose. Hierfür wäre die Verwendung von ApoE-defizienten Tieren eine Option.

Bedingungen für alle Folgeversuche sollten die genaue Einhaltung der etablierten Versuchsprotokolle, eine ständige Kontrolle der Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsgruppen und der Tiere untereinander wie auch ausreichend hohe Fallzahlen sein.

5.4 Ausblick

Mit einer genaueren Kenntnis der Migration von Entzündungszellen, respektive des Crawlings und seiner spezifischen Regulation in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rahmenbedingungen ist langfristig eine zielgerichtete Intervention im Rahmen von Entzündungsgeschehen vorstellbar.

Da diese die Grundlage einiger bedeutender Krankheitsentitäten darstellen, ist dies sowohl medizinisch als auch gesundheitspolitisch eine interessante Option.

Die gezielte pharmakologische Beeinflussung leukozytärer Migration ist ein Ziel in der Entwicklung neuer Therapieoptionen für Krankheiten, bei deren Behandlung eine reduzierte oder gesteigerte Immunantwort erwünscht ist (Mackay, 2008, Friedl and Weigelin, 2008, Nourshargh et al. 2010).

Zum Beispiel könnten auf Zellebene angreifende Therapien den Verlauf einer atherosklerotischen Entzündung modifizieren und damit das Fortschreiten der Krankheit positiv beeinflussen (Soehnlein and Weber, 2009).

Experimentelle Ansätze könnten die Zahl verfügbarer Blutmonozyten vermindern, von denen sich Makrophagen, dendritische Zellen und Schaumzellen ableiten. So könnten atherosklerotische Läsionen beziehungsweise deren Belastung mit sich verändernden

5 DISKUSSION

Blutlipiden reduziert werden, indem zielgerichtet Einfluss auf bestimmte Adhäsionsmoleküle genommen wird (Galkina and Ley, 2009).

In diesem Zusammenhang stellen auch Integrine einen Angriffspunkt möglicher therapeutischer Interventionen dar. Integrine vermitteln nicht nur adhäsive Vorgänge zwischen Zellen beziehungsweise zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix, sondern beeinflussen viele verschiedene Signaltransduktionskaskaden, die das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung von Zellen und die Organentwicklung beeinflussen. Defekte der Integrine oder ihrer Effektoren können demnach Veränderungen dieser Bereiche bedingen und so fehlerhafte Organentwicklung, Abwehrschwäche, Malignome und Autoimmunkrankheiten bedingen (Zhang and Wang, 2012).

Die gestörte Aktivierung von Integrinen auf Leukozyten und die unzureichende Expression von Glykoproteinen, Mac-1, LFA-1 und gp150/95 charakterisieren menschliche Leukozytenadhäsionsdefizienzsyndrome. Diese sind gekennzeichnet durch eine gestörte Rekrutierung und Emigration von Leukozyten und konsekutiv eine ungenügenden Funktion während einer Entzündung. Es kommt zu rezidivierenden Infektionen. (Herter et al., 2013, Anderson et al., 1985, Anderson and Springer, 1987, Bowen et al., 1982)

Bereits heute finden blockierende Antikörper, gerichtet beispielsweise gegen VLA-1 (A4B1)/Natalizumab und gegen LFA-1/Efalizumab, Anwendung in der Behandlung verschiedener Krankheitsbilder (Zhang and Wang, 2012, Miller et al., 2003, Lebwohl et al., 2003). Lebwohl et al. zeigten 2003 eine signifikante Verbesserung mäßiger bis schwerer Krankheitsverläufe der Psoriasis bei Behandlung mit Efalizumab. Durch Gabe von Natalizumab konnte unter anderem eine Reduzierung entzündlicher ZNS-Läsionen im Rahmen der Multiplen Sklerose erreicht werden (Miller et al., 2003).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist ein möglicher Zusammenhang crawlender Leukozyten mit der Plättchen-*Clearance* (Beseitigung). Maugeri et al. (2011) wiesen auf intensive Wechselwirkungen zwischen aktivierten Thrombozyten und Leukozyten und eine sich darauf beziehende Möglichkeit hin, aktivierte Thrombozyten aus dem Blutkreislauf zu entfernen. Diese wiederum könnten in Zusammenhang mit der Entstehung von Thrombosen und der Atherosklerose stehen. (Maugeri et al., 2011)

Die Rolle residenter Monozyten im *Steady-State* ist weiterhin ungeklärt. Eine eventuelle Beteiligung patrollierender Monozyten an der Beseitigung aktivierter Plättchen wäre denkbar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Entzündliche Reaktionen spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung und dem Verlauf vieler Krankheiten. Auch wirtschaftlich wie gesundheitspolitisch bedeutende Entitäten wie Atherosklerose und die dadurch bedingten Herzkreislauferkrankungen gehören hierzu.

Entscheidend in der immunologischen Pathophysiologie ist, dass die entsprechenden Entzündungszellen aus dem Blutgefäßsystem in das Gewebe gelangen können. Für ein koordiniertes Nacheinander der hierzu nötigen Schritte ist die Interaktion von Signalmolekülen wie Anhaftungsfaktoren auf Entzündungszellen und Endothelzellen entscheidend. Die drei Schritte der bekannten Migrationskaskade Rollen, Anhaften und Transmigration wurden in den vergangenen Jahren in einer Vielzahl von Studien untersucht.

Intravaskuläres leukozytäres Crawling („Krabbeln/Kriechen“) hingegen stellt einen relativ neu identifizierten Schritt dar, dessen funktionelle Bedeutung und genaue Regulierung bisher noch nicht ausreichend verstanden sind.

Gegenstand dieser Studie war es, die genauen Mechanismen des Crawlens inklusive der Unterschiede zwischen den Populationen und verschiedenen Ausgangssituationen mittels in vivo-Mikroskopie zu analysieren.

Um das entsprechende Bewegungsverhalten genauer zu verstehen, war es nötig, im Vorfeld eine Versuchsanordnung zu etablieren, die es uns ermöglichte die intravasal crawlenden Zellen zu beobachten und ihr Verhalten quantitativ wie qualitativ zu beschreiben. Hierfür wurde aufgrund seiner Vorteile gegenüber der herkömmlichen Intravitalmikroskopie ein Zweiphotonenmikroskop verwendet. Um die Leukozyten in einer entzündungsfreien Situation zu beobachten, entschieden wir uns für das Ohrmodell. Hier können die Zellen bei minimaler chirurgischer Manipulation und kaum auftretenden Bewegungsartefakten in einer zweidimensionalen Gefäßarchitektur beobachtet werden. Im Anschluss wurde das Bewegungsverhalten der Zellen mittels *Single-Cell-Tracking* analysiert. Diese von uns etablierte Methode ermöglicht die durchgehende Beobachtung und Analyse jeder einzelnen crawlenden Zelle. Einflüsse anderer Faktoren auf andere Schritte der Migrationskaskade können ausgeschlossen werden.

Im ersten Teil unserer Untersuchungen konnten wir das in der Literatur bereits beschriebene patrollierende Crawling von Monozyten unter entzündungsfreien Bedingungen (*Steady-State*) beobachten, wobei kein Crawling von T-Lymphozyten und kaum Crawling von Neutrophilen Granulozyten darstellbar war.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Wir konnten zeigen, dass Acridin Orange- bzw. Rhodamin 6G-markierte Leukozyten in den Ohrvenen crawlten. In diesem Zusammenhang stellten wir einen bedeutenden Einfluss des phototoxischen Effekts auf den Entzündungszustand des Ohrs und damit das Verhalten der Neutrophilen Granulozyten fest. Dieses Phänomen zeigte sich in diesem Ausmaß nicht bei der Untersuchung von Monozyten.

Um den die Phototoxizität verstärkenden Effekt von konventionellen Fluoreszenzfarbstoffen zu umgehen, entschieden wir uns für die Verwendung von LysM eGFP/eGFP und CX3CR1 eGFP/+ Tieren.

Eine weitere Beobachtung war, dass auch die eingestellte Energie des Zwei-Photonen-Lasers Einfluss auf die Anzahl der crawlenden Neutrophilen Granulozyten hatte. Diese Wirkung wurde bei GFP-positiven Monozyten nicht sichtbar. Als Konsequenz daraus wurde die maximal anzuwendende Laserstärke während der Versuche auf einen Bereich zwischen 2,5% und 5% begrenzt. Da eine längere Einwirkung des Lasers bei geringer Stärke ebenso eine entzündliche Reaktion zu induzieren vermochte, wurde auch die Gesamtaufnahmedauer einzelner Gefäße limitiert. Gegen Gr-1-gerichtete Antikörper scheinen das Crawling von Neutrophilen Granulozyten zu hemmen.

Aufgrund dieser Ergebnisse verwendeten wir für alle nachfolgenden Versuche Protokolle, die genetisch veränderte GFP-Mausstämme und damit eine Färbung mit anderen Farbstoffen hinfällig machten.

Im zweiten Teil dieser Studie untersuchten wir Unterschiede zwischen dem Crawling von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten im *Steady-State*. Wir stellten fest, dass Neutrophile Granulozyten unter physiologischen Bedingungen kaum crawlten und, wenn sie es tun, eine sehr schnelle Bewegung („*Rolling like crawling*“) kürzerer Dauer (durchschnittliche Geschwindigkeit Neutrophile Granulozyten: 18µm/min, Monozyten: 11 µm/min; durchschnittliche Dauer: Neutrophile Granulozyten 0,9min, Monozyten: 7,1min) ausführen. Ebenso beobachteten wir Unterschiede im Bewegungsmuster zwischen den Leukozytenpopulationen. Während Neutrophile Granulozyten hauptsächlich kurze Wegstrecken (*short*) zurücklegten, war das Hauptbewegungsverhalten von Monozyten *hairpin*. Im Gegensatz hierzu zeigte sich die Richtung der Bewegung vergleichbar zwischen beiden Populationen, hauptsächlich mit dem Blutfluss (>50%).

Im nächsten Schritt analysierten wir die Unterschiede im Verhalten der Leukozytensubpopulationen als Antwort auf einen Entzündungsreiz. Wir zeigten, dass KC

6 ZUSAMMENFASSUNG

einen quantitativen Anstieg crawlender Neutrophiler Granulozyten verursachte. (durchschnittliche Anzahl crawlender Zellen: $0,8/10^4 \mu\text{m}^2$ vor KC auf $4,4/10^4 \mu\text{m}^2$). Diese Wirkung hatte KC nicht auf Monozyten. Der Entzündungsreiz brachte die Leukozyten dazu, ihre Bewegungsgeschwindigkeit zu verändern. Neutrophile Granulozyten crawlten jetzt langsamer, vergleichbar mit Monozyten. Deren Geschwindigkeit entsprach mit durchschnittlich $10 \mu\text{m}/\text{min}$ der unter *Steady-State*-Bedingungen.

Im Gegensatz zur Hauptbewegungsrichtung beider Populationen mit dem Blutfluss unter *Steady-State*-Bedingungen crawlten Monozyten und Neutrophile Granulozyten nach KC-Gabe zu einem größeren Anteil auch gegen die Blutflussrichtung und senkrecht dazu.

Eine Veränderung beobachteten wir bezüglich des Bewegungsmusters. Während Neutrophile Granulozyten bei einer Entzündung vor allem die Form *hairpin* zeigten, änderten auch die Monozyten ihr Bewegungsmuster dahingehend, dass sie die Variabilität ihrer Bewegung erweiterten und viele verschiedene Crawlingmuster parallel auftraten.

Im folgenden Teil der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Wirkung der Integrine Mac-1, LFA-1, ihres Liganden ICAM-1 und des Blutflusses inklusive der Scherrate auf das Crawlingverhalten von Leukozyten.

Wir konnten zeigen, dass LFA-1, Mac-1 und ICAM-1 Crawling von Monozyten im *Steady-State* und Neutrophilen Granulozyten im Rahmen einer Entzündung regulieren. LFA-1 hatte Einfluss auf Crawling in Gefäßen mit hoher Scherrate, nicht jedoch in Gefäßen mit niedriger Scherrate. Monozyten (85%) und Neutrophile Granulozyten (100%) lösten sich in Gefäßen mit hoher Scherrate vom Endothel, nachdem blockierende Antikörper gegen LFA-1 gegeben wurden. Diese Ergebnisse liefern Hinweise auf eine nicht zu unterschätzende Rolle von CD11a auf die leukozytäre Adhäsion.

Mac-1 erwies sich als crawlingdeterminierend bei Leukozyten, die sich gegen den Blutfluss bewegten. Sie änderten ihre Richtung (78% der Monozyten, 82% der Neutrophilen Granulozyten) oder hielten an (22% der Monozyten), nachdem gegen CD11b-gerichtete Antikörper gegeben wurden. Ob die Zelle in einem Gefäß hoher oder niedriger Scherrate crawlte, hatte keinen Einfluss hierauf.

ICAM-1-Antikörper führten bei beiden Populationen zu einer Verminderung der Crawlinggeschwindigkeit (von $10/11 \mu\text{m}/\text{min}$ auf $1 \mu\text{m}/\text{min}$).

Während beschrieben wurde, dass Scherkräfte *in vitro* Crawling beeinflussten, konnten wir in unseren *in vivo*-Experimenten zeigen, dass die Crawlinggeschwindigkeit unabhängig von der

6 ZUSAMMENFASSUNG

Stärke der Scherkräfte ist, unterschiedliche Scherraten jedoch Einfluss auf die Wirkung von Antikörpern, im Speziellen die Signalgebung via LFA-1, haben.

Die Beobachtungen im Rahmen dieser Studie liefern deutliche Hinweise, dass Crawling von Leukozyten eine wesentliche Voraussetzung für die Zellmigration während einer Entzündung ist. Dieses Kriechverhalten stellt einen komplexen Prozess dar, der sehr spezifisch über die Interaktion verschiedener Oberflächenmoleküle mit den entsprechenden Liganden gesteuert wird. Seine Regulation scheint sich bei differierenden Umgebungsbedingungen zu unterscheiden. So lassen die Ergebnisse unserer Versuchsreihen vermuten, dass die Größe des Gefäßes in Zusammenhang mit der Blutflussgeschwindigkeit und die dadurch bedingte Scherrate Unterschiede im Crawlingverhalten bedingen. Die Wirkung der applizierten Antikörper war teils abhängig von der vorherigen Bewegungsrichtung der Zelle. Auch dies lässt vermuten, dass sich die Steuerung des Crawlings bei verschiedenen Bewegungsrichtungen und Zellpopulationen unterscheidet und es wahrscheinlich unterschiedliche Formen von Crawling gibt.

Der Versuchsaufbau erwies sich als geeignet, um in vivo und mit einer Minimierung von Störfaktoren eine genaue Bewegungsanalyse der Zellen durchzuführen. Durch die Beobachtung der direkten Wirkung des Antikörpers über die Gabe während der Videoaufnahmen konnten wir die entsprechenden Zellreaktionen unmittelbar dem applizierten Antikörper zuordnen.

Um noch genauere Angaben über das Crawling und seine Bedeutung im Rahmen von Krankheiten zu erlangen, werden weitere Versuchsreihen nötig sein. Gerade bei der Analyse von Monozyten ist eine hohe Versuchszahl nötig, da in den Einzelgefäßen jeweils nur wenige Zellen crawlen. Mittelfristig sind jedoch durchaus therapeutische Interventionen in der Behandlung diverser entzündlicher Veränderungen denkbar.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

A Abbildungen

Abb. 1	Transilluminationsmikroskopie M. Cremaster
Abb. 2	Ablauf der leukozytärer Transmigrationskaskade (Ley et al., 2007)
Abb. 3	Langzeit-Zeitraffer-IVM-Aufnahmen des intravaskulären Crawlings von Leukozyten im M. Cremaster-Modell nach Stimulation mit dem Chemokin MIP-1 (Phillipson et al., 2006)
Abb. 4	Intravitalmikroskopische Darstellung des Weges crawlender residenter Monozyten in Gefäßen von Haut und Mesenterium (Auffray et al., 2007)
Abb. 5	Inside-out- und Outside-in- Signalwege
Abb. 6	T-Lymphozyten auf aktiviertem Endothel (Shulman et al., 2009)
Abb. 7	Vergleich der verschiedenen Versuchsanordnungen zur Untersuchung des Crawlingphänomens.
Abb. 8	Schematische Darstellung der Wirkung von Pertussistoxin
Abb. 9	Zweiphotonenmikroskopische Aufnahmen eines crawlenden Neutrophilen Granulozyten in den Gefäßen einer C57BL/6-Wildtyp-Maus nach Applikation eines Anti-Gr-1-Antikörpers im Steady-State in Gefäßen des Ohrs
Abb. 10	Vorbereitende Präparation und Versuchsaufbau
Abb. 11	Prinzip der Zweiphotonenmikroskopie dargestellt anhand eines modifizierten und vereinfachten Jablonskidiagramms
Abb. 12	Schematischer Aufbau eines Zweiphotonenmikroskops
Abb. 13	Intravitalmikroskopische Aufnahme des murinen Ohrs mittels Zweiphotonenmikroskopie, Definition der Bewegungsfelder
Abb. 14	Single-Cell-Tracking-Protokoll mit den zugehörigen intravitalmikroskopischen Aufnahmen
Abb. 15	Schema der verschiedenen Bewegungsformen des Crawlings
Abb. 16	Zweiphotonenmikroskopische Aufnahmen eines crawlenden Monozyten im <i>Steady-State</i> in einem Ohrgefäß einer Cx3CR1 eGFP/+ Maus
Abb. 17	Zweiphotonenmikroskopische Aufnahmen im <i>Steady-State</i> in einem Ohrgefäß einer LysMeGFP/eGFP Maus
Abb. 18	Zweiphotonenmikroskopische Aufnahmen im <i>Steady-State</i> in einem Ohrgefäß einer <i>T-red-high</i> Maus
Abb. 19	Unterschiede im Crawling zwischen Monozyten und Neutrophilen Granulozyten unter <i>Steady-State</i> -Bedingungen
Abb. 20	Anzahl und Geschwindigkeit crawlender Leukozyten im Vergleich
Abb. 21	Vergleich von Crawlingrichtung und Crawlingmuster im <i>Steady-State</i>
Abb. 22	Vergleich des Crawlingverhaltens der leukozytären Subpopulationen in postkapillären Venolen bei Färbung mit Anti-Gr-1
Abb. 23	Vergleich des leukozytären Crawlingverhaltens in postkapillären Venolen bei Modifizierungen des Versuchsaufbaus ohne zusätzliche Entzündunginduktion via KC
Abb. 24	Phototoxische Schädigung, Zweiphotonenmikroskopie einer postkapillären Venole einer LysM eGFP/eGFP Maus
Abb. 25	Überprüfung der KC-Wirkung durch die Gabe von Pertussistoxin
Abb. 26	Vergleich der Anzahl crawlender Leukozyten zwischen <i>Steady-State</i> und KC-induzierte Entzündung

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 27 Gegenüberstellung von Crawlingrichtung und -muster im unstimulierten *Steady-State* und während einer KC-induzierten Entzündung
-
- Abb. 28 Analyse der Crawlinggeschwindigkeiten nach Antikörperapplikation (CD11a) im Vergleich zur Kontrollgruppe
-
- Abb. 29 Ablösender Effekt von CD11a auf crawlende Leukozyten
-
- Abb. 30 Vergleich der Crawlinggeschwindigkeiten von Leukozyten abhängig von ihrer Zuordnung zur entsprechenden *shear*-Gruppe
-
- Abb. 31 Zweiphotonenmikroskopische Aufnahmen und Beispieltracks crawlender Monozyten der Versuche mit CD11a-blockierenden Antikörpern, *Steady-State*
-
- Abb. 32 Effekt von Anti-CD11a auf das Crawlingverhalten von Leukozyten abhängig von der Scherrate
-
- Abb. 33 Darstellung des Verhaltens von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten nach Anti-CD11b-Applikation in Bezug auf eine mögliche Ablösung nach Antikörpergabe
-
- Abb. 34 Analyse der Crawlinggeschwindigkeit nach Antikörperapplikation (CD11b) im Vergleich zur Kontrollgruppe
-
- Abb. 35 Zweiphotonenmikroskopische Bilder eines crawlenden Monozyten in einer postkapillären Venolen einer CX3CR1 eGFP/+ Maus unter *Steady-State*-Bedingungen vor, während und nach Injektion des blockierenden Antikörpers gegen CD11b
-
- Abb. 36 Wirkung von Anti-CD11b auf crawlende Leukozyten in Bezug auf einen Richtungswechsel abhängig von ihrer ursprünglichen Bewegungsrichtung zum Blutfluss
-
- Abb. 37 Wirkung von Anti-CD11b auf gegen den Blutfluss crawlende Leukozyten abhängig von der auftretende Scherrate
-
- Abb. 38 Intravitalmikroskopische Aufnahme eines crawlenden Monozyten in einer CX3CR1 eGFP/+ Maus im *Steady-State* vor, während und nach Applikation des Anti-CD54-Antikörpers
-
- Abb. 39 Mikroskopische Prinzipien, Epiillumination/Transillumination
-
- Abb. 40 Schema RLOT-Mikroskopie
-
- Abb. 41 Schema Konfokalmikroskopie

B Tabellen

Tab. 1	Rolle leukozytärer Subpopulationen bei entzündlichen Prozessen
Tab. 2	Selektine, ihre Liganden und ihre Funktion im Rahmen der Leukozytenmigration
Tab. 3	Integrine und endotheliale Verbindungsmoleküle mit jeweiligen Liganden
Tab. 4	Auflistung verwendeter Reagentien
Tab. 5	Auflistung verwendeter Reagentien in Zusammenhang mit der Entzündungsinduktion
Tab. 6	Auflistung verwendeter Antikörper
Tab. 7	Auflistung verwendeter Materialien, Geräte und Programme
Tab. 8	Einteilung in Versuchsgruppen
Tab. 9	Mikrohämodynamische Parameter aller mittels AK durchgeführten Versuche mit CX3CR1 eGFP/+ im <i>Steady-State</i> und LysM eGFP Tieren im Rahmen einer KC-induzierten Entzündung
Tab. 10	Crawlingparameter der durchgeführten Versuche mit CX3CR1 eGFP/+ und LysM eGFP/eGFP Tieren und Anti-CD11a-Antikörpern in Gegenüberstellung mit den Kontrollen
Tab. 11	Crawlingparameter der durchgeführten Versuche mit CX3CR1 eGFP/+ und LysM eGFP/eGFP Tieren und Anti-CD11b-Antikörpern in Gegenüberstellung mit den Kontrollen
Tab. 12	Crawlingparameter der durchgeführten Versuche mit CX3CR1 eGFP/+ und LysM eGFP/eGFP Tieren und Anti-CD54-Antikörpern in Gegenüberstellung mit den Kontrollen

LITERATURVERZEICHNIS

LITERATURVERZEICHNIS

ABRAM, C. L. & LOWELL, C. A. 2009. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol*, 27, 339-62.

AFFYMETRIXEBIOSCIENCE. 2014.

·AFFYMETRIXEBIOSCIENCE. 2014. *Affymetrix ebioscience Anti-Mouse IgG2a FITC* [Online]. Available: <http://www.ebioscience.com/mouse-igg2a-antibody-m2a-15f8-fitc.htm> [Accessed 16.9.2014 20:46].

·AFFYMETRIXEBIOSCIENCE. 2014. *Anti-Human CD62E (E-Selectin) PE* [Online]. Available: <http://www.ebioscience.com/human-cd62e-antibody-pe-p2h3.htm> [Accessed 27.06.2014 9:38].

·AFFYMETRIXEBIOSCIENCE. 2014. *Anti-Human CD62L (L-Selectin) APC* [Online]. Available: <http://www.ebioscience.com/human-cd62l-l-selectin-antibody-apc-dreg-56.htm> [Accessed 27.6.2014 9:37].

·AFFYMETRIXEBIOSCIENCE. 2014. *Anti-Mouse CD62P (P-Selectin) Functional Grade Purified* [Online]. Available: <http://www.ebioscience.com/mouse-cd62p-antibody-fg-purified-pselko212.htm> [Accessed 30.6.2014 12:12].

·AFFYMETRIXEBIOSCIENCE. 2014. *Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Purified* [Online]. Available: <http://www.ebioscience.com/mouse-ly-6g-antibody-purified-rb6-8c5.htm> [Accessed 25.06.2014 14:04].

ALLPORT, J. R., MULLER, W. A. & LUSCINSKAS, F. W. 2000. Monocytes induce reversible focal changes in vascular endothelial cadherin complex during transendothelial migration under flow. *J Cell Biol*, 148, 203-16.

ALON, R. & FEIGELSON, S. W. 2009. Chemokine signaling to lymphocyte integrins under shear flow. *Microcirculation*, 16, 3-16.

ALON, R. & LEY, K. 2008. Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 525-32.

ALON, R. & SHULMAN, Z. 2011. Chemokine triggered integrin activation and actin remodeling events guiding lymphocyte migration across vascular barriers. *Exp Cell Res*, 317, 632-41.

ALVES, H. C., VALENTIM, A. M., OLSSON, I. A. & ANTUNES, L. M. 2009. Intraperitoneal anaesthesia with propofol, medetomidine and fentanyl in mice. *Lab Anim*, 43, 27-33.

ANDERSON, D. C., SCHMALSTEIG, F. C., FINEGOLD, M. J., HUGHES, B. J., ROTHLEIN, R., MILLER, L. J., KOHL, S., TOSI, M. F., JACOBS, R. L. & WALDROP, T. C. E. A. 1985. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis*, 152, 668-89.

ANDERSON, D. C. & SPRINGER, T. A. 1987. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med*, 38, 175-94.

LITERATURVERZEICHNIS

- ANDREASEN, C. & CARBONETTI, N. H. 2008. Pertussis toxin inhibits early chemokine production to delay neutrophil recruitment in response to *Bordetella pertussis* respiratory tract infection in mice. *Infect Immun*, 76, 5139-48.
- ANTOINE, R., RAZE, D. & LOCHT, C. 2000. Genomics of *Bordetella pertussis* toxins. *Int J Med Microbiol*, 290, 301-5.
- APPLEBY, L. J., NAUSCH, N., MIDZI, N., MDULUZA, T., ALLEN, J. E. & MUTAPI, F. 2013. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunol Lett*, 152, 32-41.
- AUFFRAY, C., FOGG, D., GARFA, M., ELAIN, G., JOIN-LAMBERT, O., KAYAL, S., SARNACKI, S., CUMANO, A., LAUVAU, G. & GEISSMANN, F. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, 317, 666-70.
- AUFFRAY, C., FOGG, D. K., NARNI-MANCINELLI, E., SENECHAL, B., TROUILLET, C., SAEDERUP, N., LEEMPUT, J., BIGOT, K., CAMPISI, L., ABITBOL, M., MOLINA, T., CHARO, I., HUME, D. A., CUMANO, A., LAUVAU, G. & GEISSMANN, F. 2009a. CX3CR1⁺ CD115⁺ CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med*, 206, 595-606.
- AUFFRAY, C., SIEWEKE, M. H. & GEISSMANN, F. 2009b. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 27, 669-92.
- AUMÜLLER, G., AUST, G. & DOLL, A. (eds.) 2010. *Anatomie, Thieme, Stuttgart*.
·Herz-Kreislauf-System-Grundlagen, Teil B Einführung in funktionelle Systeme, Kap. 1; Engele, J.; pp 112-132;
·Blut und Lymphatische Organe- Grundlagen, Teil B Einführung in funktionelle Systeme, Kap. 2, ; Aust, G.; pp 133-159;
- AUSTYN, J. M. & GORDON, S. 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*, 11, 805-15.
- BAGGIOLINI, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392, 565-8.
- BALKE, H. 2010; Springer. *Einführung in die technische Mechanik, p.7*.
- BARBALAT, R., LAU, L., LOCKSLEY, R. M. & BARTON, G. M. 2009. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol*, 10, 1200-7.
- BARREIRO, O., DE LA FUENTE, H., MITTELBRUNN, M. & SANCHEZ-MADRID, F. 2007. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev*, 218, 147-64.
- BASTIAANSE, J., NANHEKHAN, L. V., SLAAF, D. W., BOECKX, W. D. & OUDE EGBRINK, M. G. 2006. Preservation of rat cremaster muscle microcirculation after prolonged cold storage and transplantation. *J Surg Res*, 131, 41-8.

LITERATURVERZEICHNIS

- BAYER, N., SCHOBER, D., PRCHLA, E., MURPHY, R. F., BLAAS, D. & FUCHS, R. 1998. Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J Virol*, 72, 9645-55.
- BECKER, S. & QUAY, J. K., H.S. ; HASKILL, J.S. ; 1994. Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am J Physiol*, 266, L278-86.
- BENINGHOFF, A. & DRENCKHAHN, D. 2003 . *Anatomie Band 1&2, Urban&Schwarzenberg München*.
·Zellenlehre, Band 1, Kap. 2; Drenckhahn, D.; pp 9-91;
·Allgemeine Gewebelehre, Band 1, Kap. 3; Drenckhahn, D.; pp 93-297;
·Herz-Kreislauf-System, Band 2, Kap. 9; Drenckhahn, D.; pp 1-139;
·Lymphatisches System, Band 2, Kap. 10; Steininger, B.; pp 141-184;
- BERLIN, C., BERG, E. L., BRISKIN, M. J., ANDREW, D. P., KILSHAW, P. J., HOLZMANN, B., WEISSMAN, I. L., HAMANN, A. & BUTCHER, E. C. 1993. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*, 74, 185-95.
- BESTEBROER, J., DE HAAS, C. J. & VAN STRIJP, J. A. 2010. How microorganisms avoid phagocyte attraction. *FEMS Microbiol Rev*, 34, 395-414.
- BILLADEAU, D. D. 2008. PTEN gives neutrophils direction. *Nat Immunol*, 9, 716-8.
- BISHOP, D. K. 1994. RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell*, 79, 1081-92.
- BIXEL, G., KLOEP, S., BUTZ, S., PETRI, B., ENGELHARDT, B. & VESTWEBER, D. 2004. Mouse CD99 participates in T-cell recruitment into inflamed skin. *Blood*, 104, 3205-13.
- BIXEL, M. G., PETRI, B., KHANDOGA, A. G., KHANDOGA, A., WOLBURG-BUCHHOLZ, K., WOLBURG, H., MARZ, S., KROMBACH, F. & VESTWEBER, D. 2007. A CD99-related antigen on endothelial cells mediates neutrophil but not lymphocyte extravasation in vivo. *Blood*, 109, 5327-36.
- BÖCKER, W., DENK, H. & HEITZ, P. U. (eds.) 2004 *Pathologie, Urban&Fischer, München, Jena*.
·Zell- und Gewebereaktionen, Kap. 2; Krankheitsmechanismen; Zatloukal, K.; Roth, J.; Denk, H.; pp 39-76;
·Entzündung, Kap. 3; Krankheitsmechanismen; Herbst, H., Böcker, W., Denk, H. Heitz, Ph. U.; pp 77-111;
·Grundlagen der Immunreaktionen, Kap. 4; Krankheitsmechanismen; Merz, H., Feller, A. C.; pp 112- 146;
·Allgemeine Kreislaufpathologie, Kap. 7; Krankheitsmechanismen; Bültmann, B. D., Schmid, K.-W., Kirkpatrick, C. J.; pp 219-248;
·Gefäße, Kap. 20; Klinische Pathologie; Baretton, G. B., Kirkpatrick, C. J., Bültmann, B. D.; pp 481-508;

LITERATURVERZEICHNIS

- BOROS, M., MASSBERG, S., BARANYI, L., OKADA, H. & MESSMER, K. 1998. Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine. *Gastroenterology*, 114, 103-14.
- BOSCACCI, R. T., PFEIFFER, F., GOLLMER, K., SEVILLA, A. I., MARTIN, A. M., SORIANO, S. F., NATALE, D., HENRICKSON, S., VON ANDRIAN, U. H., FUKUI, Y., MELLADO, M., DEUTSCH, U., ENGELHARDT, B. & STEIN, J. V. 2010. Comprehensive analysis of lymph node stroma-expressed Ig superfamily members reveals redundant and nonredundant roles for ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in lymphocyte homing. *Blood*, 116, 915-25.
- BOURDI, M., DAVIES, J. S. & POHL, L. R. 2011. Mispairing C57BL/6 substrains of genetically engineered mice and wild-type controls can lead to confounding results as it did in studies of JNK2 in acetaminophen and concanavalin A liver injury. *Chem Res Toxicol*, 24, 794-6.
- BOWEN, T. J., OCHS, H. D., ALTMAN, L. C., PRICE, T. H., VAN EPPS, D. E., BRAUTIGAN, D. L., ROSIN, R. E., PERKINS, W. D., BABIOR, B. M., KLEBANOFF, S. J. & WEDGWOOD, R. J. 1982. Severe recurrent bacterial infections associated with defective adherence and chemotaxis in two patients with neutrophils deficient in a cell-associated glycoprotein. *J Pediatr*, 101, 932-40.
- BOZEMAN, P. M., LEARN, D. B. & THOMAS, E. L. 1990. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *J Immunol Methods*, 126, 125-33.
- BRADFIELD, P. F., NOURSHARGH, S., AURRAND-LIONS, M. & IMHOF, B. A. 2007. JAM family and related proteins in leukocyte migration (Vestweber series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 2104-12.
- BRANCATO, S. K. & ALBINA, J. E. 2011. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am J Pathol*, 178, 19-25.
- BRISTOL UNIVERSITY. 2014. *Bristol University Centre for Synaptic Plasticity Multiphoton microscopy* [Online]. Available: <http://www.bristol.ac.uk/synaptic/research/techniques/multiphoton.html> [Accessed 27.6.2014 10:16].
- BURNS, A. R., BOWDEN, R. A., MACDONELL, S. D., WALKER, D. C., ODEBUNMI, T. O., DONNACHIE, E. M., SIMON, S. I., ENTMAN, M. L. & SMITH, C. W. 2000. Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci*, 113 (Pt 1), 45-57.
- BURNS, A. R., WALKER, D. C., BROWN, E. S., THURMON, L. T., BOWDEN, R. A., KEESE, C. R., SIMON, S. I., ENTMAN, M. L. & SMITH, C. W. 1997. Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J Immunol*, 159, 2893-903.
- BUTCHER, E. C. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67, 1033-6.

LITERATURVERZEICHNIS

- CAHALAN, M. D., PARKER, I., WEI, S. H. & MILLER, M. J. 2002. Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nat Rev Immunol*, 2, 872-80.
- CAMPAGNOLA, P. J. & LOEW, L. M. 2003. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nat Biotechnol*, 21, 1356-60.
- CAMPAGNOLA, P. J., MILLARD, A. C., TERASAKI, M., HOPPE, P. E., MALONE, C. J. & MOHLER, W. A. 2002. Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophys J*, 82, 493-508.
- CARA, D. C., KAUR, J., FORSTER, M., MCCAFFERTY, D. M. & KUBES, P. 2001. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in chemokine-induced emigration and chemotaxis in vivo. *J Immunol*, 167, 6552-8.
- CARLIN, L. M., AUFRAY, C. & GEISSMANN, F. 2013. Measuring intravascular migration of mouse Ly6C(low) monocytes in vivo using intravital microscopy. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 14, Unit 14 33 1-16.
- CARMAN, C. V., SAGE, P. T., SCIUTO, T. E., DE LA FUENTE, M. A., GEHA, R. S., OCHS, H. D., DVORAK, H. F., DVORAK, A. M. & SPRINGER, T. A. 2007. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity*, 26, 784-97.
- CARMAN, C. V. & SPRINGER, T. A. 2004. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol*, 167, 377-88.
- CAROLLO, M., HOGABOAM, C. M., KUNKEL, S. L., DELANEY, S., CHRISTIE, M. I. & PERRETTI, M. 2001. Analysis of the temporal expression of chemokines and chemokine receptors during experimental granulomatous inflammation: role and expression of MIP-1alpha and MCP-1. *Br J Pharmacol*, 134, 1166-79.
- CASWELL, P. T., VADREVU, S. & NORMAN, J. C. 2009. Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 843-53.
- CERA, M. R., FABBRI, M., MOLENDINI, C., CORADA, M., ORSENIGO, F., REHBERG, M., REICHEL, C. A., KROMBACH, F., PARDI, R. & DEJANA, E. 2009. JAM-A promotes neutrophil chemotaxis by controlling integrin internalization and recycling. *J Cell Sci*, 122, 268-77.
- CHANG, T. W., CELIS, E., EISEN, H. N. & SOLOMON, F. 1979. Crawling movements of lymphocytes on and beneath fibroblasts in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 2917-21.
- CHEN, L. Y., PAN, W. W., CHEN, M., LI, J. D., LIU, W., CHEN, G., HUANG, S., PAPADIMOS, T. J. & PAN, Z. K. 2009. Synergistic induction of inflammation by bacterial products lipopolysaccharide and fMLP: an important microbial pathogenic mechanism. *J Immunol*, 182, 2518-24.

LITERATURVERZEICHNIS

- CHINTAKUNTLAWAR, A. V. & CHODOSH, J. 2009. Chemokine CXCL1/KC and its receptor CXCR2 are responsible for neutrophil chemotaxis in adenoviral keratitis. *J Interferon Cytokine Res*, 29, 657-66.
- CHOSAY, J. G., FISHER, M. A., FARHOOD, A., READY, K. A., DUNN, C. J. & JAESCHKE, H. 1998. Role of PECAM-1 (CD31) in neutrophil transmigration in murine models of liver and peritoneal inflammation. *Am J Physiol*, 274, G776-82
- CHTANOVA, T., SCHAEFFER, M., HAN, S. J., VAN DOOREN, G. G., NOLLMANN, M., HERZMARK, P., CHAN, S. W., SATIJA, H., CAMFIELD, K., AARON, H., STRIEPEN, B. & ROBEY, E. A. 2008. Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity*, 29, 487-96.
- CINAMON, G., SHINDER, V. & ALON, R. 2001. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat Immunol*, 2, 515-22.
- CINAMON, G., SHINDER, V., SHAMRI, R. & ALON, R. 2004. Chemoattractant signals and beta 2 integrin occupancy at apical endothelial contacts combine with shear stress signals to promote transendothelial neutrophil migration. *J Immunol*, 173, 7282-91.
- COLDITZ, I. G., SCHNEIDER, M. A., PRUENSTER, M. & ROT, A. 2007. Chemokines at large: in-vivo mechanisms of their transport, presentation and clearance. *Thromb Haemost*, 97, 688-93.
- COLEMAN, W. B. & TSONGALIS, G. J., (eds.) 2009., *Molecular Pathology , The Molecular Basis of Human disease, Academic Press, Burlington, San Diego, London*
·Acute and chronic inflammation induces disease pathogenesis, Chapter 2, Dolgachev, V., Lucacs, N. W., pp 25-40
·Infection and host response, Chapter 3, Oethinger, M. D., Campbell, S. M., pp 41-62
- COONS, A. H. C., H.J.; JONES, R. N.; 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med*, 47, 200-202.
- CORADA, M., ZANETTA, L., ORSENIGO, F., BREVIARIO, F., LAMPUGNANI, M. G., BERNASCONI, S., LIAO, F., HICKLIN, D. J., BOHLEN, P. & DEJANA, E. 2002. A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood*, 100, 905-11.
- COX, G. 2007. *Optical imaging techniques in Cell Biology; CRC Press, Taylor &Francis Group, Boca Raton.*
·*Nonlinear microscopy, Kapitel 8: pp 101-114*
- CRUCIAN, B., NELMAN-GONZALEZ, M. & SAMS, C. 2006. Rapid flow cytometry method for quantitation of LFA-1-adhesive T cells. *Clin Vaccine Immunol*, 13, 403-8.
- CUVELIER, S. L. & PATEL, K. D. 2001. Shear-dependent eosinophil transmigration on interleukin 4-stimulated endothelial cells: a role for endothelium-associated eotaxin-3. *J Exp Med*, 194, 1699-709.

LITERATURVERZEICHNIS

- DANGERFIELD, J., LARBI, K. Y., HUANG, M. T., DEWAR, A. & NOURSHARGH, S. 2002. PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *J Exp Med*, 196, 1201-11.
- DEJANA, E. 2004. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 261-70.
- DENK, W., STRICKLER, J. H. & WEBB, W. W. 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248, 73-6.
- DIASPRO, A., BIANCHINI, P., VICIDOMINI, G., FARETTA, M., RAMOINO, P. & USAI, C. 2006. Multi-photon excitation microscopy. *Biomed Eng Online*, 5, 36.
- DING, Y., ZHANG, Y., PENG, T., LU, Y., JIN, D., REN, Q., LIU, Y., HAN, J. & XI, P. 2013. Observation of mesenteric microcirculatory disturbance in rat by laser oblique scanning optical microscopy. *Sci Rep*, 3, 1762.
- DIRKSEN, E., PRESCOTT, D. M., FOX, C. E. (eds.) 1978, Cell Reproduction, Academic Press, London.
Advances in visualization of mitosis in vivo, Ellis, G. W., pp 465-476
- DIXIT, N., KIM, M. H., ROSSAINT, J., YAMAYOSHI, I., ZARBOCK, A. & SIMON, S. I. 2012. Leukocyte function antigen-1, kindlin-3, and calcium flux orchestrate neutrophil recruitment during inflammation. *J Immunol*, 189, 5954-64.
- DOERSCHUK, C. M. 2001. Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. *Microcirculation*, 8, 71-88.
- DROBIZHEV, M., MAKAROV, N. S., TILLO, S. E., HUGHES, T. E. & REBANE, A. 2011. Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nat Methods*, 8, 393-9.
- DUNAY, I. R., DAMATTA, R. A., FUX, B., PRESTI, R., GRECO, S., COLONNA, M. & SIBLEY, L. D. 2008. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity*, 29, 306-17.
- DUNNE, J. L., COLLINS, R. G., BEAUDET, A. L., BALLANTYNE, C. M. & LEY, K. 2003. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol*, 171, 6105-11.
- EGELMAN, E. (ed.), 2012, *Handbook of Comprehensive Biophysics*, Academic Press, Amsterdam
Chapter Confocal microscopy, Amos, B., McConnell, G., Wilson, T.
- EGGER, G. 2005. *Die akute Entzündung, Teil 2 Die Pathophysiologie der Entzündung*, Springer, Wien, New York.
·Regulation der Entzündung, Kap.1, pp 19-138
·Zellen der unspezifischen Abwehr, Kap. 2, pp 139-236

LITERATURVERZEICHNIS

- FABBRI, M., DI MEGLIO, S., GAGLIANI, M. C., CONSONNI, E., MOLTENI, R., BENDER, J. R., TACCHETTI, C. & PARDI, R. 2005. Dynamic partitioning into lipid rafts controls the endo-exocytic cycle of the alphaL/beta2 integrin, LFA-1, during leukocyte chemotaxis. *Mol Biol Cell*, 16, 5793-803.
- FAN, C., WANG, W., ZHAO, B., ZHANG, S. & MIAO, J. 2006. Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells. *Bioorg Med Chem*, 14, 3218-22.
- FAUST, N., VARAS, F., KELLY, L. M., HECK, S. & GRAF, T. 2000. Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood*, 96, 719-26.
- FELDMAN, G. J., MULLIN, J. M. & RYAN, M. P. 2005. Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 883-917.
- FENG, D., NAGY, J. A., PYNE, K., DVORAK, H. F. & DVORAK, A. M. 1998. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med*, 187, 903-15.
- FERNANDEZ, E. J. & LOLIS, E. 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 469-99.
- FIEBIG, E., LEY, K. & ARFORS, K. E. 1991. Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int J Microcirc Clin Exp*, 10, 127-44.
- FINGER, E. B., PURI, K. D., ALON, R., LAWRENCE, M. B., VON ANDRIAN, U. H. & SPRINGER, T. A. 1996. Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear. *Nature*, 379, 266-9.
- FRIDLENDER, Z. G., SUN, J., KIM, S., KAPOOR, V., CHENG, G., LING, L., WORTHEN, G. S. & ALBELDA, S. M. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 16, 183-94.
- FRIEDL, P., WOLF, K., VON ANDRIAN, U. H. & HARMS, G. 2007. Biological second and third harmonic generation microscopy. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 4, Unit 4 15.
- FRIEDL, P. & WEIGELIN, B. 2008. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol*, 9, 960-9.
- FROMMHOLD, D., KAMPHUES, A., DANNENBERG, S., BUSCHMANN, K., ZABLOTSKAYA, V., TSCHADA, R., LANGE-SPERANDIO, B., NAWROTH, P. P., POESCHL, J., BIERHAUS, A. & SPERANDIO, M. 2011. RAGE and ICAM-1 differentially control leukocyte recruitment during acute inflammation in a stimulus-dependent manner. *BMC Immunol*, 12, 56.
- FROMMHOLD, D., KAMPHUES, A., HEPPER, I., PRUENSTER, M., LUKIC, I. K., SOCHER, I., ZABLOTSKAYA, V., BUSCHMANN, K., LANGE-SPERANDIO, B., SCHYMEINSKY, J., RYSCHICH, E., POESCHL, J., KUPATT, C., NAWROTH, P. P., MOSER, M., WALZOG, B., BIERHAUS, A. & SPERANDIO, M. 2010. RAGE

LITERATURVERZEICHNIS

- and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo. *Blood*, 116, 841-9.
- FRIES RESEARCH & TECHNOLOGY, 2014, FRT-GMBH, F. 2014.
Konfokale Mikroskopie Oberflächen messen mit dem Konfokalmikroskop [Online]. Available: <http://www.konfokalmikroskop.de/konfokalmikroskop.aspx> [Accessed 30.6.2014 13.11].
- FURUSE, M., HIRASE, T., ITOH, M., NAGAFUCHI, A., YONEMURA, S. & TSUKITA, S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, 123, 1777-88.
- GABOURY, J. P., NIU, X. F. & KUBES, P. 1996. Nitric oxide inhibits numerous features of mast cell-induced inflammation. *Circulation*, 93, 318-26.
- GALKINA, E. & LEY, K. 2009. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol*, 27, 165-97.
- GAZIT, R., RECHNITZER, H., ACHDOUT, H., KATZENELL, A., KATZ, G., MARKEL, G., ARNON, T. I., GONEN-GROSS, T., MIZRAHI, S., GRUDA, R., ROTTEM, S. & MANDELBOIM, O. 2004. Recognition of Mycoplasma hyorhinis by CD99-Fc molecule. *Eur J Immunol*, 34, 2032-40.
- GEISSMANN, F., AUFRAY, C., PALFRAMAN, R., WIRRIK, C., CIOCCA, A., CAMPISI, L., NARNI-MANCINELLI, E. & LAUVAU, G. 2008. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol*, 86, 398-408.
- GEISSMANN, F., JUNG, S. & LITTMAN, D. R. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19, 71-82.
- GEISSMANN, F., MANZ, M. G., JUNG, S., SIEWEKE, M. H., MERAD, M. & LEY, K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327, 656-61.
- GERICKE, K.-H. 2014. *Technische Universität Braunschweig Institut für physikalische und theoretische Chemie Grundlagen: Zweiphotonenmikroskopie @ TU Braunschweig* [Online]. Available: <https://www.tu-braunschweig.de/pci/forschung/gericke/forschung/multiphotonen/zweiphotonen/index.html> [Accessed 25.6.2014 13:35].
- GESUNDHEITSBERICHTERSTATTUNGDES BUNDES. 2015. *Sterbeziffer, Häufigste Todesursachen* [Online]. Available: https://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_FORMPROC?TARGET=&PAGE=_XWD_2&OPINDEX=1&HANDLER=XS_ROTATE_ADVANCED&DATACUBE=_XWD_30&D.000=PAGE&D.001=PAGE&D.002=PAGE&D.003=PAGE&D.004=PAGE&D.954=DOWN&D.011=PAGE&D.100=ACROSS [Accessed 1.3.2015 21:35].
- GLASS, W. G., ROSENBERG, H. F. & MURPHY, P. M. 2003. Chemokine regulation of inflammation during acute viral infection. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3, 467-73.

LITERATURVERZEICHNIS

- GONZALEZ, A. P., SEPULVEDA, S., MASSBERG, S., BAUMEISTER, R. & MENGER, M. D. 1994. In vivo fluorescence microscopy for the assessment of microvascular reperfusion injury in small bowel transplants in rats. *Transplantation*, 58, 403-8.
- GÖPPERT-MAYER, M. 1931. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys*, 9, 273-95.
- GORDON, S. & TAYLOR, P. R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5, 953-64.
- GRAFF, G., GAMACHE, D. A., BRADY, M. T., SPELLMAN, J. M. & YANNI, J. M. 1998. Improved myeloperoxidase assay for quantitation of neutrophil influx in a rat model of endotoxin-induced uveitis. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 39, 169-78.
- GRANGER, D. N. & KUBES, P. 1994. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*, 55, 662-75.
- GREEN, C. E., SCHAFF, U. Y., SARANTOS, M. R., LUM, A. F., STAUNTON, D. E. & SIMON, S. I. 2006. Dynamic shifts in LFA-1 affinity regulate neutrophil rolling, arrest, and transmigration on inflamed endothelium. *Blood*, 107, 2101-11.
- HALAI, K., WHITEFORD, J., MA, B., NOURSHARGH, S. & WOODFIN, A. 2014. ICAM-2 facilitates luminal interactions between neutrophils and endothelial cells in vivo. *J Cell Sci*, 127, 620-9.
- HASEGAWA, M., SATO, S., ECHIGO, T., HAMAGUCHI, Y., YASUI, M. & TAKEHARA, K. 2005. Up regulated expression of fractalkine/CX3CL1 and CX3CR1 in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*, 64, 21-8.
- HASKILL, S., PEACE, A., MORRIS, J., SPORN, S. A., ANISOWICZ, A., LEE, S. W., SMITH, T., MARTIN, G., RALPH, P. & SAGER, R. 1990. Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 7732-6.
- HEIDT, T., SAGER, H. B., COURTIÉS, G., DUTTA, P., IWAMOTO, Y., ZALTSMAN, A., VON ZUR MUHLEN, C., BODE, C., FRICCHIONE, G. L., DENNINGER, J., LIN, C. P., VINEGONI, C., LIBBY, P., SWIRSKI, F. K., WEISSLEDER, R. & NAHRENDORF, M. 2014. Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 20, 754-8.
- HEIFETS, L. 1982. Centennial of Metchnikoff's discovery. *J Reticuloendothel Soc*, 31, 381-91.
- HEIT, B., ROBBINS, S. M., DOWNEY, C. M., GUAN, Z., COLARUSSO, P., MILLER, B. J., JIRIK, F. R. & KUBES, P. 2008. PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nat Immunol*, 9, 743-52.
- HELMCHEN, F. & DENK, W. 2005. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*, 2, 932-40.

LITERATURVERZEICHNIS

- HENDERSON, R. B., HOBBS, J. A., MATHIES, M. & HOGG, N. 2003. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood*, 102, 328-35.
- HEPPER, I., SCHYMEINSKY, J., WECKBACH, L. T., JAKOB, S. M., FROMMHOLD, D., SIXT, M., LASCHINGER, M., SPERANDIO, M. & WALZOG, B. 2012. The mammalian actin-binding protein 1 is critical for spreading and intraluminal crawling of neutrophils under flow conditions. *J Immunol*, 188, 4590-601.
- HERTER, J. M., ROSSAINT, J., BLOCK, H., WELCH, H. & ZARBOCK, A. 2013. Integrin activation by P-Rex1 is required for selectin-mediated slow leukocyte rolling and intravascular crawling. *Blood*, 121, 2301-10.
- HICKEY, M. J. & KUBES, P. 2009. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat Rev Immunol*, 9, 364-75.
- HIDALGO, A., CHANG, J., JANG, J. E., PEIRED, A. J., CHIANG, E. Y. & FRENETTE, P. S. 2009. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nat Med*, 15, 384-91.
- HIDALGO, A. & FRENETTE, P. S. 2009. When integrins fail to integrate. *Nat Med*, 15, 249-50.
- HIDALGO, A., PEIRED, A. J., WILD, M. K., VESTWEBER, D. & FRENETTE, P. S. 2007. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*, 26, 477-89.
- HOFFMANN, T. F., LEIDERER, R., WALDNER, H., ARBOGAST, S. & MESSMER, K. 1995. Ischemia reperfusion of the pancreas: a new in vivo model for acute pancreatitis in rats. *Res Exp Med (Berl)*, 195, 125-44.
- HOL, J., WILHELMSSEN, L. & HARALDSEN, G. 2010. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *J Leukoc Biol*, 87, 501-8.
- HU, P. & LUO, B. H. 2013. Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane. *J Cell Physiol*, 228, 306-12.
- HUANG, A. J., FURIE, M. B., NICHOLSON, S. C., FISCHBARG, J., LIEBOVITCH, L. S. & SILVERSTEIN, S. C. 1988. Effects of human neutrophil chemotaxis across human endothelial cell monolayers on the permeability of these monolayers to ions and macromolecules. *J Cell Physiol*, 135, 355-66.
- HUANG, M. T., LARBI, K. Y., SCHEIERMANN, C., WOODFIN, A., GERWIN, N., HASKARD, D. O. & NOURSHARGH, S. 2006. ICAM-2 mediates neutrophil transmigration in vivo: evidence for stimulus specificity and a role in PECAM-1-independent transmigration. *Blood*, 107, 4721-7.

LITERATURVERZEICHNIS

- HUO, Y., WEBER, C., FORLOW, S. B., SPERANDIO, M., THATTE, J., MACK, M., JUNG, S., LITTMAN, D. R. & LEY, K. 2001. The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium. *J Clin Invest*, 108, 1307-14.
- HYDUK, S. J. & CYBULSKY, M. I. 2009. Role of alpha4beta1 integrins in chemokine-induced monocyte arrest under conditions of shear stress. *Microcirculation*, 16, 17-30.
- HYNES, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-87.
- HYUN, Y. M., CHUNG, H. L., MCGRATH, J. L., WAUGH, R. E. & KIM, M. 2009. Activated integrin VLA-4 localizes to the lamellipodia and mediates T cell migration on VCAM-1. *J Immunol*, 183, 359-69.
- IIDA, N. & GROTENDORST, G. R. 1990. Cloning and sequencing of a new gro transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. *Mol Cell Biol*, 10, 5596-9.
- IMAI, T., HIESHIMA, K., HASKELL, C., BABA, M., NAGIRA, M., NISHIMURA, M., KAKIZAKI, M., TAKAGI, S., NOMIYAMA, H., SCHALL, T. J. & YOSHIE, O. 1997. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*, 91, 521-30.
- IMHOF, B. A. & AURRAND-LIONS, M. 2004. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol*, 4, 432-44.
- IMHOF, B. A., WEERASINGHE, D., BROWN, E. J., LINDBERG, F. P., HAMMEL, P., PIALI, L., DESSING, M. & GISLER, R. 1997. Cross talk between alpha(v)beta3 and alpha4beta1 integrins regulates lymphocyte migration on vascular cell adhesion molecule 1. *Eur J Immunol*, 27, 3242-52.
- IQBAL, A. J., REGAN-KOMITO, D., CHRISTOU, I., WHITE, G. E., MCNEILL, E., KENYON, A., TAYLOR, L., KAPELLOS, T. S., FISHER, E. A., CHANNON, K. M. & GREAVES, D. R. 2013. A Real Time Chemotaxis Assay Unveils Unique Migratory Profiles amongst Different Primary Murine Macrophages. *PLoS One*, 8, e58744.
- ISSEKUTZ, T. B., ISSEKUTZ, A. C. & MOVAT, H. Z. 1981. The in vivo quantitation and kinetics of monocyte migration into acute inflammatory tissue. *Am J Pathol*, 103, 47-55.
- JACOBSON, P. B. & SCHRIER, D. J. 1993. Regulation of CD11b/CD18 expression in human neutrophils by phospholipase A2. *J Immunol*, 151, 5639-52.
- JAFFER, F. A. 2011. Intravital fluorescence microscopic molecular imaging of atherosclerosis. *Methods Mol Biol*, 680, 131-40.
- JOHNSTON, B., BURNS, A. R., SUEMATSU, M., ISSEKUTZ, T. B., WOODMAN, R. C. & KUBES, P. 1999. Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. *J Clin Invest*, 103, 1269-76.

LITERATURVERZEICHNIS

- JUNG, S., ALIBERTI, J., GRAEMMEL, P., SUNSHINE, M. J., KREUTZBERG, G. W., SHER, A. & LITTMAN, D. R. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*, 20, 4106-14.
- KAMRADT, A. E., GREINER, M., GHIARA, P. & KAUFMANN, S. H. 2000. Helicobacter pylori infection in wild-type and cytokine-deficient C57BL/6 and BALB/c mouse mutants. *Microbes Infect*, 2, 593-7.
- KAPLANSKI, G., FARNARIER, C., BENOLIEL, A. M., FOA, C., KAPLANSKI, S. & BONGRAND, P. 1994. A novel role for E- and P-selectins: shape control of endothelial cell monolayers. *J Cell Sci*, 107 (Pt 9), 2449-57.
- KAWAKAMI, R., SAWADA, K., SATO, A., HIBI, T., KOZAWA, Y., SATO, S., YOKOYAMA, H. & NEMOTO, T. 2013. Visualizing hippocampal neurons with in vivo two-photon microscopy using a 1030 nm picosecond pulse laser. *Sci Rep*, 3, 1014.
- KAWAMOTO, E., NAKAHASHI, S., OKAMOTO, T., IMAI, H. & SHIMAOKA, M. 2012. Anti-integrin therapy for multiple sclerosis. *Autoimmune Dis*, 2012, 357101.
- KAWAMURA, S., SCHURER, L., GOETZ, A., KEMPSKI, O., SCHMUCKER, B. & BAETHMANN, A. 1990. An improved closed cranial window technique for investigation of blood-brain barrier function and cerebral vasomotor control in the rat. *Int J Microcirc Clin Exp*, 9, 369-83.
- KAY, R. R., LANGRIDGE, P., TRAYNOR, D. & HOELLER, O. 2008. Changing directions in the study of chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 455-63.
- KESSELS, M. M., ENGQVIST-GOLDSTEIN, A. E. & DRUBIN, D. G. 2000. Association of mouse actin-binding protein 1 (mAbp1/SH3P7), an Src kinase target, with dynamic regions of the cortical actin cytoskeleton in response to Rac1 activation. *Mol Biol Cell*, 11, 393-412.
- KEZIC, J., XU, H., CHINNERY, H. R., MURPHY, C. C. & MCMENAMIN, P. G. 2008. Retinal microglia and uveal tract dendritic cells and macrophages are not CX3CR1 dependent in their recruitment and distribution in the young mouse eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 1599-608.
- KHANDOGA, A. G., KHANDOGA, A., REICHEL, C. A., BIHARI, P., REHBERG, M. & KROMBACH, F. 2009. In vivo imaging and quantitative analysis of leukocyte directional migration and polarization in inflamed tissue. *PLoS One*, 4, e4693.
- KIM, C., YE, F. & GINSBERG, M. H. 2011a. Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 321-45.
- KIM, K. W., VALLON-EBERHARD, A., ZIGMOND, E., FARACHE, J., SHEZEN, E., SHAKHAR, G., LUDWIG, A., LIRA, S. A. & JUNG, S. 2011b. In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood*, 118, e156-67.

LITERATURVERZEICHNIS

- KIM, M. B. & SARELIUS, I. H. 2004. Regulation of leukocyte recruitment by local wall shear rate and leukocyte delivery. *Microcirculation*, 11, 55-67.
- KLINKE, R., PAPE, H.-C. & SILBERNAGEL, S. 2005. Physiologie, Thieme, Stuttgart.
·Das Kreislaufsystem, Kap. 8; Gaetgens, P.; Ehmke, H.; pp 175- 222;
·Blut: Ein flüssiges Organsystem, Kap. 9; Bauer, C.; Walzog, B.; pp 223-254;.
- KOLACZKOWSKA, E. & KUBES, P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13, 159-75.
- KOZLOV, V. I. & BANIN, V. V. 1975. [Analysis of the structural parameters of the blood flow pathways in the microcirculatory system]. *Arkh Anat Gistol Embriol*, 69, 54-62.
- KREISEL, D., NAVA, R. G., LI, W., ZINSELMAYER, B. H., WANG, B., LAI, J., PLESS, R., GELMAN, A. E., KRUPNICK, A. S. & MILLER, M. J. 2010. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 18073-8.
- KRUKEMEYER, M. G. & SPIEGEL, H.-U. (eds.) 2005. *Chirurgische Forschung, Thieme, Stuttgart*.
Mikrozirkulationsforschung am Beispiel des Ischämie/Reperfusionsschadens der Leber; 1; Kap 5.3 Uhlmann, D.; Uhlmann, S.; Witzigmann, H.; pp 271-287.
- KUEBLER, W. M., KUHNLE, G. E., GROH, J. & GOETZ, A. E. 1994. Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J Appl Physiol (1985)*, 76, 65-71.
- KUPCZYK, M., BOCHENSKA-MARCINIAK, M., GORSKI, P. & KUNA, P. 2002. [Myeloperoxidase (MPO) as a marker of neutrophil influx into nasal mucosa after recombinant IL-8 challenge]. *Pneumonol Alergol Pol*, 70, 544-9.
- KUTUSHOV, M. & GORELIK, O. 2013. Low concentrations of Rhodamine-6G selectively destroy tumor cells and improve survival of melanoma transplanted mice. *Neoplasma*, 60, 262-73.
- KVIETYS, P. R. & SANDIG, M. 2001. Neutrophil diapedesis: paracellular or transcellular? *News Physiol Sci*, 16, 15-9.
- LARBOLETTE, O., WOLLSCHIED, B., SCHWEIKERT, J., NIELSEN, P. J. & WIENANDS, J. 1999. SH3P7 is a cytoskeleton adapter protein and is coupled to signal transduction from lymphocyte antigen receptors. *Mol Cell Biol*, 19, 1539-46.
- LAING, K. J. & SECOMBES, C. J. 2004. Chemokines. *Dev Comp Immunol*, 28, 443-60.
- LAMMERMANN, T., BADER, B. L., MONKLEY, S. J., WORBS, T., WEDLICH-SOLDNER, R., HIRSCH, K., KELLER, M., FORSTER, R., CRITCHLEY, D. R., FASSLER, R. & SIXT, M. 2008. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*, 453, 51-5.

LITERATURVERZEICHNIS

- LAURILA, J. P., LAATIKAINEN, L. E., CASTELLONE, M. D. & LAUKKANEN, M. O. 2009. SOD3 reduces inflammatory cell migration by regulating adhesion molecule and cytokine expression. *PLoS One*, 4, e5786.
- LAWRENCE, M. B., KANSAS, G. S., KUNKEL, E. J. & LEY, K. 1997. Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). *J Cell Biol*, 136, 717-27.
- LEAVY, O. 2012. Innate immunity: Multitasking NET makers. *Nat Rev Immunol*, 12, 684-5.
- LEBWOHL, M., TYRING, S. K., HAMILTON, T. K., TOTH, D., GLAZER, S., TAWFIK, N. H., WALICKE, P., DUMMER, W., WANG, X., GAROVOY, M. R., PARISER, D. & EFALIZUMAB STUDY, G. 2003. A novel targeted T-cell modulator, efalizumab, for plaque psoriasis. *N Engl J Med*, 349, 2004-13.
- LEE, J. Y., BUZNEY, C. D., POZNANSKY, M. C. & SACKSTEIN, R. 2009. Dynamic alterations in chemokine gradients induce transendothelial shuttling of human T cells under physiologic shear conditions. *J Leukoc Biol*, 86, 1285-94.
- LEFORT, C. T. & LEY, K. 2012. Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front Immunol*, 3, 157.
- LEHMANN, C., GEORGIEW, A., WEBER, M., BIRNBAUM, J. & KOX, W. J. 2001. Reduction in intestinal leukocyte adherence in rat experimental endotoxemia by treatment with the 21-aminosteroid U-74389G. *Intensive Care Med*, 27, 258-63.
- LEHMANN, J. C., JABLONSKI-WESTRICH, D., HAUBOLD, U., GUTIERREZ-RAMOS, J. C., SPRINGER, T. & HAMANN, A. 2003. Overlapping and selective roles of endothelial intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-2 in lymphocyte trafficking. *J Immunol*, 171, 2588-93.
- LEI, X., LAWRENCE, M. B. & DONG, C. 1999. Influence of cell deformation on leukocyte rolling adhesion in shear flow. *J Biomech Eng*, 121, 636-43.
- LEK, H. S., MORRISON, V. L., CONNEELY, M., CAMPBELL, P. A., MCGLOIN, D., KLICHE, S., WATTS, C., PRESCOTT, A. & FAGERHOLM, S. C. 2013. The spontaneously adhesive leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) integrin in effector T cells mediates rapid actin- and calmodulin-dependent adhesion strengthening to ligand under shear flow. *J Biol Chem*, 288, 14698-708.
- LEY 2007. To transmigrate or not to transmigrate *Blood*, 109, 5072-5073.
- LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M. I. & NOURSHARGH, S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7, 678-89.
- LEY, K., BAKER, J. B., CYBULSKY, M. I., GIMBRONE, M. A., JR. & LUSCINSKAS, F. W. 1993. Intravenous interleukin-8 inhibits granulocyte emigration from rabbit mesenteric venules without altering L-selectin expression or leukocyte rolling. *J Immunol*, 151, 6347-57.

LITERATURVERZEICHNIS

- LEY, K. & PARNHAM, M. J. (eds.) 2007. *Adhesion molecules: function and inhibition*, Birkhäuser Basel, Basel-Boston-Berlin.
- Endothelial ICAM-1 functions in adhesion and signalling during leukocyte recruitment, Kap. Firm adhesion, Auerbach, S. D., Yang, L., Luscinskas, F. W., pp 99-116
 - VCAM-1 and its functions in development and inflammatory response, Kap. Firm adhesion, Hyduk, S. J., Cybulsky, M. I., pp 141-174
 - Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) and macrophage antigen-1 (Mac-1): Cooperative partners in leukocyte emigration and function, Kap. Firm adhesion, Schenkel, A. R., Kin, M., pp 175-200
 - PECAM: Regulating the start of diapedesis, Kap. Transendothelial migration, Muller., W. A., pp 201-220
 - The role of endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM) in neutrophil emigration into inflamed tissue, Kap. Transendothelial migration, Butz, St., Vestweber, D., pp 253-270
 - Structure and function of JAM proteins, Kap. Transendothelial migration, Severson, E. A., Parkos, C. A., pp 271-288
- LI, S., BUTLER, P., WANG, Y., HU, Y., HAN, D. C., USAMI, S., GUAN, J. L. & CHIEN, S. 2002. The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3546-51.
- LICHTMAN, J. W. & CONCHELLO, J. A. 2005. Fluorescence microscopy. *Nat Methods*, 2, 910-9.
- LISTER, K. J., JAMES, W. G. & HICKEY, M. J. 2007. Immune complexes mediate rapid alterations in microvascular permeability: roles for neutrophils, complement, and platelets. *Microcirculation*, 14, 709-22.
- LIU, C. H., SAHOO, S. L. & TSAO, M. H. 2014. Acridine orange coated magnetic nanoparticles for nucleus labeling and DNA adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 115, 150-6.
- LO, C. M., WANG, H. B., DEMBO, M. & WANG, Y. L. 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, 79, 144-52.
- LONG, E. O. 2011. ICAM-1: getting a grip on leukocyte adhesion. *J Immunol*, 186, 5021-3.
- LUDWIG, R. J., HARDT, K., HATTING, M., BISTRAN, R., DIEHL, S., RADEKE, H. H., PODDA, M., SCHON, M. P., KAUFMANN, R., HENSCHLER, R., PFEILSCHIFTER, J. M., SANTOSO, S. & BOEHNCKE, W. H. 2009. Junctional adhesion molecule (JAM)-B supports lymphocyte rolling and adhesion through interaction with alpha4beta1 integrin. *Immunology*, 128, 196-205.
- LUDWIG, R. J., SCHULTZ, J. E., BOEHNCKE, W. H., PODDA, M., TANDI, C., KROMBACH, F., BAATZ, H., KAUFMANN, R., VON ANDRIAN, U. H. & ZOLLNER, T. M. 2004. Activated, not resting, platelets increase leukocyte rolling in murine skin utilizing a distinct set of adhesion molecules. *J Invest Dermatol*, 122, 830-6.

LITERATURVERZEICHNIS

- LUO, B. H., CARMAN, C. V. & SPRINGER, T. A. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*, 25, 619-47.
- LUSCINSKAS, F. W., LIM, Y. C. & LICHTMAN, A. H. 2001. Wall shear stress: the missing step for T cell transmigration? *Nat Immunol*, 2, 478-80.
- LUSCINSKAS, F. W., MA, S., NUSRAT, A., PARKOS, C. A. & SHAW, S. K. 2002. Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair. *Semin Immunol*, 14, 105-13.
- MACKAY, C. R. 2008. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat Immunol*, 9, 988-98.
- MACVICAR, B. A. 1984. Infrared video microscopy to visualize neurons in the in vitro brain slice preparation. *J Neurosci Methods*, 12, 133-9.
- MAMDOUH, Z., MIKHAILOV, A. & MULLER, W. A. 2009. Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment. *J Exp Med*, 206, 2795-808.
- MANGMOOL, S. & KUROSE, H. 2011. G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins (Basel)*, 3, 884-99.
- MANJUNATH, N., SHANKAR, P., STOCKTON, B., DUBEY, P. D., LIEBERMAN, J. & VON ANDRIAN, U. H. 1999. A transgenic mouse model to analyze CD8(+) effector T cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13932-7.
- MARQUARDT, H., SIEGFRIED, G. (eds.), 1994 Lehrbuch der Toxikologie, *BI Wissenschaftlicher Verlag, Leipzig*.
In-Vitro-Methoden, Spielmann, H., pp 814-820
- MARSCHER, P. & SCHMID-SCHONBEIN, G. W. 2002. Control of fluid shear response in circulating leukocytes by integrins. *Ann Biomed Eng*, 30, 333-43.
- MASEDUNSKAS, A., SRAMKOVA, M., PARENTE, L. & WEIGERT, R. 2013. Intravital microscopy to image membrane trafficking in live rats. *Methods Mol Biol*, 931, 153-67.
- MASSBERG, S., BOROS, M., LEIDERER, R., BARANYI, L., OKADA, H. & MESSMER, K. 1998a. Endothelin (ET)-1 induced mucosal damage in the rat small intestine: role of ET(A) receptors. *Shock*, 9, 177-83.
- MASSBERG, S., EISENMENGER, S., ENDERS, G., KROMBACH, F. & MESSMER, K. 1998b. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)*, 198, 23-35.
- MASSBERG, S., GONZALEZ, A. P., LEIDERER, R., MENGER, M. D. & MESSMER, K. 1998c. In vivo assessment of the influence of cold preservation time on microvascular reperfusion injury after experimental small bowel transplantation. *Br J Surg*, 85, 127-33.

LITERATURVERZEICHNIS

- MASSENA, S., CHRISTOFFERSSON, G., HJERTSTROM, E., ZCHARIA, E., VLODAVSKY, I., AUSMEES, N., ROLNY, C., LI, J. P. & PHILLIPSON, M. 2010. A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood*, 116, 1924-31.
- MASTERS, B. R. & SO, P. T. 2004. Antecedents of two-photon excitation laser scanning microscopy. *Microsc Res Tech*, 63, 3-11.
- MAUGERI, N., MALATO, S., FEMIA, E. A., PUGLIANO, M., CAMPANA, L., LUNGHI, F., ROVERE-QUERINI, P., LUSSANA, F., PODDA, G., CATTANEO, M., CICERI, F. & MANFREDI, A. A. 2011. Clearance of circulating activated platelets in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood*, 118, 3359-66.
- MAUGERI, N., ROVERE-QUERINI, P., EVANGELISTA, V., COVINO, C., CAPOBIANCO, A., BERTILACCIO, M. T., PICCOLI, A., TOTANI, L., CIANFLONE, D., MASERI, A. & MANFREDI, A. A. 2009. Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, P-selectin, and β_2 integrin-dependent cell clearance program. *Blood*, 113, 5254-65.
- MCCARTHY, J. B., PALM, S. L. & FURCHT, L. T. 1983. Migration by haptotaxis of a Schwann cell tumor line to the basement membrane glycoprotein laminin. *J Cell Biol*, 97, 772-7.
- MCDONALD, B., PITTMAN, K., MENEZES, G. B., HIROTA, S. A., SLABA, I., WATERHOUSE, C. C., BECK, P. L., MURUVE, D. A. & KUBES, P. 2010. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, 330, 362-6.
- MCEVER, R. P. & CUMMINGS, R. D. 1997. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest*, 100, S97-103.
- MEMPEL, T. R., MOSER, C., HUTTER, J., KUEBLER, W. M. & KROMBACH, F. 2003. Visualization of leukocyte transendothelial and interstitial migration using reflected light oblique transillumination in intravital video microscopy. *J Vasc Res*, 40, 435-41.
- MEMPEL, T. R., PITTET, M. J., KHAZAIE, K., WENINGER, W., WEISSLEDER, R., VON BOEHMER, H. & VON ANDRIAN, U. H. 2006. Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity*, 25, 129-41.
- MEMPEL, T. R., SCIMONE, M. L., MORA, J. R. & VON ANDRIAN, U. H. 2004. In vivo imaging of leukocyte trafficking in blood vessels and tissues. *Curr Opin Immunol*, 16, 406-17.
- MENGER, M. D., SACK, F. U., BARKER, J. H., FEIFEL, G. & MESSMER, K. 1988. Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle. Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Res Exp Med (Berl)*, 188, 151-65.

LITERATURVERZEICHNIS

- MIDDLETON, J., PATTERSON, A. M., GARDNER, L., SCHMUTZ, C. & ASHTON, B. A. 2002. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*, 100, 3853-60.
- MILLER, D. H., KHAN, O. A., SHEREMATA, W. A., BLUMHARDT, L. D., RICE, G. P., LIBONATI, M. A., WILLMER-HULME, A. J., DALTON, C. M., MISZKIEL, K. A., O'CONNOR, P. W. & INTERNATIONAL NATALIZUMAB MULTIPLE SCLEROSIS TRIAL, G. 2003. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 348, 15-23.
- MIURA, M., FU, X., ZHANG, Q. W., REMICK, D. G. & FAIRCHILD, R. L. 2001. Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol*, 159, 2137-45.
- MOHLER, W., MILLARD, A. C. & CAMPAGNOLA, P. J. 2003. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods*, 29, 97-109.
- MONTRESOR, A., TOFFALI, L., CONSTANTIN, G. & LAUDANNA, C. 2012. Chemokines and the signaling modules regulating integrin affinity. *Front Immunol*, 3, 127.
- MOON, I. S., LEE, H., PARK, S. D. & SEOG, D. H. 2010. Immunonucleochemistry: a new method for in situ detection of antigens in the nucleus of cells in culture. *Cytotechnology*, 62, 83-93.
- MOSER, M., LEGATE, K. R., ZENT, R. & FASSLER, R. 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science*, 324, 895-9.
- MOUALLEM, M., FARFEL, Z. & HANSKI, E. 1990. Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin: intoxication of host cells by bacterial invasion. *Infect Immun*, 58, 3759-64.
- MULLER, M. 2006. *Introduction to Confocal Fluorescence Microscopy (Tutorial Texts in Optical Engineering)*, SPIE Press, Bellingham, Washington
·*Confocal fluorescence microscopy, Chapter 1, pp 1-28*
- MULLER, W. A. 2003. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*, 24, 327-34.
- MULLISCH, M. & WELSCH, U. (eds.) 2010. *Romeis-Mikroskopische Technik, Springer Spektrum*, Heidelberg.
·*Mikroskopische Verfahren, Kapitel 1, pp 1-38*
- MURDOCH, C. & FINN, A. 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, 95, 3032-43.
- NAKADA, M. T., AMIN, K., CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M., O'BRIEN, C. D., SUN, J., GURUBHAGAVATULA, I., HEAVNER, G. A., TAYLOR, A. H., PADDOCK, C., SUN, Q. H., ZEHNDER, J. L., NEWMAN, P. J., ALBELDA, S. M. & DELISSER, H. M. 2000. Antibodies against the first Ig-like domain of human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that inhibit PECAM-1-dependent homophilic adhesion block in vivo neutrophil recruitment. *J Immunol*, 164, 452-62.

LITERATURVERZEICHNIS

- NASDALA, I., WOLBURG-BUCHHOLZ, K., WOLBURG, H., KUHN, A., EBNET, K., BRACHTENDORF, G., SAMULOWITZ, U., KUSTER, B., ENGELHARDT, B., VESTWEBER, D. & BUTZ, S. 2002. A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J Biol Chem*, 277, 16294-303.
- NATHAN, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6, 173-82.
- NAWROTH, R., POELL, G., RANFT, A., KLOEP, S., SAMULOWITZ, U., FACHINGER, G., GOLDING, M., SHIMA, D. T., DEUTSCH, U. & VESTWEBER, D. 2002. VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J*, 21, 4885-95.
- NICHOLSON, I. C. 2002. CD62L (L-selectin). *J Biol Regul Homeost Agents*, 16, 144-6.
- NOURSHARGH, S., HORDIJK, P. L. & SIXT, M. 2010. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 366-78.
- NOURSHARGH, S. & MARELLI-BERG, F. M. 2005. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol*, 26, 157-65.
- OZER, K., ZIELINSKI, M., UNSAL, M. & SIEMIONOW, M. 2002. Development of mouse cremaster transplantation model for intravital microscopic evaluation. *Microcirculation*, 9, 487-95.
- PALECEK, S. P., LOFTUS, J. C., GINSBERG, M. H., LAUFFENBURGER, D. A. & HORWITZ, A. F. 1997. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, 385, 537-40.
- PALFRAMAN, R. T., JUNG, S., CHENG, G., WENINGER, W., LUO, Y., DORF, M., LITTMAN, D. R., ROLLINS, B. J., ZWEERINK, H., ROT, A. & VON ANDRIAN, U. H. 2001. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med*, 194, 1361-73.
- PATEL, K. D., CUVELIER, S. L. & WIEHLER, S. 2002. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol*, 14, 73-81.
- PAWLEY, J. B. (ed.) 2006. *Handbook of biological confocal microscopy*, Springer. New York.
·Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy, Chapter 1, Inoué, S.; pp 1-19
·Fundamental limits in confocal microscopy, Chapter 2, Pawley, J. B., pp 20-42
·Multi-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy, Chapter 28, Denk, W., Piston, D. W., Webb, W. W., pp 535-560
- PHILLIPSON, M., HEIT, B., COLARUSSO, P., LIU, L., BALLANTYNE, C. M. & KUBES, P. 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*, 203, 2569-75.

LITERATURVERZEICHNIS

- PHILLIPSON, M., HEIT, B., PARSONS, S. A., PETRI, B., MULLALY, S. C., COLARUSSO, P., GOWER, R. M., NEELY, G., SIMON, S. I. & KUBES, P. 2009. Vav1 is essential for mechanotactic crawling and migration of neutrophils out of the inflamed microvasculature. *J Immunol*, 182, 6870-8.
- PHILLIPSON, M. & KUBES, P. 2011. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*, 17, 1381-90.
- PIALI, L., HAMMEL, P., UHEREK, C., BACHMANN, F., GISLER, R. H., DUNON, D. & IMHOF, B. A. 1995. CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol*, 130, 451-60.
- PICCARDONI, P., SIDERI, R., MANARINI, S., PICCOLI, A., MARTELLI, N., DE GAETANO, G., CERLETTI, C. & EVANGELISTA, V. 2001. Platelet/polymorphonuclear leukocyte adhesion: a new role for SRC kinases in Mac-1 adhesive function triggered by P-selectin. *Blood*, 98, 108-16.
- PICK, R., BRECHTEFELD, D. & WALZOG, B. 2013. Intraluminal crawling versus interstitial neutrophil migration during inflammation. *Mol Immunol*, 55, 70-5.
- PILLAY, J., KAMP, V. M., VAN HOFFEN, E., VISSER, T., TAK, T., LAMMERS, J. W., ULFMAN, L. H., LEENEN, L. P., PICKKERS, P. & KOENDERMAN, L. 2012. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*, 122, 327-36.
- PILLAY, J., RAMAKERS, B. P., KAMP, V. M., LOI, A. L., LAM, S. W., HIETBRINK, F., LEENEN, L. P., TOOL, A. T., PICKKERS, P. & KOENDERMAN, L. 2010. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J Leukoc Biol*, 88, 211-20.
- PRICE, R. L., JEROME, W., G., 2011, *Basic confocal microscopy*, Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London.
·Introduction and Historical Perspective, Price, R. L., Jerome, W., G., pp1-16;
·The Theory of fluorescence, Jerome, W., G., pp 17-28;
·Types of confocal instruments, Basic principles and advantages and disadvantages, Fuseler, J., Jerome, W., G, Price, R. L, pp 157-180
- PROEBSTL, D., VOISIN, M. B., WOODFIN, A., WHITEFORD, J., D'ACQUISTO, F., JONES, G. E., ROWE, D. & NOURSHARGH, S. 2012. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med*, 209, 1219-34.
- PUGA, I., COLS, M., BARRA, C. M., HE, B., CASSIS, L., GENTILE, M., COMERMA, L., CHORNY, A., SHAN, M., XU, W., MAGRI, G., KNOWLES, D. M., TAM, W., CHIU, A., BUSSEL, J. B., SERRANO, S., LORENTE, J. A., BELLOSILLO, B., LLORETA, J., JUANPERE, N., ALAMEDA, F., BARO, T., DE HEREDIA, C. D., TORAN, N., CATALA, A., TORREBADELL, M., FORTUNY, C., CUSI, V., CARRERAS, C., DIAZ, G. A., BLANDER, J. M., FARBER, C. M., SILVESTRI, G., CUNNINGHAM-RUNDLES, C., CALVILLO, M., DUFOUR, C., NOTARANGELO, L. D., LOUGARIS, V., PLEBANI, A., CASANOVA, J. L., GANAL, S. C., DIEFENBACH, A., AROSTEGUI, J. I., JUAN, M., YAGUE, J., MAHLAOU, N.,

LITERATURVERZEICHNIS

- DONADIEU, J., CHEN, K. & CERUTTI, A. 2012. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol*, 13, 170-80.
- PULLI, B., ALI, M., FORGHANI, R., SCHOB, S., HSIEH, K. L., WOJTKIEWICZ, G., LINNOILA, J. J. & CHEN, J. W. 2013. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. *PLoS One*, 8, e67976.
- QIN, J., VINOGRADOVA, O. & PLOW, E. F. 2004. Integrin bidirectional signaling: a molecular view. *PLoS Biol*, 2, e169.
- RAINER, G. E., BUCKLEY, C. D., SIMMONS, D. L. & NASH, G. B. 1999. Neutrophils sense flow-generated stress and direct their migration through alphaVbeta3-integrin. *Am J Physiol*, 276, H858-64.
- REHBERG, M., KROMBACH, F., POHL, U. & DIETZEL, S. 2011. Label-free 3D visualization of cellular and tissue structures in intact muscle with second and third harmonic generation microscopy. *PLoS One*, 6, e28237.
- REUTERSHAN, J., BASIT, A., GALKINA, E. V. & LEY, K. 2005. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289, L807-15.
- RITZMAN, A. M., HUGHES-HANKS, J. M., BLAHO, V. A., WAX, L. E., MITCHELL, W. J. & BROWN, C. R. 2010. The chemokine receptor CXCR2 ligand KC (CXCL1) mediates neutrophil recruitment and is critical for development of experimental Lyme arthritis and carditis. *Infect Immun*, 78, 4593-600.
- ROBERT, C., FUHLBRIGGE, R. C., KIEFFER, J. D., AYEJUNIE, S., HYNES, R. O., CHENG, G., GRABBE, S., VON ANDRIAN, U. H. & KUPPER, T. S. 1999. Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance. *J Exp Med*, 189, 627-36.
- ROSS, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340, 115-26.
- ROT, A. 1992. Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol Today*, 13, 291-4.
- RYAN, K. J., RAY, C. G., AHMAD, N., DREW, W. L., PLORDE, J. J., 2010. *Sherris Medical Microbiology, Mc Graw Hill. New York*
Haemophilus and Bordetella, Chapter 31; pp551-564
- RYAN, U. S. & WORTHINGTON, R. E. 1992. Cell-cell contact mechanisms. *Curr Opin Immunol*, 4, 33-7.
- RYSCHICH, E., KERKADZE, V., LIZDENIS, P., PASKAUSKAS, S., KNAEBEL, H. P., GROSS, W., GEBHARD, M. M., BUCHLER, M. W. & SCHMIDT, J. 2006. Active leukocyte crawling in microvessels assessed by digital time-lapse intravital microscopy. *J Surg Res*, 135, 291-6.

LITERATURVERZEICHNIS

- SAETZLER, R. K., JALLO, J., LEHR, H. A., PHILIPS, C. M., VASTHARE, U., ARFORS, K. E. & TUMA, R. F. 1997. Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem*, 45, 505-13.
- SAHA, P. & GEISSMANN, F. 2011. Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunol Cell Biol*, 89, 2-4.
- SAHBAIE, P., LI, X., SHI, X. & CLARK, J. D. 2012. Roles of Gr-1+ leukocytes in postincisional nociceptive sensitization and inflammation. *Anesthesiology*, 117, 602-12.
- SAMPATH, R., KUKIELKA, G. L., SMITH, C. W., ESKIN, S. G. & MCINTIRE, L. V. 1995. Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Ann Biomed Eng*, 23, 247-56.
- SANCHEZ-MADRID, F. & DEL POZO, M. A. 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J*, 18, 501-11.
- SCHENKEL, A. R., MAMDOUH, Z., CHEN, X., LIEBMAN, R. M. & MULLER, W. A. 2002. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol*, 3, 143-50.
- SCHENKEL, A. R., MAMDOUH, Z. & MULLER, W. A. 2004. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol*, 5, 393-400.
- SCHMIDT, R. F., UNSICKER, K., BIRNBAUMER, N., KURTZ, A. & SCHARTL, M. (eds.) 2003. *Lehrbuch Vorklinik, Teil C, Anatomie, Biochemie und Physiologie der vegetativen Organsysteme, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.*
·Blut, Kap.1; Fandry, J.; pp 3-32
·Immunologie und Organe der Abwehr, Kap. 2; Hünig, T.; Schimol, A.; Westermann, J.; pp 33-78;
·Kreislauf, Kap. 7; Pohl, U.; pp 179-234;
- SCHNEIDER, M., BROILLET, A., TARDY, I., POCHON, S., BUSSAT, P., BETTINGER, T., HELBERT, A., COSTA, M. & TRANQUART, F. 2012. Use of intravital microscopy to study the microvascular behavior of microbubble-based ultrasound contrast agents. *Microcirculation*, 19, 245-59.
- SCHREIBER, T. H., SHINDER, V., CAIN, D. W., ALON, R. & SACKSTEIN, R. 2007. Shear flow-dependent integration of apical and subendothelial chemokines in T-cell transmigration: implications for locomotion and the multistep paradigm. *Blood*, 109, 1381-6.
- SCHULZ, C., SCHAFFER, A., STOLLA, M., KERSTAN, S., LORENZ, M., VON BRUHL, M. L., SCHIEMANN, M., BAUERSACHS, J., GLOE, T., BUSCH, D. H., GAWAZ, M. & MASSBERG, S. 2007. Chemokine fractalkine mediates leukocyte recruitment to inflammatory endothelial cells in flowing whole blood: a critical role for P-selectin expressed on activated platelets. *Circulation*, 116, 764-73.

LITERATURVERZEICHNIS

- SCHYMEINSKY, J., GERSTL, R., MANNIGEL, I., NIEDUNG, K., FROMMHOLD, D., PANTHEL, K., HEESEMANN, J., SIXT, M., QUAST, T., KOLANUS, W., MOCSAI, A., WIENANDS, J., SPERANDIO, M. & WALZOG, B. 2009. A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on beta(2) integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo. *Blood*, 114, 4209-20.
- SCHYMEINSKY, J., SPERANDIO, M. & WALZOG, B. 2011. The mammalian actin-binding protein 1 (mAbp1): a novel molecular player in leukocyte biology. *Trends Cell Biol*, 21, 247-55.
- SHANTSILA, E., WRIGLEY, B., TAPP, L., APOSTOLAKIS, S., MONTORO-GARCIA, S., DRAYSON, M. T. & LIP, G. Y. 2011. Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *J Thromb Haemost*, 9, 1056-66.
- SHAW, S. K., MA, S., KIM, M. B., RAO, R. M., HARTMAN, C. U., FROIO, R. M., YANG, L., JONES, T., LIU, Y., NUSRAT, A., PARKOS, C. A. & LUSCINSKAS, F. W. 2004. Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. *J Exp Med*, 200, 1571-80.
- SHEN, B., DELANEY, M. K. & DU, X. 2012. Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Curr Opin Cell Biol*, 24, 600-6.
- SHIMAOKA, M., KIM, M., COHEN, E. H., YANG, W., ASTROF, N., PEER, D., SALAS, A., FERRAND, A. & SPRINGER, T. A. 2006. AL-57, a ligand-mimetic antibody to integrin LFA-1, reveals chemokine-induced affinity up-regulation in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 13991-6.
- SHULMAN, Z., SHINDER, V., KLEIN, E., GRABOVSKY, V., YEGER, O., GERON, E., MONTRESOR, A., BOLOMINI-VITTORI, M., FEIGELSON, S. W., KIRCHHAUSEN, T., LAUDANNA, C., SHAKHAR, G. & ALON, R. 2009. Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin. *Immunity*, 30, 384-96.
- SIMON, S. I. & GOLDSMITH, H. L. 2002. Leukocyte adhesion dynamics in shear flow. *Ann Biomed Eng*, 30, 315-32.
- SIMON, S. I., HU, Y., VESTWEBER, D. & SMITH, C. W. 2000. Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Immunol*, 164, 4348-58.
- SIXT, M., BAUER, M., LAMMERMANN, T. & FASSLER, R. 2006. Beta1 integrins: zip codes and signaling relay for blood cells. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 482-90.
- SMITH, C. W., MARLIN, S. D., ROTHLEIN, R., TOMAN, C. & ANDERSON, D. C. 1989. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest*, 83, 2008-17.

LITERATURVERZEICHNIS

- SMITH, C. W., ROTHLEIN, R., HUGHES, B. J., MARISCALCO, M. M., RUDLOFF, H. E., SCHMALSTIEG, F. C. & ANDERSON, D. C. 1988. Recognition of an endothelial determinant for CD 18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J Clin Invest*, 82, 1746-56.
- SMITH, M. L., OLSON, T. S. & LEY, K. 2004. CXCR2- and E-selectin-induced neutrophil arrest during inflammation in vivo. *J Exp Med*, 200, 935-9.
- SOEHNLEIN, O. & LINDBOM, L. 2009. Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system. *J Leukoc Biol*, 85, 344-51.
- SOEHNLEIN, O. & LINDBOM, L. 2010. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 10, 427-39.
- SOEHNLEIN, O., LINDBOM, L. & WEBER, C. 2009. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood*, 114, 4613-23.
- SOEHNLEIN, O. & WEBER, C. 2009. Myeloid cells in atherosclerosis: initiators and decision shapers. *Semin Immunopathol*, 31, 35-47.
- SOEHNLEIN, O., ZERNECKE, A., ERIKSSON, E. E., ROTHFUCHS, A. G., PHAM, C. T., HERWALD, H., BIDZHEKOV, K., ROTTENBERG, M. E., WEBER, C. & LINDBOM, L. 2008. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*, 112, 1461-71.
- SON, D. S., PARL, A. K., RICE, V. M. & KHABELE, D. 2007. Keratinocyte chemoattractant (KC)/human growth-regulated oncogene (GRO) chemokines and pro-inflammatory chemokine networks in mouse and human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 6, 1302-12.
- SORIANO, S. F., HONS, M., SCHUMANN, K., KUMAR, V., DENNIER, T. J., LYCK, R., SIXT, M. & STEIN, J. V. 2011. In vivo analysis of uropod function during physiological T cell trafficking. *J Immunol*, 187, 2356-64.
- SPANGRUDE, G. J., SACCHI, F., HILL, H. R., VAN EPPS, D. E. & DAYNES, R. A. 1985. Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J Immunol*, 135, 4135-43.
- SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG, 2000.
·SPEKTRUMDERWISSENSCHAFT-VERLAG. 2000. *Konfokalmikroskop - Lexikon der Neurowissenschaft* [Online]. Available: <http://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/konfokalmikroskop/6648> [Accessed 25.06.2014 13:29].
·SPEKTRUMDERWISSENSCHAFT-VERLAG. 2000. *Fluoreszenzmikroskopie – Lexikon der Biologie* [Online]. Available: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/fluoreszenzmikroskopie/25361> [Accessed 09.04.2015 16:14]
- SPERANDIO, M. 2006. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J*, 273, 4377-89.

LITERATURVERZEICHNIS

- SPERANDIO, M., PICKARD, J., UNNIKRISHNAN, S., ACTON, S. T. & LEY, K. 2006. Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro. *Methods Enzymol*, 416, 346-71.
- SPERANDIO, M., THATTE, A., FOY, D., ELLIES, L. G., MARTH, J. D. & LEY, K. 2001. Severe impairment of leukocyte rolling in venules of core 2 glucosaminyltransferase-deficient mice. *Blood*, 97, 3812-9.
- SPONAAS, A. M., FREITAS DO ROSARIO, A. P., VOISINE, C., MASTELIC, B., THOMPSON, J., KOERNIG, S., JARRA, W., RENIA, L., MAUDUIT, M., POTOENIK, A. J. & LANGHORNE, J. 2009. Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood*, 114, 5522-31.
- SPRINGER, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76, 301-14.
- SPRINGER, T. A. & DUSTIN, M. L. 2012. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr Opin Cell Biol*, 24, 107-15.
- STATISTISCHESBUNDESAMT;. 2015. *Die 10 häufigsten Todesursachen insgesamt; Sterbefälle insgesamt nach ICD-10 im Jahr 2013* [Online]. Available: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html> [Accessed 1.3.2015, 21:30].
- STAUNTON, D. E., DUSTIN, M. L. & SPRINGER, T. A. 1989. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature*, 339, 61-4.
- STEFANOVIC, L., BRENNER, D. A. & STEFANOVIC, B. 2005. Direct hepatotoxic effect of KC chemokine in the liver without infiltration of neutrophils. *Exp Biol Med (Maywood)*, 230, 573-86.
- STEIN, J. V., ROT, A., LUO, Y., NARASIMHASWAMY, M., NAKANO, H., GUNN, M. D., MATSUZAWA, A., QUACKENBUSH, E. J., DORF, M. E. & VON ANDRIAN, U. H. 2000. The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *J Exp Med*, 191, 61-76.
- STEPHENS, D. J. & ALLAN, V. J. 2003. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science*, 300, 82-6.
- STONE, A. L. & BRADLEY, D. F. 1967. Aggregation of cationic dyes on acid polysaccharides. I. Spectrophotometric titration with acridine orange and other metachromatic dyes. *Biochim Biophys Acta*, 148, 172-92.
- STRAUSS-AYALI, D., CONRAD, S. M. & MOSSER, D. M. 2007. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol*, 82, 244-52.

LITERATURVERZEICHNIS

- SUMAGIN, R., PRIZANT, H., LOMAKINA, E., WAUGH, R. E. & SARELIUS, I. H. 2010. LFA-1 and Mac-1 define characteristically different intraluminal crawling and emigration patterns for monocytes and neutrophils in situ. *J Immunol*, 185, 7057-66.
- SUMEN, C., MEMPEL, T. R., MAZO, I. B. & VON ANDRIAN, U. H. 2004. Intravital microscopy: visualizing immunity in context. *Immunity*, 21, 315-29.
- SUN, J., WILLIAMS, J., YAN, H. C., AMIN, K. M., ALBELDA, S. M. & DELISSER, H. M. 1996. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) homophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression. *J Biol Chem*, 271, 18561-70.
- SUNDD, P., POSPIESZALSKA, M. K., CHEUNG, L. S., KONSTANTOPOULOS, K. & LEY, K. 2011. Biomechanics of leukocyte rolling. *Biorheology*, 48, 1-35.
- SUNDERKOTTER, C., NIKOLIC, T., DILLON, M. J., VAN ROOIJEN, N., STEHLING, M., DREVETS, D. A. & LEENEN, P. J. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*, 172, 4410-7.
- SYNGENE. 2010. *UV Epi-Illumination versus transillumination Which type should I use* [Online]. Available: <http://www.Syngene.com/assets/doc/Technical-notes/UV-Epi-illumination-vs-transillumination-5.pdf> [Accessed 7.11.2014 20.45].
- TAN, S. Y. & DEE, M. K. 2009. Elie Metchnikoff (1845-1916): discoverer of phagocytosis. *Singapore Med J*, 50, 456-7.
- TANAKA, Y., ADAMS, D. H. & SHAW, S. 1993. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today*, 14, 111-5.
- TAUBER, A. I. 1992. The birth of immunology. III. The fate of the phagocytosis theory. *Cell Immunol*, 139, 505-30.
- TAYLOR, A. D., NEELAMEGHAM, S., HELLUMS, J. D., SMITH, C. W. & SIMON, S. I. 1996. Molecular dynamics of the transition from L-selectin- to beta 2-integrin-dependent neutrophil adhesion under defined hydrodynamic shear. *Biophys J*, 71, 3488-500.
- TECIMER, T., DLOTT, J., CHUNTHARAPAI, A., MARTIN, A. W. & PEIPER, S. C. 2000. Expression of the chemokine receptor CXCR2 in normal and neoplastic neuroendocrine cells. *Arch Pathol Lab Med*, 124, 520-5.
- THORBALL, N. 1981. FITC-dextran tracers in microcirculatory and permeability studies using combined fluorescence stereo microscopy, fluorescence light microscopy and electron microscopy. *Histochemistry*, 71, 209-33.
- TSUDA, Y., TAKAHASHI, H., KOBAYASHI, M., HANAFUSA, T., HERNDON, D. N. & SUZUKI, F. 2004. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity*, 21, 215-26.

LITERATURVERZEICHNIS

- UENO, N., HARKER, K. S., CLARKE, E. V., MCWHORTER, F. Y., LIU, W. F., TENNER, A. J. & LODOEN, M. B. 2014. Real-time imaging of Toxoplasma-infected human monocytes under fluidic shear stress reveals rapid translocation of intracellular parasites across endothelial barriers. *Cell Microbiol*, 16, 580-95.
- UNIVERSITÄT WIEN. 2014, 2015.
- UNIVERSITÄT WIEN. 2014. *Reduktion von „Out of Focus“-Licht; Multiphotonenmikroskopie* [Online]. Available: http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/fluoreszenz_mikroskop/5d_multiphoton.htm [Accessed 08.11.2014 20:03].
 - UNIVERSITÄT WIEN. 2015. *Was ist Fluoreszenz?* [Online]. Available: http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/definition/1_einleitung.htm [Accessed 29.03.2014 14:25].
 - UNIVERSITÄT WIEN. 2015. *Stokes Shift* [Online]. Available: http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/definition/2_stoke.htm [Accessed 29.03.2014 14:25].
- VOISIN, M. B., WOODFIN, A. & NOURSHARGH, S. 2009. Monocytes and neutrophils exhibit both distinct and common mechanisms in penetrating the vascular basement membrane in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 1193-9.
- VALIGNAT, M. P., THEODOLY, O., GUCCIARDI, A., HOGG, N. & LELLOUCH, A. C. 2013. T lymphocytes orient against the direction of fluid flow during LFA-1-mediated migration. *Biophys J*, 104, 322-31.
- VARON, D., JACKSON, D. E., SHENKMAN, B., DARDIK, R., TAMARIN, I., SAVION, N. & NEWMAN, P. J. 1998. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 serves as a costimulatory agonist receptor that modulates integrin-dependent adhesion and aggregation of human platelets. *Blood*, 91, 500-7.
- VOLLMAR, B., MENGER, M. D., GLASZ, J., LEIDERER, R. & MESSMER, K. 1994. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*, 267, G786-93.
- VON ANDRIAN, U. H., CHAMBERS, J. D., MCEVOY, L. M., BARGATZE, R. F., ARFORS, K. E. & BUTCHER, E. C. 1991. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 7538-42.
- VON ANDRIAN, U. H. & MACKAY, C. R. 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med*, 343, 1020-34.
- VON BRUEHL, M. L., STARK, K., STEINHART, A., CHANDRARATNE, S., KONRAD, I., LORENZ, M., KHANDOGA, A., TIRNICERIU, A., COLETTI, R., KOLLNBERGER, M., BYRNE, R. A., LAITINEN, I., WALCH, A., BRILL, A., PFEILER, S., MANUKYAN, D., BRAUN, S., LANGE, P., RIEGGER, J., WARE, J., ECKART, A., HAIDARI, S., RUDELIUS, M., SCHULZ, C., ECHTLER, K., BRINKMANN, V., SCHWAIGER, M., PREISSNER, K. T., WAGNER, D. D., MACKMAN, N., ENGELMANN, B. & MASSBERG, S. 2012. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*, 209, 819-35.

LITERATURVERZEICHNIS

- WANG, J., SHIRATORI, I., UEHORI, J., IKAWA, M. & ARASE, H. 2013. Neutrophil infiltration during inflammation is regulated by PILRalpha via modulation of integrin activation. *Nat Immunol*, 14, 34-40.
- WANG, J. H. 2012. Pull and push: talin activation for integrin signaling. *Cell Res*, 22, 1512-4.
- WANG, J. X., BAIR, A. M., KING, S. L., SHNAYDER, R., HUANG, Y. F., SHIEH, C. C., SOBERMAN, R. J., FUHLBRIGGE, R. C. & NIGROVIC, P. A. 2012. Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a beta2-integrin-dependent mechanism. *Blood*, 120, 1489-98.
- WANG, S., VOISIN, M. B., LARBI, K. Y., DANGERFIELD, J., SCHEIERMANN, C., TRAN, M., MAXWELL, P. H., SOROKIN, L. & NOURSHARGH, S. 2006. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J Exp Med*, 203, 1519-32.
- WARD, S. G. 2009. Millipede-like lymphocyte crawling: feeling the way with filopodia. *Immunity*, 30, 315-7.
- WARNOCK, R. A., ASKARI, S., BUTCHER, E. C. & VON ANDRIAN, U. H. 1998. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med*, 187, 205-16.
- WEBB, D. J. & BROWN, C. M. 2013. Epi-fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol*, 931, 29-59.
- WEBER, C., FRAEMOHS, L. & DEJANA, E. 2007. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*, 7, 467-77.
- WEBER, C., KITAYAMA, J. & SPRINGER, T. A. 1996. Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 10939-44.
- WEBER, C. & SPRINGER, T. A. 1998. Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J Immunol*, 161, 6825-34.
- WEBER, K. S., VON HUNDELSHAUSEN, P., CLARK-LEWIS, I., WEBER, P. C. & WEBER, C. 1999. Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol*, 29, 700-12.
- WEGMANN, F., PETRI, B., KHANDOGA, A. G., MOSER, C., KHANDOGA, A., VOLKERY, S., LI, H., NASDALA, I., BRANDAU, O., FASSLER, R., BUTZ, S., KROMBACH, F. & VESTWEBER, D. 2006. ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. *J Exp Med*, 203, 1671-7.
- WEHRLE-HALLER, B. & IMHOF, B. 2002. The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol*, 12, 382-9.

LITERATURVERZEICHNIS

- WENINGER, W., ULFMAN, L. H., CHENG, G., SOUCHKOVA, N., QUACKENBUSH, E. J., LOWE, J. B. & VON ANDRIAN, U. H. 2000. Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels. *Immunity*, 12, 665-76.
- WHITE, G. E., MCNEILL, E., CHANNON, K. M. & GREAVES, D. R. 2014. Fractalkine promotes human monocyte survival via a reduction in oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34, 2554-62.
- WILLIAMS, R. M., PISTON, D. W. & WEBB, W. W. 1994. Two-photon molecular excitation provides intrinsic 3-dimensional resolution for laser-based microscopy and microphotochemistry. *FASEB J*, 8, 804-13.
- WISEMAN, A., FIELDS, T. K. & CHEN, L. B. 1985. Human cell variants resistant to rhodamine 6G. *Somat Cell Mol Genet*, 11, 541-56.
- WOJCIECHOWSKI, J. C. & SARELIUS, I. H. 2005. Preferential binding of leukocytes to the endothelial junction region in venules in situ. *Microcirculation*, 12, 349-59.
- WONG, C. H., HEIT, B. & KUBES, P. 2010. Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation. *Cardiovasc Res*, 86, 183-91.
- WONG, K. L., YEAP, W. H., TAI, J. J., ONG, S. M., DANG, T. M. & WONG, S. C. 2012. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*, 53, 41-57.
- WOODFIN, A., VOISIN, M. B., BEYRAU, M., COLOM, B., CAILLE, D., DIAPOULI, F. M., NASH, G. B., CHAVAKIS, T., ALBELDA, S. M., RAINGER, G. E., MEDA, P., IMHOF, B. A. & NOURSHARGH, S. 2011. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol*, 12, 761-9.
- WOODFIN, A. VOISIN., M. B.; NOURSHARGH, S.; 2010. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol*, 17, 9-17.
- WOODMAN, R. C., REINHARDT, P. H., KANWAR, S., JOHNSTON, F. L. & KUBES, P. 1993. Effects of human neutrophil elastase (HNE) on neutrophil function in vitro and in inflamed microvessels. *Blood*, 82, 2188-95.
- WOOLF, E., GRIGOROVA, I., SAGIV, A., GRABOVSKY, V., FEIGELSON, S. W., SHULMAN, Z., HARTMANN, T., SIXT, M., CYSTER, J. G. & ALON, R. 2007. Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat Immunol*, 8, 1076-85.
- WORLDHEALTHORGANISATION. 2015. *Cardiovascular diseases* [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> [Accessed 1.3.2015 21:30].
- XIE, J., LI, R., KOTOVUORI, P., VERMOT-DESROCHES, C., WIJDENES, J., ARNAOUT, M. A., NORTAMO, P. & GAHMBERG, C. G. 1995. Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain. *J Immunol*, 155, 3619-28.

LITERATURVERZEICHNIS

- XU, N., HOSSAIN, M. & LIU, L. 2013. Pharmacological Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinases Affects KC/CXCL1-Induced Intraluminal Crawling, Transendothelial Migration, and Chemotaxis of Neutrophils In Vivo. *Mediators Inflamm*, 2013, 290565.
- YAZICI, I. & SIEMIONOW, M. 2006. The grid layer system for mapping of the rat cremaster muscle flap microcirculation. *Plast Reconstr Surg*, 117, 2112-3.
- YIPP, B. G. & KUBES, P. 2013. Antibodies against neutrophil LY6G do not inhibit leukocyte recruitment in mice in vivo. *Blood*, 121, 241-2.
- YIPP, B. G., PETRI, B., SALINA, D., JENNE, C. N., SCOTT, B. N., ZBYTNUIK, L. D., PITTMAN, K., ASADUZZAMAN, M., WU, K., MEIJNDERT, H. C., MALAWISTA, S. E., DE BOISFLEURY CHEVANCE, A., ZHANG, K., CONLY, J. & KUBES, P. 2012. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*, 18, 1386-93.
- YUAN, Y. & FLEMING, B. P. 1990. A method for isolation and fluorescent labeling of rat neutrophils for intravital microvascular studies. *Microvasc Res*, 40, 218-29.
- YUSTE, R. 2005. Fluorescence microscopy today. *Nat Methods*, 2, 902-4.
- ZARBOCK, A., ABRAM, C. L., HUNDT, M., ALTMAN, A., LOWELL, C. A. & LEY, K. 2008. PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling. *J Exp Med*, 205, 2339-47.
- ZHANG, Y. & WANG, H. 2012. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology*, 135, 268-75.
- ZHOU, H., ANDONEGUI, G., WONG, C. H. & KUBES, P. 2009. Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation. *J Immunol*, 183, 5244-50.
- ZLOTNIK, A. & YOSHIE, O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12, 121-7.
- ZWARTZ, G. J., CHIGAEV, A., DWYER, D. C., FOUTZ, T. D., EDWARDS, B. S. & SKLAR, L. A. 2004. Real-time analysis of very late antigen-4 affinity modulation by shear. *J Biol Chem*, 279, 38277-86.
- ZWEIFACH, B. W. 1973. The microcirculation in the intestinal mesentery. *Microvasc Res*, 5, 363-7.

DANKSAGUNG

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Albert Schömig danke ich dafür, diese Dissertation am von ihm geleiteten Deutschen Herzzentrum München und an der 1. Medizinischen Klinik, Klinikum Rechts der Isar in München, durchführen zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg bedanke ich mich herzlichst für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe an diesem spannenden Thema arbeiten zu können, für seine stete fachliche Unterstützung und Beratung, für sein Interesse an dem mir überlassenen Thema und für seine konstruktiven Beiträge im Vorfeld und während der Durchführung der Arbeit.

Sehr dankbar bin ich Herrn Dr. med. Alexander Khandoga für die Einarbeitung in die labortechnische und wissenschaftlichen Methodik, die kompetente Betreuung im praktischen Teil meiner Arbeit, die Unterstützung bei der Vorbereitung von Vorträgen und das Korrekturlesen. Er war und ist mir stets ein hilfsbereiter, interessierter und sehr engagierter Ansprechpartner.

Weiter gilt mein Dank den Mitgliedern der AG Massberg für ihre Unterstützung, insbesondere Frau Dr. med. vet. Marie-Luise von Brühl für die Einführung in das tierexperimentelle Arbeiten, Herrn Michael Lorenz für seine fortwährende Hilfsbereitschaft, Frau Sarah Longhi und Herrn Raffaele Coletti für die gute Zusammenarbeit.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern und anderen Doktoranden der AG Massberg für die freundliche und motivierende Atmosphäre und die damit verbundene angenehme Tätigkeit bedanken. Das wissenschaftliche Arbeiten hat mir viel Freude bereitet und mich um viele interessante Erfahrungen und Wissen bereichert.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Alexander Cerwenka bedanke ich mich für seine geduldige Beratung bei der statistischen Auswertung.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie:

meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung und dafür, dass sie mir meinen Berufswunsch ermöglicht und mich stets darin bestärkt und gefördert haben, meinem Bruder für seine Hilfsbereitschaft, meinem Mann und meinen Kindern für ihr Verständnis und ihre Geduld.