

**Aus dem Institut für Immunologie
der
Medizinischen Hochschule Hannover**



**Rolle des murinen Poliovirusrezeptor-Orthologs (mCD155/Tage4)
bei transendothelialen
Migrationsprozessen von Lymphozyten**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin in der Medizinischen Hochschule
Hannover**

**vorgelegt von Sören Laurisch
aus Hannover**

Hannover 2009

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
am 16.12.2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Professor Dr. Dieter Bitter-Suermann

Betreuer der Arbeit: Professor Dr. Reinhold Förster

Referentin: Professor Dr. Beate Sodeik

Korreferent: Professor Dr. Ulrich Baumann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2009

Promotionsausschussmitglieder: Professor Dr. Dieter Tröger

Professor Dr. Klaus Resch

Professor Dr. Reinhard Schwinzer

1. Einleitung	1-20
1.1. Endotheliale Heterogenität	1
1.1.1. Morphologische Heterogenität	1
1.1.2. Heterogenität in Expressionsmustern	2
1.1.3. Funktionelle Heterogenität	2
1.2. Hoch-endotheliale Venulen	3
1.3. Zelluläre Haftkomplexe	4
1.4. Die Rolle der Nectine und Nectin-artigen Strukturen	6
1.4.1. Allgemeines	6
1.4.2. Gewebsverteilung und subzelluläre Lokalisation der Nectine	7
1.4.3. Funktionen	8
1.4.4. Nectin-artige Moleküle (NecIs)	9
1.4.5. Rolle des PVR, murines Ortholog: Tage4, (Synonyme: CD155/Nectl-5)	10
1.5. Transendotheliale Migration	13
1.5.1. Abläufe des lymphozytären homings	13
1.5.2. Grundlagen der Interaktion von Leukozyten und Endothelien	13
1.5.3. Abrollprozesse	14
1.5.4. Chemokine stützen den Vorgang	15
1.5.5. Feste Adhäsion	15
1.5.6. Diapedese	16
1.6. Interaktion von Nectinen und Nectin-artigen Molekülen mit Leukozyten	16
1.6.1. Über DNAM-1 mit NK-Zellen	16
1.6.2. Über DNAM-1 mit Monozyten, Rolle bei Transmigrationsprozessen	17
1.6.3. Über CD96 mit NK-Zellen	18
1.6.4. Zusammenfassung	19
1.7. Zielsetzung	19
2. Material	21-25
2.1. Antikörper	21
2.2. Chemikalien	21
2.3. Enzyme/ Inhibitoren	23
2.4. Geräte	23
2.5. Medien, Zusätze und Sera	23
2.6. Puffer	24
2.7. Software	24
2.8. Sonstige Verbrauchsmaterialien	24
2.9. Tiere (Spezies: Maus)	25
2.9.1. Tierstämme	25
3. Methoden	26-44
3.1. Einzelzellpräparationen	26
3.1.1. Allgemeines	26
3.1.2. Zellpräparation aus Herz-, Lungen-, Nieren- und Hirngewebe	26

3.1.3. Zellpräparation aus Milz- und Lymphknotengewebe.....	27
3.1.4. Zellpräparation aus Lebergewebe.....	28
3.1.5. Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer (improved).....	29
3.2. Endothelzelluntersuchungen mittels Durchflusszytometrie.....	30
3.2.1. Antikörperfärbungen von Gewebeerproben.....	30
3.2.2. FACS-Messungen und Auswertungen.....	31
3.3. Sortierung endothelialer Zellen.....	32
3.3.1. Prinzip der MACS-Sortierung.....	32
3.3.2. MACS-Positivseparation aus Herz- und Lungengewebe.....	33
3.3.3. MACS-Positivseparation aus Lebergewebe.....	35
3.3.4. FACS-Sortierungen aus Lungen- und Lymphknotengewebe.....	36
3.3.5. Zellzentrifugation.....	36
3.3.6. Fluoreszenzmikroskopie.....	36
3.4. Zellkultur.....	37
3.4.1. Allgemeines.....	37
3.4.2. Beschichtung von Zellkulturschalen mit Matrigel, Gelatine und Collagen.....	37
3.4.3. Primärzellkultur aus Aortenexplantaten.....	38
3.4.4. Primärzellkultur sortierter LSECs.....	39
3.5. LPS in vivo Stimulationen.....	39
3.6. Adoptive Lymphozytentransfers.....	40
3.6.1. Isolierung von murinen Lymphozyten.....	40
3.6.2. CFSE-Färbung muriner Lymphozyten.....	41
3.6.3. Transferierung CFSE-markierter Splenozyten.....	41
3.6.4. Gewinnung der transferierten Zellen.....	41
3.6.5. Zusammenfassung der Experimente dieses Typs.....	42
3.6.6. Antikörperfärbungen, FACS-Messung und Auswertung.....	42
3.7. Erstellung der Graphiken und Diagramme.....	43
3.8. Statistik.....	43
3.8.1. Bestimmung des MFI-Quotienten.....	43
3.8.2. Überprüfung auf Signifikanz.....	44
4. Ergebnisse.....	45-69
4.1. Endothelzellen in der Durchflusszytometrie.....	45
4.1.1. Identifizierung endothelialer Zellen verschiedener Organe.....	45
4.1.2. Besonderheiten der Identifikation in Milz- und Lebergewebe.....	46
4.2. LSEC-Antigen.....	47
4.2.1. LSEC-Antigen auf endothelialen Zellen.....	47
4.2.2. Statistischer Vergleich von endothelial-exprimiertem LSEC.....	49
4.3. Isolierung muriner Endothelzellen mittels MACS und FACS.....	49
4.4. Murine Primärzellkulturen aus Aortenexplantaten.....	51
4.5. Expression von Molekülen der Nectinfamilie auf endothelialen Zellen.....	52
4.5.1. Durchflusszytometrischer Nachweis von mCD112 und mCD155.....	52
4.5.2. Statistischer Vergleich von endothelial-exprimiertem mCD112 und mCD155.....	53

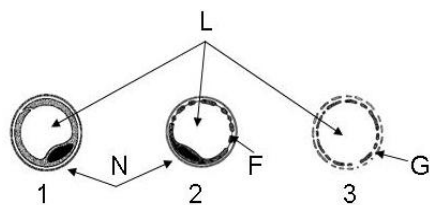
4.6. LPS-Experimente.....	54
4.6.1. Allgemeines.....	54
4.6.2. LPS-bedingte pulmonale Leukozytenrekrutierung.....	54
4.6.2.1. 5-6h nach der Gabe von 50µg LPS i.p.....	55
4.6.2.2. 15-17h nach Gabe von 50µg LPS i.p.....	56
4.6.3. Endotheliales mCD112 und mCD155 unter LPS-Einfluss.....	57
4.6.3.1. 5-6h nach der Gabe von 50µg LPS i.p.....	57
4.6.3.2. 17h nach der Gabe von 50µg LPS i.p. in C57bl6.....	57
4.6.3.3. 15-17h nach der Gabe von 50µg LPS i.p. in BALB/c.....	58
4.6.4. In vitro Stimulation von Zellen murinen Lungengewebes über 15h.....	61
4.7. Adoptive Lymphozytentransfers.....	62
4.7.1. Verhältnisse der CFSE-negativen residenten Lymphozytenfraktionen.....	63
4.7.2. Anteil transferierter CFSE+ Zellen im Empfängergerewebe.....	64
4.7.2.1. Anteil transferierter B220+ Zellen.....	65
4.7.2.2. Anteil transferierter T-Lymphozyten.....	66
4.7.2.3. Anteil transferierter CD4+ T-Zellen.....	67
4.7.2.4. Anteil transferierter CD8 β + T-Zellen.....	68
4.7.2.5. Anteil transferierter CD4+/CD8 β +T-Zellen.....	69
4.7.2.6. Zusammenfassung.....	69
5. Diskussion.....	70-82
5.1. Allgemeines	70
5.2. Durchflusszytometrische Untersuchung endothelialer Zellen.....	70
5.2.1. Allgemeines.....	70
5.2.2. Analyse endothelialer Zellen verschiedener muriner Gewebe.....	71
5.2.3. LSEC-Expressionsmuster.....	72
5.2.4. Argumente gegen eine thrombozytäre Zuordnung.....	72
5.2.5. Schlussfolgerungen.....	73
5.3. Zellsortierungen und Zellkultivierungen.....	74
5.4. Endotheliale Expression von mCD112 und mCD155.....	75
5.5. Endotheliale Expression von mCD112 und mCD155 unter LPS.....	76
5.6. Adoptive Lymphozytentransfers.....	79
5.7. Ausblick.....	81
Zusammenfassung.....	83
Abkürzungsverzeichnis.....	84-85
Schriftenverzeichnis.....	86-94
Lebenslauf.....	95
Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 PromO.....	96
Danksagung.....	97

1. Einleitung

1.1. Endotheliale Heterogenität (Reviews: Risau, 1995; Aird, 2003)

1.1.1. Morphologische Heterogenität

Das Endothel bildet als einschichtiger Zellverband die innerste Auskleidung von Blut- und Lymphgefässen. Darüber hinaus bedeckt es die Oberflächen von Blut- und Lymphe enthaltenden kavernen Strukturen. Nicht zuletzt aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen ist bekannt, dass dieser Zelltyp in Bezug auf seine Morphologie verschiedenartig gestaltet ist (Karnovsky, 1967; Simionescu, 1975). Eine morphologische Differenzierung lässt sich zum einen aufgrund der interzellulären Kontakte, aber auch aufgrund der Beschaffenheit einer unterliegenden Basalmembran treffen. So lassen sich drei Phänotypen unterscheiden: Kontinuierliches, diskontinuierliches und fenestriertes Endothel (Bennet, 1959; Maino, 1965). Das Kontinuierliche weist neben einer lückenlosen Basalmembran einen geschlossenen endothelialen Zellverband auf. Eine besondere Form dieses lückenlosen Zellverbandes ist an der Formierung der Blut-Hirnschranke beteiligt (Review: Risau, 1990). Hier finden sich zwei massgebliche weitere Besonderheiten. Zum einen verstärken spezielle Zellen - sogenannte Podozyten - die Gefässwandung von adventitial. Darüber hinaus tragen auch Zellausläufer von Astrozyten zu der Abdichtung bei (Liebig, 2003). Das diskontinuierliche Endothel (auch als sinusoidales bezeichnet) zeichnet sich dadurch aus, dass lückenhaft angeordnete Endothelzellen auf einer diskontinuierlichen Basalmembran sitzen. Diese überaus permeablen vasalen Strukturen bedecken Bereiche in den Geweben von Leber, Milz und dem Knochenmark. Der fenestrierte Endothelphänotyp unterscheidet sich vom diskontinuierlichen (sinusoidalen) Endothel lediglich in Bezug auf die Lückengrösse und das Vorhandensein von Diaphragmen, die diese Lücken schliessen, weshalb dieser Typus in Abbildung 1 als Form des diskontinuierlichen Endothels (diskontinuierlich, fenestriert) dargestellt wird. Zu finden ist dieser endotheliale Aufbau in endokrinen Drüsen, dem Plexus Choroideus, in mucosalen Strukturen des Dünndarms, der Leber und auch im Nierengewebe.



L: Gefässlumen; N: Nucleus; F: Fenestrae, Poren mit Diaphragmen; G: Gaps, Poren.

Abb. 1: Gefässquerschnitte zum Vergleich der Phänotypen (nach Risau, 1995).

- 1: Kontinuierlich: ZNS, Lymphknoten, Muskelgewebe.
- 2: Diskontinuierlich, fenestriert: Endokrine Drüsen, GI-Trakt, Plexus Choroideus, Nierenglomerula.
- 3: Diskontinuierlich (sinusoidal): Leber, Knochenmark, Milz.

Schon innerhalb einzelner Organe und innerhalb von Gefässen besteht diese

1. Einleitung

Endothelheterogenität (Review: Aird, 2003). Endothelzellen differieren nicht nur in Bezug auf Grösse, Gestalt und Dicke, sondern auch in der Kernlage (Flaherty, 1972; Silkworth, 1975; Dewey, 1981). Koronare Endothelzellen des Schweins zum Beispiel sind 30% grösser als die der Aorta (Ohbayashi et al., 1994). Und auch menschliche Endothelzellen aus Hirngewebe sind grösser als endotheliale Zellen vergleichbar grosser Gefässe aus anderen Körperarealen (Thorin et al., 1997). Pulmonalarterienendothelzellen der Ratte etwa sind im Vergleich zu aortalen Zellen länger (Kibria et al., 1980). Mikrovaskularendothelzellen zeigen eine eher flache und langgezogene Anordnung, wohingegen Makrovaskuläre polygonal erscheinen (Kumar et al., 1987). Die Plasmamembran von einigen Endothelzellen besitzt nicht nur Mikrovilli, sondern ist auch in der Lage neben Vesikeln und zytoplasmatischen Vorwölbungen auch Fenestrations und Stomata auszubilden. Endotheliale Mikrovilli wurden etwa in makrovenösen Gebieten von Kaninchen aufgefunden (Buss et al., 1979).

1.1.2. Heterogenität in Expressionsmustern

Bei der Untersuchung des Endothels auf Antigenexpressionsmuster lassen sich viele Unterschiede finden (Review: Zetter, 1988). Endothelzellen variieren in Bezug auf Expressionen von Oberflächenantigenen (Ponder, 1983; Fatehi, 1987; Belloni, 1988; Porter, 1990; Schnitzer, 1990). So sind bestimmte Adressine nur auf endothelialen Zellen hochendothelialer Venulen nachweisbar (Picker, 1993). Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1, CD31) gilt als konstitutiv auf adulten wie auch auf embryonalen Endothelzellen ubiquitär exprimierter Marker, der auch schwach auf Leukozyten und Thrombozyten exprimiert ist (Parums et al., 1990; Hewett und Murray, 1993; Vecchi et al., 1994; DeLisser et al., 1994; Watt et al., 1995; Suri et al., 1996; Vanzulli et al., 1997; Newman, 1999). Dabei findet sich CD31 (PECAM-1) auf Endothelien etwa zehnmal stärker exprimiert (Dong et al., 1997). PECAM-1 wird unter Punkt 1.3. ausführlicher beschrieben.

Endothelzellen in verschiedenen Arealen der Leber (Fukuda et al., 1986; Nagura et al., 1986), der Lunge (Yamamoto et al., 1988) und der Niere (Fleming und Jones, 1989; Tsutomu et al., 1989) exprimieren Oberflächenantigene unterschiedlich.

1.1.3. Funktionelle Heterogenität

Auch in funktioneller Hinsicht werden Unterschiede zwischen Endothelien verschiedener Organe beschrieben. Eine funktionelle Heterogenität besteht hier unter anderem in Bezug auf Hämostase, Vasotonus, Zell- und Nährstofftransport, Barrierebildung und Angiogenese. All dies ist an verschiedenen Orten des

Gefäßbaumes unterschiedlich reguliert (Risau, 1995; Rosenberg, 1999; Gross, 2000; Aird, 2001, 2002). Auch wurde über unterschiedliche Antigenpräsentationsfähigkeiten von Endothelzellen berichtet (Hirschberg et al., 1979, 1980; Pober und Gimbrone, 1982; Rose et al., 1990). Darüber hinaus sind diesem Zelltyp weitere immunmodulatorische Eigenschaften zuzuschreiben, wie etwa die Sekretion von Interleukin-1 (Miossec et al., 1986), oder Interleukin-6 (Sironi et al., 1989). Und auch Beteiligungen an antigeninduzierten T-Zell-Proliferationen zählen dazu (Hirschberg et al., 1980; Wagner et al., 1985). Neben sehr verschiedener pinozytotischer Fähigkeiten (Simionescu et al., 1978) gilt es auch völlig unterschiedliche mechanische Belastungen zu beachten. Während Endothelzellen makrovaskulärer Strukturen wie der Aorta z.T. enormen Scherkräften und Druckbelastungen ausgesetzt sind, ist die mechanische Beanspruchung endothelialer Zellen eines Kapillarbettes als wesentlich geringer anzusehen. Eine Fähigkeit zur Änderung der Zellmorphologie wird diesem Zelltypus, welcher über ein enormes Zytoskelett verfügt, ebenfalls zugeschrieben (Welt et al., 1990).

1.2. Hoch-endotheliale Venulen (Review: Miyasaka und Tanaka, 2004)

Von besonderem Interesse sind Hochendotheliale Venulen (HEV; HEVs), da in diesen Bereichen eine kontinuierliche Lymphozytentransmigration (homing) erfolgt (Stoolman, 1989; Lasky et al., 1992). Die Endothelzellen dieser Gefäßabschnitte erscheinen plump und quaderförmig, anstatt wie die übrigen Körperregionen abgeflacht (Marchesi und Gowans, 1963). Zusätzlich sind diese Endothelzellen von einer Podozyten-enhaltenden Basalmembran unterlegt (Freemont et al., 1986; Girard, 1995). Im Menschen finden sich HEVs in sämtlichen sekundär-lymphatischen Organen mit Ausnahme der Milz (Girard und Springer, 1995). Die besondere Gestaltgebung dieser Gefäße findet sich in den meisten Spezies darunter auch in Nagetieren, wenngleich für Schafe gezeigt werden konnte, dass dort HEV-Regionen scheinbar fehlen (Kraal und Mebius, 1997). HEVs sind vornehmlich in den T-Zellzonen lokalisiert. Darunter in den parakortikalen Regionen von Lymphknoten und den interfollikulären Gebieten von Payerschen Platten. Jedoch sind HEVs zum Teil auch in den B-Zellzonen, teilweise in der Peripherie von B-Zellfollikeln, anzutreffen. Auch in chronisch entzündeten nicht lymphatischen Gewebsregionen treten HEV-ähnliche Gefäßbildungen auf (Freemont, 1986; Hänninen, 1993). Die Lymphozytäre Extravasation findet in lymphatischen Organen in den postkapillären Venulen mit diesem besonderen Endotheltypus statt (Gowans und Knight, 1964, Anderson und Anderson, 1976.). Dabei binden rezirkulierende Lymphozyten selektiv an HEV-Endothel (Hall und Morris 1965; Mackay et al., 1990). Lymphatische Organe sind als

1. Einleitung

Hauptorte der konstitutiven Lymphozytenextravasation ausgemacht worden (Stoolman, 1989; Lasky et al., 1992). Einer von vier Lymphozyten, die ein HEV-Areal passieren, sollen den Blutstrom verlassen (Hay, 1977). Diese Orte der Zelltransmigrationen sind spezifisch für Lymphozyten. Unter normalen, nicht pathologischen Bedingungen ist es anderen Leukozytentypen nicht möglich HEV-Endothel zu passieren, mit Ausnahme von plasmazytoiden Dendriten, die auch über das Blutgefäßssystem in sekundär-lymphatisches Gewebe gelangen können (Cella, 1999). Einer der Faktoren, die die lymphozytenspezifischen Migrationsprozesse stützt ist in den endothelialen Oberflächenantigenen zu finden. So konnte gezeigt werden, dass auf HEV-Endothel der peripheren Lymphknoten spezifisch hochglykosylierte und sulfatierte Formen von Sialomycinen vorkommen. Die wohl bekanntesten sind die PNADs (peripheral node adressins). HEV-Endothel der Payerschen Platten hingegen weist vor allem MadCAM-1 (mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1) auf (Berg et al., 1993; Briskin, 1997). In-vitro Versuche zeigten, dass Lymphozyten via L-Selectin an das endotheliale PNAD MECA-79 binden (Berg et al., 1991). Dies konnte auch für endotheliales GlyCAM-1 (Lasky et al., 1992), sowie für CD34 (Baumhueter et al., 1993) nachgewiesen werden. Durch die plumpe Gestaltung von HEV-Endothel ist ein erhöhtes Auftreten von Strömungsstörungen und Turbulenzenbildung anzunehmen, welches die Endothel-Leukozyten-Interaktionsfähigkeit zusätzlich fördern dürfte (Girard und Springer, 1995; Kraal und Mebius, 1997). Bemerkenswert ist auch, dass sich HEV-Endothel abflacht, wenn sämtliche Lymphafferenz des jeweiligen sekundär-lymphatischen Organs unterbunden wird. (Hendriks und Estermans, 1983; Drayson und Ford, 1984). Die Lymphafferenz beeinflusst offenbar die Umwandlung und Aufrechterhaltung des hohen Endotheltypus (Mebius, 1993). Ein weiteres markantes Merkmal von HEV-Endothel ist das Vorhandensein von diskontinuierlichen punktuellen Zwischenzellverbindungen, welche Desmosomen ähneln (Anderson et al., 1976; Freemont und Jones, 1983). Dies ist daher von Bedeutung, da das Fehlen von kontinuierlichen „Tight Junctions“ (TJs) in HEV-Endothelien wahrscheinlich zur enormen Lymphozytentransmigration beiträgt (Anderson und Shaw, 1993).

1.3. Zelluläre Haftkomplexe (Reviews: Johnson-Leger, 2000; Bazzoni und Dejana, 2003;)

Zum besseren Verständnis des nachfolgenden Kapitels über Prozesse der trans-endothelialen Migration sollen nun Grundprinzipien des Aufbaus von Zwischenzellverbindungen sowie Zellmatrixverbindungen kurz erläutert werden. Diese Verbindungsstrukturen sind für die Aufrechterhaltung der Endothelschicht sowie

der damit verbundenen Abdichtung des parazellulären Raumes von grosser Bedeutung (Vestweber 2000). Für Endothelien sind drei Typen von Zell-Zell-Verbindungen beschrieben worden. Dazu zählen von luminal nach basal abfolgend, „Tight Junctions“ (TJ; TJs; Zonulae occludentes), „Adherens Junctions“ (AJ; AJs; Zonulae adhaerentes) und Gap Junctions (Rubin, 1992; Anderson et al., 1993; Beyer, 1993; Gumbiner, 1993; Schmelz und Franke, 1993). Desmosomen, die in epithelialen Zellverbänden vorzufinden sind, fehlen jedoch, und dennoch ähneln sich der Aufbau epithelialer und endothelialer Zellverbände (Rubin, 1992; Lampugnani, 1997; Bazzoni, 1999; Dejana, 1999; Simionescu, 2000). Diese einzelnen Zellverbindungen, die nach ihrer Morphologie eingeteilt wurden, sind hochkomplex aus diversen Transmembranproteinen aufgebaut (Dejana et al., 1995). Besondere Bedeutung interzellulärer Verbindungen epi- und endothelialer Zellverbände haben „Adherens Junctions“ und „Tight Junctions“ (Farquhar, 1963). Dabei ist die Bildung und Aufrechterhaltung der TJs von den AJs abhängig (Yap, 1997). TJs bilden im apikalen Bereich der Zell-Zell Verbindungen aneinanderliegender Zellen einen äusserst dichten Verbund. Als morphologisches Korrelat dieser TJs sind Membranverschmelzungen zu erkennen. Am Aufbau der TJs sind Claudin und Occludin massgeblich beteiligt (Tsukita, 1999, 2001). Beide Adhäsionsmolekülgruppen stehen über periphere Membranproteine, wie ZO-1, -2, -3 mit dem Actinzytoskelett in Verbindung. Während über Claudin bekannt ist, dass es Ca^{2+} -unabhängig funktioniert, ist die Funktion des Occludins noch ungeklärt (Tsukita, 1999, 2001). Weitere Zellverbindungsmoleküle, die im Bereich der TJs vorkommen, sind die JAMs („junctional adhesion molecules“) (Martin-Padura et al., 1998). Diese Moleküle gehören zu den Ig-artigen Zell-Zell Adhäsionsmolekülen. Diese JAMs sind Ca^{2+} -unabhängig und interagieren ebenfalls mit den Zo-Proteinen (Tsukita, 2001). JAMs sind von Endothelien unterschiedlich exprimiert (Aurrand-Lions, 2001). Endotheliales luminal exprimiertes JAM-A trägt zu der LFA1 (leucocyte-functional-antigen-1; ich komme im weiteren Verlauf darauf zurück) abhängigen Leukozyten Rekrutierung bei (Ostermann, 2002). JAM-A wird bei Endothelaktivierung am apikalen Zellpol konzentriert (Ozaki, 1999). Zudem konnte den JAMs eine Beteiligung an transendothelialen Migrationsprozessen zugeschrieben werden (Martin-Padura et al., 1998). Endothelien makrovaskulärer Abschnitte wie der Aorta zeigen ausgeprägte TJs wohingegen in Bereichen der postkapillären Venulen sekundär-lymphatischer Organe nur wenige TJs gefunden werden (Simionescu, 2000). In postkapillären Venulen ausserhalb der sekundär-lymphatischen Organe hingegen zeigen sich z.T. ausgeprägte TJs (Bowman et al., 1991).

Die Adherens Junctions stellen einen überaus komplexen Bereich der Zell-Zell-Verbindungsstrukturen dar. Eine wichtige Gruppe von Adhäsionsmolekülen der AJs

sind die Cadherine. Diese sind funktionell von Ca^{2+} -Ionen abhängig (Takeichi, 1991; Gumbiner, 1996; Tepass, 2000; Perez-Moreno, 2003). Ein Mitglied dieser Cadherin-Familie, welches in sämtlichen endothelialen Zellen exprimiert wird, ist das VE-Cadherin (Ayalon et al., 1994; Lampugnani et al., 1995). Dieses steht über periphere Membranproteine wie alpha-Actinin, alpha- und beta-Catenin und Vinculin mit dem Actinzytoskelett in Verbindung (Takeichi, 1995; Nagafuchi, 2001). Über VE-Cadherin lässt sich die Gefässpermeabilität regulieren. Dies geschieht etwa durch VEGF (vascular endothelial growth factor), welches Blutgefäßbildung induziert und zugleich permeabilitätserhöhend wirkt (Esser et al., 1998), aber auch Histamin und Thrombin wirken darüber (Rabiet et al., 1994, 1996). Den AJs kommen nicht nur wesentliche Funktionen zur Bildung der TJs zu. Vielmehr zeigen sie in Ihrer Umgebung konzentrierte Anteile von Zelloberflächenrezeptoren, intrazellulären Signalmolekülen und weiteren biologisch-aktiven Verbindungen auf (Tsukita, 1992; Gumbiner, 2000; Nagafuchi, 2001; van Aelst, 2002; Perez-Moreno, 2003). Im Bereich endothelialer Zellverbindungen unabhängig von TJs und AJs sind weitere Adhäsionsmoleküle entdeckt worden. Darunter auch PECAM-1 (CD31) (Ayalon et al., 1994; vgl. S.2). Bei CD31 handelt es sich um ein einkettiges transmembranes Glykoprotein, welches zur Ig-Superfamilie gehört, das in den zwischenzellulären Bereichen endothelialer Zellen exprimiert wird (Muller, 1989; Albelda 1991). Auch von CD31 ist eine Mitwirkung bei Transmigrationsvorgängen bekannt (Muller et al., 1993). Ein weiteres endotheliales Zell-Zell Adhäsionsmolekül ist das Protein S-Endo1 (CD146) (Bardin et al., 2001) sowie auch Endoglin (Pece, 1999).

Für Fibroblasten und epitheliale Zellen sind Nectine als weitere Adhäsionsmolekülfamilie im Bereich der AJs identifiziert worden. Diese werden nun unter den folgenden Punkten 1.4., 1.5.6 und 1.5.7. ausführlicher beschrieben.

1.4. Die Rolle der Nectine und Nectin-artigen Strukturen

1.4.1. Allgemeines (Review: Takahashi, 1999; Takai, 2003)

Nectine sind Ig-artige Zell-Zell Adhäsionsmoleküle, die Ca^{2+} -unabhängig funktionieren. Über Afadin, welches Nectin und Actinfilament (F-Actin) bindet, stehen diese mit dem Actinzytoskelett in Verbindung. Vier Nectintypen (Nectin1-4) sind soweit bekannt (Eberle et al., 1995; Lopez et al., 1995; Reymond et al., 2000; Reymond et al., 2001). Sämtliche Vertreter dieser Familie stimmen in ihrem Aufbau überein, alle besitzen drei extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen (Wimmer et al. 1994), eine Transmembranregion und einen zytoplasmatischen Abschnitt. Sämtliche Nectine mit Ausnahme von Nectin-4 verfügen über ein C-terminal gelegenes Motiv, das aus vier Aminosäureüberresten besteht, die mit der PDZ-Domäne von Afadin interagieren

können. Obgleich Nectin-4 nicht über dieses Motiv verfügt bindet es ebenfalls Afadin. Für sämtliche Vertreter dieser Familie sind zwei bis drei Spleissvarianten bekannt. Alternatives Spleissen ist bislang nur für Exons gefunden worden, die transmembranöse und cytoplasmatische Regionen kodieren, nicht jedoch für den extrazellulären Abschnitt. Auch sind sekretierte Rezeptorvarianten bekannt, denen das Transmembranregion kodierende Exon fehlt. Nectine zeigen einen hohen Konservierungsgrad in Bezug auf die Aminosäurenabfolge der Ektodomänen. Dies ist ein markanter Unterschied im Vergleich zu dem im weiteren Verlauf vorgestellten (Nect-5)/Tage4/Poliovirusrezeptor (PVR)/CD155 Molekül. Mit Einschränkung in Bezug auf Nectin-2, welches zwischen menschlichem und murinem System nur zu etwa 71% übereinstimmt, besitzen die übrigen Nectine einen Übereinstimmungsgrad von über 90%. Letztlich bedienen sich auch Viren der Nectine als Eintrittsstellen in Zellen (Irie, 2004; Takai, 2003). Diese umfassen neben dem Poliovirus auch Herpesviren (Mendelsohn, 1989; Geraghty, 1998; Lopez, 2000).

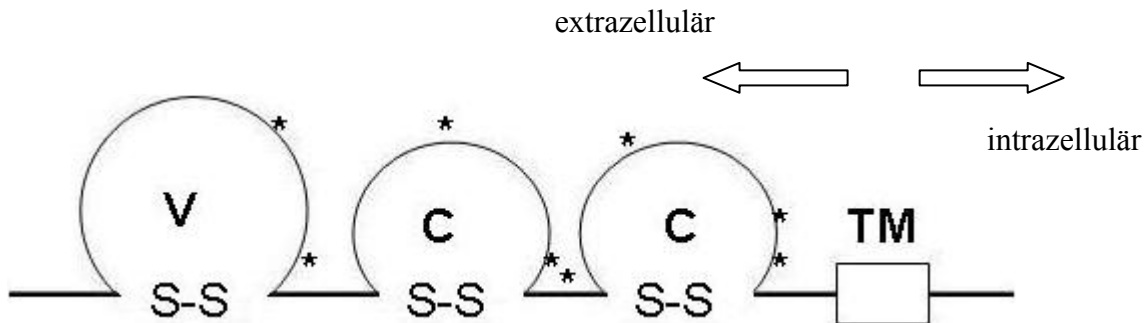


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Mitglieder der Nectinfamilie; Variable Domäne: V; Konstante Domänen: C; Transmembranregion: TM. Die Sterne sollen N-Glykosylierungsstellen für das Beispiel CD155 darstellen.

1.4.2. Gewebsverteilung und subzelluläre Lokalisation der Nectine

Die Nectine 1-3 sind ubiquitär in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert (Takai, 2003). Die Nectine-2 und -3 sind bevorzugt dort vorzufinden, wo Cadherin fehlt, wie etwa in Blutzellen und Spermatozyten. Nectin-2 wie auch der PVR, welcher weiter unten noch ausführlicher beschrieben werden wird, finden sich in vielen verschiedenen normalen Geweben schwach exprimiert darunter in neuronalem, epithelialem und endothelialem Gewebe sowie auf Fibroblasten (Campadelli – Fiume, 2000). Humanes Nectin-4 ist hauptsächlich in plazentarem Gewebe zu finden. Nectin-2 wird auch in Tumorzelllinien von epithelialer oder auch neuronaler Herkunft wie in Karzinomen, Melanomen, und Neuroblastomen exprimiert (Bottino, 2003). Normale Epithel- und Endothelzellen exprimieren Mitglieder der Nectinfamilie im Bereich der Zwischenzellverbindungen (Lopez, 1998). In Dünndarmepithelien finden sich Nectin-2

und Afadin hochkonzentriert im Bereich der E-Cadherin basierten AJs, jedoch weder im Bereich von Desmosomen noch von TJs (Takei, 2003). In Epithelzellen und Fibroblasten zeigen sich die Nectine symmetrisch verteilt an beiden Seiten der Plasmamembran im Bereich der AJs (Takei, 2003).

1.4.3. Funktionen

Nectine interagieren sowohl mit sich selbst (homophil), als auch heterophil mit anderen Mitgliedern der Nectinfamilie. Diese Moleküle konnten letztlich als neue Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle gefunden werden (Takai und Nakanishi 2003). Das Nectin-Adhäsionssystem umfasst die Aktivierung kleiner G-Proteine wie Rac und Cdc42, welche Einfluss auf das Actinzytoskelett nehmen. Darüber hinaus binden Nectine direkt an PAR-3 einem Zellpolaritätsprotein, wodurch sie bei Regulationsprozessen der Zellpolarisation teilhaben (Takekuni, 2003). Zu den bekannten Funktionen der Nectine zählen auch Zellmigrationsprozesse und ebenso besitzen Nectine eine Genexpressionssteuerungspotenz durch Aktivierung von MAP („mitogen activated protein“) Kinase Kaskade (Kawakatsu, 2002; Honda, 2003a; Takekuni, 2003). An die zytoplasmatische Domäne der Nectine (Nectine-1a; -2a, -2d; -3a, -3b) bindet zudem Afadin. Dabei gilt es zu beachten, dass nicht alle Nectin-Spleissvarianten Afadin binden. Die Nectine dienen der Regulierung interzellulärer Adhäsionsprozesse epithelialer und neuronaler Zellen. Sie sind an der Bildung von E-Cadherin-basierten AJs und der Claudin-basierten TJs epithelialer Zellen beteiligt (Fukuhara, 2002a, 2002b; Honda, 2003b, 2003c; Takai, 2003; Tanaka, 2003). Dabei wechselwirken Nectine u.a. über AF-6/ Afadin und Catenin mit E-Cadherin im Bereich der AJs (Takahashi, 1999). Auch steuern Nectine JAM-A während der Formierung von TJs (Takai, 2003). Nectine rekrutieren dabei das JAM-A und ermöglichen diesem den korrekten Transport zu den TJs in Epithelzellen (Fukuhara, 2002a,b; vgl. JAM-A, 1.3., S.5). Die Funktion der Nectine bei der Bildung von Zwischenzellverbindungen unterscheidet sich soweit bekannt durch zwei Eigenheiten von der Funktionsweise der Cadherine. Zum einen funktionieren die Nectine Ca^{2+} -unabhängig, zum anderen sind die Nectine in der Lage nicht nur homophile, sondern auch heterophile Kontaktierungen einzugehen. Für Nectin-2 konnten zudem homophile Adhäsionsvorgänge auch zwischen Endothelzellen gezeigt werden (Lopez, 1998).

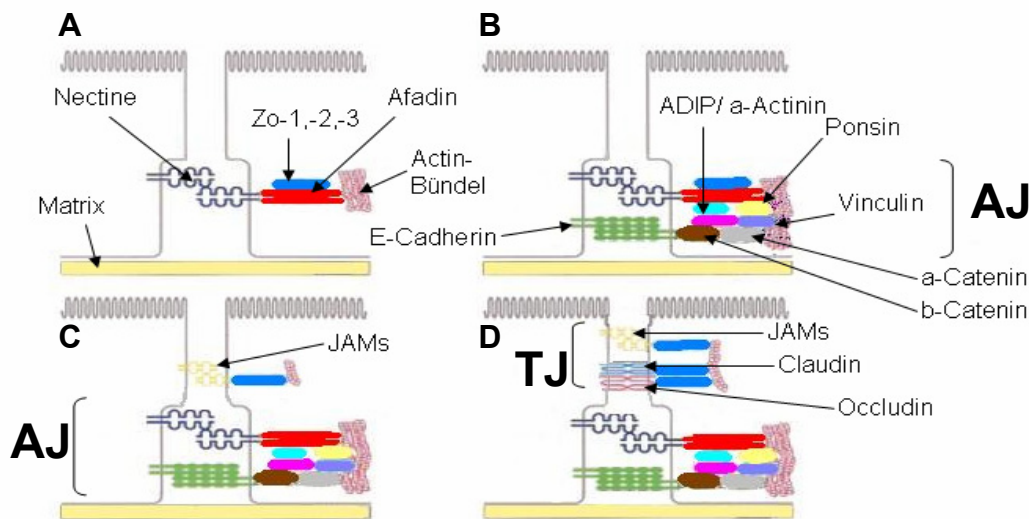


Abb. 3: Modell des Bildungsprozesses von AJs und TJs (nach Takai, 2003). **(A)** Zunächst kommt es meist zur Bildung Nectin-basierter Zell-Zell Adhäsionen. Der zytosomatische Abschnitt der Nectine bindet Afadin, welches direkt mit Actinbündeln assoziiert ist. ZO-1 ist mit dem Nectin-Afadin-System indirekt verbunden und dies unabhängig vom E-Cadherin-Catenin System.

(B) Das Nectin-basierte Zell-Zell Adhäsionsystem rekrutiert anschließend E-Cadherin, wodurch es zur Bildung der AJs kommt. Die zytosomatische Region von E-Cadherin bindet beta-Catenin, welches dann alpha-Catenin bindet. Alpha-Catenin ist mit den Actinbündeln direkt sowie indirekt verbunden. Afadin und alpha-Catenin sind miteinander verbunden, vorwiegend über zwei Verbindungseinheiten, einer Ponsin-Vinculin Einheit und einer ADIP-alpha-Actinin Einheit.

(C) Während und/oder nach der Formierung der AJs, werden JAMs an der apikalen Seite der AJs zusammengesetzt. Der Zytosolabschnitt der JAMs bindet ZO-1, -2, -3. ZO-1 und ZO-2 sind mit den Actinbündeln direkt verknüpft und bilden mit ZO-3 einen Dimer.

(D) Nun werden Claudin und Occludin rekrutiert was zur Bildung der Claudin-basierten TJs führt. Die Zytosolregion von Claudin und Occludin binden ZO-1, -2, -3.

Darüber hinaus sind sie in den Formierungen verschiedenartiger Zell-Zell Verbindungen involviert. Dazu zählen die Synapsenbildung im Gehirn (Kim et al., 2002), aber auch Interaktionen zwischen Spermatisden und Sertoli Zellen (Irie, 2004; Takai, 2003) und somit der Ausreifung von Spermazellen (Ozaki-Kuroda et al., 2002). Dies stimmt damit überein, dass keine normalen Spermazellen bei männlichen Nectin-2-defizienten Mäusen heranreifen und diese Tiere daher unfruchtbar sind (Bouchard et al., 2000). Von Nectin-1 Mutanten ist bekannt, dass es zu Gesichtsfehlbildungen kommt (Suzuki et al., 2000). Die Mitglieder der CD155 Familie (gemeint sind die Nectine) scheinen stets über ihre äußerste Domäne (V-Region) mit einem Proteinpartner in Kontakt zu treten. Für die Interaktionen von Nectin-1 mit Nectin-3 und Nectin-1 mit Nectin-4 zeigen die V – V Interaktionen eine prädominante Rolle (Reymond, 2001; Fabre, 2002).

1.4.4. Nectin-artige Moleküle (NecIs) (Ikeda, 2003)

Neben den Nectinen sind zudem fünf Nectin-artige Moleküle bekannt, die eine ähnliche Domänenstruktur aufweisen wie die der Nectine (s.o.). Diese umfassen

Necl-1/SynCAM3/TSLL1 (Fukuhara, 2001; Biederer, 2002), Necl-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/SynCAM1/TSLL1 (Gomyo, 1999; Kuramochi, 2001; Urase, 2001; Wakayama, 2001; Biederer, 2002), Necl-3/similar to NECL3/SynCAM2 (Biederer, 2002), und Necl-4/SynCAM4/TSLL2 (Fukuhara, 2001; Biederer, 2002).

Takai et al., (2003) zählen zudem zusätzlich Tage4/humaner Poliovirusrezeptor (PVR)/CD155 (Mendelsohn, 1989; Koike, 1990; Chadenau, 1994, 1996; Ikeda, 2003; Ravens et al., 2003) zu den Nectin-artigen Molekülen und bezeichnen dieses als Necl-5, da es ebenfalls nicht in der Lage ist Afadin direkt zu binden. Diese Klassifizierung erachten wir jedoch als unzulässig, da CD155/ Tage4 aufgrund der Molekülstruktur (es verfügt über eine V-Domäne) zu den Nectinen gezählt werden muss. Die Nectin-artigen Moleküle verfügen hingegen nicht über diese V-Domäne. Aus Gründen der Übersicht wird die Bezeichnung Necl-5 in dieser Arbeit jedoch stellenweise fortgeführt.

Die Nectin-artigen Moleküle unterscheiden sich in ihren Funktionen von denen der Nectine, wirken jedoch mit diesen zusammen (Koike, 1990; Chadenau, 1994; Chadenau, 1996; Gomyo, 1999; Fukuhara, 2001; Kuramochi, 2001; Urase, 2001; Wakayama, 2001; Biederer, 2002; Fukami, 2002; Ikeda 2003). Necl1-4 besitzen am C-terminalen Ende eine übereinstimmende PDZ- Bindedomäne, bestehend aus vier Aminosäuren, während PVR/Tage4 nicht über diesen Bereich verfügt. Aufgrund der Nectin-ähnlichen Struktur aber der zugleich bestehenden Unfähigkeit Afadin direkt zu binden (Ikeda, 2003; Takai, 2003) werden diese Proteine als Nectin-artig bezeichnet. Im Folgenden werde ich mich auf (Necl-5)/Tage4/PVR/CD155 konzentrieren.

1.4.5. Rolle des PVR, murines Ortholog: Tage4, (Synonyme: CD155/(Necl-5))

Der Poliovirusrezeptor ist bislang lediglich in Primaten, demgegenüber Tage4 (murines CD155; mCD155/ (murines Necl5; mNecl-5)) in Nagetieren gefunden worden (Baury, 2001). Mendelsohn et al. gelang es 1989 ein Molekül als Rezeptor des Poliovirus zu identifizieren, den Poliovirusrezeptor (PVR; CD155). Sein murines Ortholog Tage4 (Ravens et al., 2003) hingegen ist ursprünglich als überexprimiertes Gen in Maus- und Ratten-Kolonkarzinomen gefunden worden (Chadenau, 1994, 1996). Eine Überexpression von PVR/CD155 konnte ebenso in menschlichen Kolonkarzinomen (Masson, 2001) und in Gliomen (Gromeier et al., 2000) gezeigt werden. Eine Virusrezeptorfunktion ist ebenfalls für Tage4 nachgewiesen. Porkines Pseudorabiesvirus und Bovines Herpesvirus1 nutzen Tage4 als Rezeptor (Baury et al., 2001). Darüber hinaus ist bekannt, dass CD155 auf humanen Monozyten mit CD44 physikalisch assoziiert ist (Freistadt und Eberle, 1997). CD44 ist ein Transmembranprotein, das in die Zellmigration und Metastasierung von Krebszellen

verwickelt ist (Ponta, 2003). Der PVR, wie bereits die Nectine, ein Mitglied der Ig-Superfamilie, besteht im extrazellulären Abschnitt ebenfalls aus einer N-terminalen variablen Domäne (V) gefolgt von zwei konstanten Domänen (C). Im Gegensatz zu diesem Molekülbereich sind die daran anschliessende Transmembranregion sowie der cytoplasmatische Teil von CD155 variabel. Alternatives Spleissen des PVR (PVR alpha und PVR delta) bringt Moleküle hervor, die durch identische extrazelluläre Abschnitte gekennzeichnet sind, oder aber, aufgrund von Veränderung der Transmembranregion, ungebundene Rezeptoren (Koike, 1990).

Für Tage4 demgegenüber sind bislang keine Spleissvarianten bekannt. Da CD155 lediglich über eine Aminosäurenübereinstimmung von etwa 42-47% mit den beiden ähnlichsten Rezeptoren im Maussystem Tage4 und murinem Nectin-2 verfügt, war es bis zuletzt nicht genügend geklärt, ob der PVR und Tage4 von demselben Gen abstammen. Im Gegensatz zu den hoch-konservierten Nectinen (s.o.) gehört CD155/Tage4 zur Klasse sich schnell entwickelnder Gene (Iida-Hosonuma, 2003). Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz von CD155/Tage4 sind zwischen den Spezies sehr viel grösser als es für die Nectine der Fall ist (Bsp.: Koike, 1992). Die Arbeitsgruppe Bernhardt konnte 2003 das Tage4 als murines Ortholog des humanen PVRs identifizieren (Ravens et al., 2003). Doch obgleich Tage4 aller Wahrscheinlichkeit nach das murine CD155-Korrelat repräsentiert, muss zwischen humanem und murinem CD155, sowie CD155 Orthologa anderer Spezies differenziert werden, da nicht zuletzt aufgrund des geringen Konservierungsgrades funktionelle Unterschiede anzunehmen sind. In verschiedenen Normalgeweben ausgewachsener Ratten und Mäuse finden sich mittels Northern-Blot-Analysen lediglich schwache Expressionsmuster für Tage4 in Form von mRNA (Chadenau, 1994, 1996). Mittels Western-Blot liess sich Tage4-Protein in normalem Mausgewebe nicht nachweisen (Ikeda, 2003). Mittels FACS-Analysen konnte hingegen gezeigt werden, dass Tage4 in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert ist, wenngleich auch schwach. Tage4 findet sich wie auch CD155 auf Darmepithelien. Interessant ist die basolaterale Expressionscharakteristik von Tage4 auf reinen Epithelzellen gegenüber einer basolateralen sowie auch apikalen Verteilung dieses Proteins auf Zellen des Follikel-assoziierten Epithels (FAE). Auch zeigt sich eine Expression von Tage4 auf Follikulär-dendritischen Zellen (FDC) in Keimzentren Payerscher Platten, wohingegen es in Keimzentren des Mesenterischen Lymphknotens sowie der Milz auffallend schwächer exprimiert wird (Ergebnisse der Arbeitsgruppe). Dies passt mit der Charakteristik von CD155 überein. So findet sich in Keimzentren Payerscher Platten CD155 (Iwasaki et al., 2002). Zudem zeigt sich CD155 vorwiegend von FDC in Keimzentren humaner Tonsillen exprimiert (Lange et al., 2001). Diese Daten veranlassen zur Spekulation

1. Einleitung

einer Beteiligung des CD155/Tage4 Moleküls bei Immunfunktionen. Die im Allgemeinen schwache Expressionscharakteristik (s.o.) von CD155/Tage4 sollte die Nachweismethodik in dieser Arbeit prägen. Über die Funktionen des PVR ist Folgendes bekannt: (Nectin-5)/Tage4/PVR/CD155 verstärkt Prozesse der Zellmigration (Ikeda, 2003; Takai, 2003). An die zytoplasmatische Domäne von CD155 (CD155a und CD155d) bindet tctex-1 (Mueller et al., 2002), eine Leichtkette des zytoplasmatischen Dyneins (King, 1996), welches der zellulären Motorik angehört. Auch wurde die Bindung mit der μ 1B-Untereinheit des epithelialen Clathrin-Adaptorkomplexes beschrieben (nur CD155a), was dem gerichteten Transport von CD155 in polarisierten Zellen dient (Ohka et al., 2001). Ob diese beiden zuletzt genannten Funktionen von CD155 auch für murines CD155/Tage4 zutreffen, bleibt aufzudecken. Zudem bindet CD155 an das extrazelluläre Matrixprotein Vitronektin (Lange et al., 2001) und auch Tage4 bindet an Ratten-Vitronektin (Ravens et al., 2003) wodurch Zell-Matrix Kontaktierungen ermöglicht werden können. CD155 interagiert darüber hinaus mit Fibronektin (Ergebnisse der Arbeitsgruppe). CD155 und auch murines Tage4 zeigen keine homophile (Selbstadhäsionsfähigkeit), hingegen eine heterophile Zell-Zell-Adhäsionsaktivität, jedoch ausschliesslich mit Nectin-3 (Aoki, 1997; Ikeda, 2003; Mueller, 2003, Ravens et al., 2003). CD155 soll dabei Nectin-3 zu Zell-Zell Kontaktarealen durch Bildung stabiler Komplexe rekrutieren (Ikeda, 2003, Mueller, 2003). CD155 sei nicht zuletzt daher zu den Zell-Zell Adhäsionsmolekülen zählbar (Mueller und Wimmer, 2002; Ikeda et al., 2003).

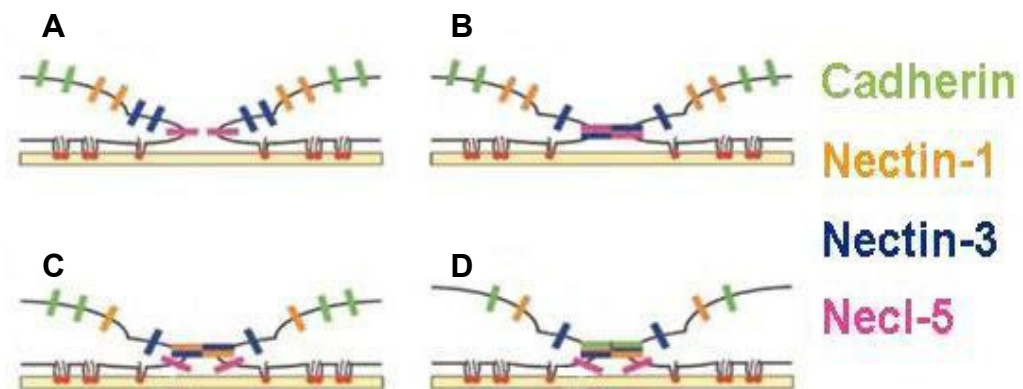


Abb. 4: Modell zur möglichen Rolle von Nectin-5 bei Zell-Zell Adhäsionsprozessen (nach Takai, 2003). (A and B) Zwei migrierende Zellen bilden einen Kontakt über Zellprotrusionen zueinander aus. Dabei trans-interagiert (trans: Interaktionspartner liegen einander gegenüber; cis: Interaktionspartner befinden sich auf derselben Seite) Nectin-5 heterophil mit Nectin-3 und bildet Microcluster an den Kontaktstellen aus. (C) Das Nectin-5 könnte dann bei dieser Aktion durch Nectin-1 ersetzt werden, so dass schliesslich eine heterophile Trans-Interaktion zwischen Nectin-1 und Nectin-3 erfolgt, während Nectin-5 dabei nicht mehr mitwirkt. (D) Die Nectin-basierten Zell-Zell Adhäsionen rekrutieren daraufhin E-cadherin, was dann zur Bildung aus einem Gemisch von Nectin und E-cadherin basierter Zell-Zell Adhäsionen führt. Ein ähnliches Modell besteht auch für Nectin-2.

1.5. Transendotheliale Migration

1.5.1. Abläufe des lymphozytären homings (Reviews: Von Andrian und Mempel, 2003; Miyasaka und Tanaka, 2004)

Bei den Prozessen des konstitutiven Eintretens von Lymphozyten in sekundär-lymphatische Organe lassen sich zwei Eintrittswege unterscheiden. Zum einen wurde gezeigt, dass einige Gedächtniszellen peripherer Gewebe über Lymphafferenzen die Lymphknotenregionen erreichen (Mackay, 1990). Der Grossteil der Lymphozyten gelangt jedoch über den höchst effizienten Weg (Gesner, 1962; Cahill, 1976) der HEV- Regionen in das Lymphknotengewebe (Marchesi, 1964). Zur Verdeutlichung sei angemerkt, dass ein einzelner muriner Inguinallymphknoten etwa zwei Prozent des zirkulierenden Gesamtlymphozytenpools pro Tag aufnimmt (von Andrian, 1996). Durchschnittlich verbringen naive Lymphozyten weniger als dreissig Minuten in der Blutzirkulation bevor diese dann erneut in ein sekundär-lymphatisches Gewebe eintreten (Pabst, 1988). Bleibt dann innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen eine für die jeweiligen Lymphozyten spezifische Antigenerkennung aus, kehren diese in den Blutkreislauf zurück (Gowans und Knight, 1964). Unter Entzündungsbedingungen wird der Prozess der Lymphozytenaufnahme in drainierende Lymphknoten sogar noch verstärkt (Ford, 1975; Cahill, 1976; Mackay, 1992; Palframan et al., 2001) und deren Anreicherung dadurch gesteigert, dass der lymphozytäre Abfluss in Lymphafferenzen zeitweilig gehemmt wird (Cahill, 1976).

1.5.2. Grundlagen der Interaktion von Leukozyten und Endothelien

Leukozyten verlassen das Blutgefässsystem durch Wechselwirkungen mit dem Endothel in einem mehrschrittigen Diapedese- und Transmigrationsvorgang (Springer, 1994; Johnson-Leger, 2000; Worthylake, 2001; Luscinskas, 2002; Vestweber, 2002; Weber, 2003).

Man kann zwischen einer konstitutiven Leukozytenextravasation im Rahmen der lymphozytären Rezirkulation und einer bedarfsangepassten Leukozytenextravasation bei Entzündungsprozessen differenzieren. Darüber hinaus ist bekannt, dass Monozyten zu geringen Anteilen kontinuierlich das Gefässsystem verlassen und sich zu Gewebsmakrophagen differenzieren (Van Furth, 1982). Der allgemeine Konsensus bezüglich des Ablaufs der transendothelialen Migration postuliert eine leukozytäre Migration durch die endothelialen interzellulären Verbindungsstellen hindurch. Speziell für Neutrophile konnte gezeigt werden, dass diese bevorzugt an Endothelabschnitten transmigrieren, an denen drei Endothelzellen aneinanderlappen (Burns et al., 1997). TJs scheinen an solchen Stellen diskontinuierlich aufgebaut zu sein, dieses ist auch der Fall für einzelne TJ- Abschnitte benachbarter Zellen (Yee und Revel 1975;

Simionescu et al., 1976; Walker et al., 1994). Jedoch ist ein zweiter Transmigrationsweg anzumerken. Dieser soll auf einem Hindurchschleusen von Neutrophilen Granulozyten durch Endothelzellen via Transzytose beruhen (Feng et al., 1998; Carman, 2004). Ebenfalls für humane Lymphozyten ist dieser transzytotische Weg bei kultivierten HUVECs (humane Umbilicalvenen Endothelzellen) beschrieben worden (Millan, 2005). Ein weiterer interessanter Aspekt zur Thematik der transendothelialen Migration ist die Frage ob und in welchem Ausmass dieser Prozess in beiden Richtungen abläuft. So konnte bei Schweinen nachgewiesen werden, dass Lymphozyten Lymphknotenregionen eher über HEV-Regionen verliessen als über Lymphgefässen (Pabst und Binns, 1989). Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass etwa acht Prozent der Lymphozyten in Rattenlymphknoten gefässlumenwärts migrierten (Anderson und Anderson, 1976).

1.5.3. Abrollprozesse

Dieser mehrschrittige Transmigrationsprozess beginnt damit, dass Leukozyten an Endothelschichten entlangrollen. Anhand fluoreszenzmarkierter Lymphozyten konnte dieses Verhalten u.a. im Bereich von HEVs Payerscher Platten der Maus gezeigt werden. Lymphozyten traten in das Stromgebiet der HEVs mit hoher Geschwindigkeit ein, kollidierten immer wieder mit der Gefässwandung und kamen z.T. innerhalb 1/30 Sekunde nach der letzten Kollision zum vollständigen Stillstand. Ein Grossteil der markierten Lymphozyten adhärierte, jedoch lösten sich von diesen die meisten erneut (Bjerknes et al., 1986). Schätzungen gehen dahin, dass einer von vier Lymphozyten, die eine HEV-Region betreten, das Blutgefäss verlassen (Hay, 1977). Für den Rollprozess sind vorwiegend Interaktionen zwischen Selectinen und glykolisierten Liganden verantwortlich (Shimizu et al., 1999). Zu den Selectinen zählen das E-Selectin (Endothel-Selectin), das L-Selectin (Leukozyten-Selectin) und das P-Selectin (Thrombozyten-Selectin) (Rosen und Bertozzi 1994; Vestweber 1993; Lasky, 1992, 1995; Ley und Tedder 1995). L-Selectin wird auf sämtlichen naiven reifen Lymphozyten gefunden und ist wie auch E- und P-Selectin durch Zytokine induzierbar (Doukas und Pober 1990; Leeuwenberg et al., 1990; Wellicome et al., 1990). In die Abläufe dieser Abrollvorgänge sind jedoch neben Selectinen auch Molekülstrukturen involviert, die zur Immunglobulin-Superfamilie zählen, wie das endotheliale Integrin VCAM-1 (Alon et al., 1995). In peripheren Lymphknoten der Maus vermittelt L-Selectin das Entlangrollen am HEV-Endothel und LFA1 die feste Anheftung daran (Warnock, 1998). Das LFA1, welches von den meisten Leukozyten exprimiert wird, muss erst aktiviert werden, um ICAM-1 der Endothelien fest zu binden (Dustin und Springer,

1989). Auch bei Granulozyten, die L-Selectin exprimieren, ist dieses Entlangrollen in HEV-Regionen beschrieben worden. Doch waren diese nicht befähigt am Endothel zu haften (Warnock, 1998). Eine Blockade dieses L-Selectin-Mechanismus resultierte in einer starken Reduktion der Abrollvorgänge in den HEV-Regionen (von Andrian und M'Rini, 1998).

1.5.4. Chemokine stützen den Vorgang

der transendothelialen Migration nachhaltig. Für einige Chemokine ist nachgewiesen worden, dass diese über eine Heparinbindedomäne an endotheliale Proteoglykane gekoppelt auf der Endotheloberfläche präsentiert werden (Tanaka et al., 1993). Ein Hinweis für die Bedeutung von Chemokinen bei Prozessen der Transmigration von Leukozyten gelang in vivo durch eine starke Inhibierung der Lymphozytenadhäsion an HEV-Endothel (Bargatze, 1993) und des lymphozytären Homings in HEV-Regionen unter Behandlung mit Pertussistoxin. Dieses wirkt als Inhibitor G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, einschliesslich der Chemokin Rezeptoren (Spangrude, 1984). Sowohl Adhäsionsvorgänge von Lymphozyten als auch Transmigrationsabläufe sind u.a. LFA1-abhängig, welches wiederum durch bestimmte Chemokine aktiviert wird (Campbell, 1998). Wiederholt konnte gezeigt werden, dass Chemokine, die durch HEV-Endothel produziert werden oder aber zumindest daran haften, nachhaltig Migrationsprozesse von Lymphozyten steuern (Cyster, 1999; Kunkel und Butcher, 2002). Dabei unterscheidet sich die Chemokinsteuerung zwischen B- und T-Lymphozyten, wie sich der Abbildung 5 (S.16) entnehmen lässt. Doch letztlich besteht auch hier noch Unklarheit über regulierende Mechanismen. In-vitro Experimente zeigten Lymphozytentransmigrationen durch eine endotheliale Zellschicht ohne Anwendung eines chemotaktischen Gradienten, unter hydrodynamischen Strömungsbedingungen (Cinamon, 2001).

1.5.5. Feste Adhäsion

Die Vermittlung einer festen Haftung von Leukozyten an Endothelien geschieht vorwiegend durch Wechselwirkungen zwischen Integrinen der Leukozyten und endothelialen Molekülstrukturen, die der Immunglobulin Superfamilie zuzuordnen sind. Die Integrine $\alpha 4 \beta 1$ (VLA4), $\alpha L \beta 2$ (LFA1), Mac-1 und $\alpha 4 \beta 7$ spielen in der Interaktionsabfolge zwischen Leukozyten und Endothelzellen eine bedeutende Rolle (Larson und Springer, 1990; Hu et al., 1993; Lobb und Hemler, 1994; Stewart et al., 1995). Die Integrinaktivität kann auf verschiedene Weise moduliert werden. Durch Veränderung der Integrinaffinität (Ginsberg et al., 1992), durch Assoziation mit dem Zytoskelett (Kucik et al., 1996) und durch Integrinvernetzung (van Kooyk et al., 1994).

1. Einleitung

Zu den Liganden dieser Integrine, die oft der Ig-Superfamilie angehören, zählen z.B. ICAM-1, ICAM-2 (an LFA1 bindend) und VCAM-1 (an VLA-4 bindend). Dabei ist ICAM-1 und VCAM-1 im Rahmen von Entzündungsprozessen durch Mediatoren wie LPS, $\text{TNF } \alpha$ und IL-1 als hochreguliert beschrieben worden (Dustin et al., 1986; Wellicome et al., 1990).

Table 1 | **Multi-step adhesion cascades in lymph-node HEVs determine homing specificity**

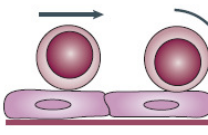
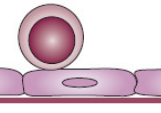
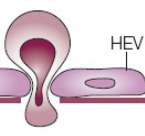
	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
	Rolling	Activation	Adhesion	Transmigration
				
	L-selection: PNAD	B cells CCL21: CCR7 CCL12: CXCR4 T cells CCL21: CCR7 (CCL12: CXCR4)	LFA1: ICAM1	
Naive B cells	Yes	Yes	Yes	Yes
Naive or central memory T cells	Yes	Yes	Yes	Yes
Monocytes/Neutrophils	Yes	No	No	No
Effector memory or effector T cells	No	No	No	No

Abb. 5: Transmigrationsprozesse im Bereich von HEVs (nach von Andrian und Mempel, 2003).

Naive B-Zellen, sowie naive und zentrale T-Gedächtniszellen beginnen mit dem Rollvorgang durch Bindung von L-Selectin an ein Peripheres Node Adressin (PNAD). Das HEV-Endothel präsentiert den rollenden Lymphozyten CC-Chemokin Ligand 21 (CCL21) und zu einem geringeren Ausmass neben CCL19 auch CXCL12. CCL21 und CCL19 aktivieren CC-Chemokin Rezeptor 7 (CCR7). Dies wiederum induziert schnelle G alpha Signalkaskaden und die Festhaftung der Lymphozyten über LFA1 an ICAM1 oder ICAM2. B-Zellen aktivieren LFA1 auch durch CXCL12 bedingte Stimulierung von CXCR4. Das beschränkte Muster von Adressatmolekülen stellt eine selektive Rekrutierung von Lymphozyten sicher. Die meisten myeloiden Zellen exprimieren L-Selectin und LFA1 aber weder CCR7 noch CXCR4. Somit können diese Leukozyten zwar rollen, jedoch nicht festhaften. Sowohl aktivierte Effektor T-Zellen als auch aktivierte Gedächtniszellen sind L-Selectin negativ und sind somit nicht fähig den Rollprozess zu absolvieren.

1.5.6. Diapedese

Der letztliche Vorgang des Durchwanderns leukozytärer Zellen der Gefässwandung ist weitgehend unklar. In diese Prozesse verwickelt sehen Raymond et al., (2004) die Rolle der Nectin-artigen Moleküle und Nectine wie CD155. Ob dieses tatsächlich der Fall ist, insbesondere auch im Hinblick auf das murine Ortholog Tage4 und ob sich diese Hypothese u.a. auch auf lymphozytäre Zellen generalisieren lässt, verbleibt aufzuklären.

1.6. Interaktion von Nectinen und Nectin-artigen Molekülen mit Leukozyten

1.6.1. Über DNAM-1 mit NK-Zellen

Bottino et al. gelang es 2003 den PVR und auch Nectin-2 als Liganden für DNAM-1 zu identifizieren. Humane NK-Zellen können demnach über DNAM-1 (CD226) spezifisch

mit dem PVR und dem Nectin-2 (PRR2; CD112) der Zielzellen binden. DNAM-1 (DNAX akzessorisches Molekül 1; CD226) ist ein transmembranes Glykoprotein, welches zur Ig-Superfamilie zählt und in Adhäsions- sowie Signalprozesse von Leukozyten involviert ist. DNAM-1 besteht im extrazellulären Bereich aus zwei Ig-artigen Domänen und einem zytoplasmatischen Schwanz, der drei Tyrosinreste trägt (Shibuya, 1996). DNAM-1 wird im menschlichen Organismus neben NK Zellen auch auf Monozyten, Thrombozyten, sowie (und das ist für diese Arbeit von Bedeutung) auf sämtlichen T-Lymphozyten konstitutiv exprimiert (Shibuya, 1996, 1999). Darüber hinaus ist DNAM-1 auch bei Prozessen der Plättchenaggregation beteiligt (Kojima, 2003). Die funktionelle DNAM-1 Interaktion mit dem PVR und Nectin-2 wurde von Bottino et al. u.a. durch zytolytische Assays ergründet: Hamster CHO-K Zellen wurden dabei mit dem PVR und Nectin-2 transfektiert (Zielzellen) und anschliessend mit NK Zellen (Effektorzellen) zusammengebracht. Eine Maskierung durch murine Antikörper gegen DNAM-1 dieser Effektorzellen oder den PVR und das Nectin-2 der Zielzellen konnte eine Zytolyse hemmen bis nahezu unterbinden. DNAM-1 induziert eine NK-Zell vermittelte Zytotoxizität durch spezifische Interaktion mit dem PVR. Diese Zytotoxizität korrelierte mit der Expression von CD155 und Nectin-2 auf den Tumorzellen. Sie diskutierten, dass normale Zellen über ein normales Repertoire an HLA-Klasse1 Molekülen verfügen und es somit nicht zu einer NK-Zell vermittelten Zytolyse komme, anders als bei Tumorzellen. Die DNAM-1 Funktion ist zudem abhängig von der LFA1 (CD18/CD11a) Expression. Die beiden Moleküle sind in normalen Zellen eng miteinander assoziiert (Shibuya, 1999). Über die LFA1-Moleküle ist bekannt, dass sie für die feste Adhäsion von Leukozyten ans Endothel bedeutsam sind (Springer, 1994; vgl. 1.5.5., S.15). Interessanterweise zeigt sich die Funktion der NK-Zellen von Patienten, die unter dem Leukozyten Adhäsions- Defizienz Syndrom (LAD1) leiden, denen somit LFA1 fehlt, die zugleich jedoch DNAM-1 besitzen, gestört (Shibuya, 1999). Eine Kreuzvernetzung des DNAM-1 Moleküls resultiert in einer Fyn-vermittelten Tyrosin-Phosphorylierung und somit in der Triggerung der NK-Zell Zytotoxizität (Shibuya, 1996).

1.6.2. Über DNAM-1 mit Monozyten, Rolle bei Transmigrationsprozessen

Humane Monozyten wechselwirken über DNAM-1 mit dem PVR und Nectin-2 von HUVECs. Reymond et al. beschrieben 2004 anhand eines in-vitro Modells der transendothelialen Migration (TEM) unter Verwendung humaner Umbilicalvenen-Endothelzellen, eine nahezu vollständige Inhibierung des Migrationsvorgangs (TEM) von Monozyten nach Einsatz von murinen Antikörpern gegen das DNAM-1 dieser Monozyten. Zu einer solchen Inhibierung kam es auch bei der Verwendung von

Antikörpern gegen den PVR der HUVECs allein. Bei ausschliesslicher Inkubation der HUVECs mit anti DNAM-1 Antikörpern zeigte sich keine deutliche Blockade, DNAM-1 findet sich dort auch nur sehr schwach exprimiert.

Reymond et al. konnten zeigen, dass sowohl der PVR, als auch Nectin-2 direkt mit DNAM-1 interagieren, dabei ist der endotheliale PVR der Hauptligand für monozytäres DNAM-1. Die Bindung von DNAM-1 zum PVR und zu Nectin-2 ist LFA1-unabhängig. DNAM-1 bindet spezifisch im Bereich der interendothelialen Verbindungen an denen der PVR exprimiert wird. Das Verteilungsmuster des PVR ähnelt dem von Nectin-2 und beta-Catenin. Reymond et al. beschreiben darüber hinaus ein Festhaften von Monozyten an der Endotheloberfläche im Bereich interzellulärer Verbindungen nach Behandlung mit Antikörpern gegen entweder den PVR der Endothelschicht oder gegen DNAM-1 der Monozyten. Dieses sei vergleichbar mit der Transmigrationsinhibierung durch Einsatz von Antikörpern gegen CD31 (Muller, 1993). Sowohl die V- als auch die C-Domäne des PVR ist für die Interaktion mit DNAM-1 von Bedeutung, da eine TEM-Blockierung bei Verwendung von Antikörpern gegen diese Domänen erfolgten. Eine Blockierung der Transmigration von Monozyten durch den HUVEC Monolayer unter Einsatz von murinem Antikörper gegen Nectin-2 der HUVECs liess sich jedoch nicht erzielen, wenngleich Nectin-2 von den HUVECs stark exprimiert wurde. Als Gründe für diesen Sachverhalt wurden u.a. unterschiedlich aktive Zustände des Nectin-2 Moleküls diskutiert. Zusätzlich kann die Bindung von DNAM-1 zum PVR und zu Nectin-2 durch komplexe Regulationsmechanismen der Endothelzellen gesteuert sein. Die Interaktion des leukozytären DNAM-1 mit endotheliale PVR könnte in der Frühphase des Diapedeseprozesses erfolgen, vergleichbar zu den Pecam-1-abhängigen Vorgängen während der Diapede (Muller et al., 1993).

1.6.3. Über CD96 mit NK-Zellen

Humane NK Zellen wechselwirken über CD96 mit dem PVR von Zielzellen. Fuchs et al. konnten 2004 zeigen, dass mit CD96 (Tactile; T cell activated increased late expression, Wang, 1992) ein weiterer humaner NK-Zell-Rezeptor mit dem PVR in Wechselwirkung treten kann. Dabei vermittelt CD96 die NK-Zell-Adhäsion an CD155 exprimierende Zielzellen über den PVR. Zudem stimuliert CD96 die Zytotoxizität aktivierter NK-Zellen und ermöglicht die Übernahme des PVR der Zielzellen (Fuchs, 2004). CD96 gehört der IG-Superfamilie an. Es besteht aus einer Ektodomäne, die drei Ig-Domänen und einen langen serin-, threonin-, prolinreichen Abschnitt umfasst (Wang, 1992). CD96 findet sich auf peripheren T-Zellen sowie NK-Zellen schwach exprimiert, nicht jedoch auf B-Lymphozyten (Wang et al., 1992).

1.6.4. Zusammenfassung

Sowohl CD96 als auch CD226 gehören der Ig-Superfamilie an und ähneln in Ihrer molekularen Struktur dem PVR. CD96, DNAM-1, PVR teilen eine gewisse Sequenzübereinstimmung unter sich selbst und auch im Vergleich zu anderen Vertretern der Nectine und Nectin-artigen Molekülfamilie (Mendelsohn, 1989; Wang, 1992; Shibuya, 1996).

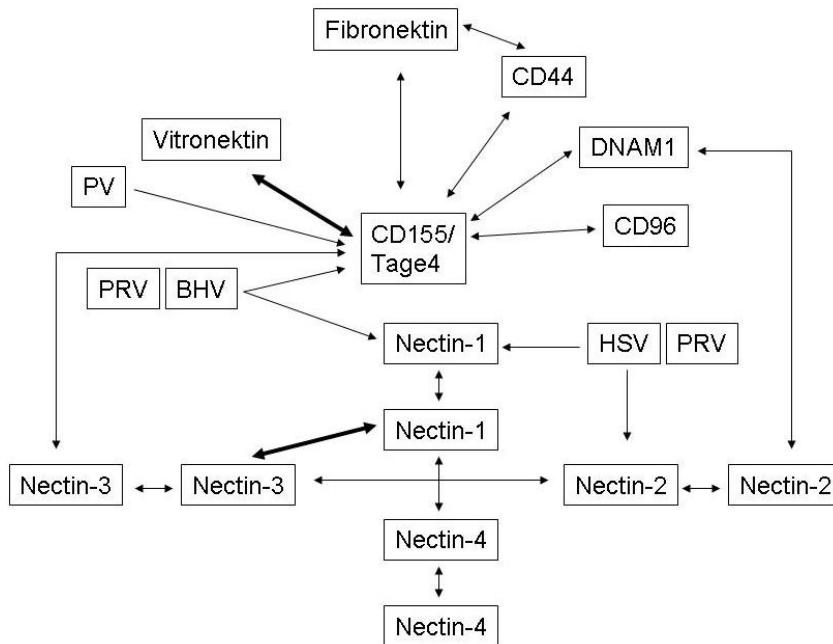


Abb. 6: Interaktionsdiagramm von CD155/Tage4. Poliovirus: PV; Pseudorabiesvirus: PRV; Bovines Herpesvirus: BHV; Herpes Simplex Virus: HSV. Die kräftigen Pfeile kennzeichnen eine verhältnismässig starke Wechselwirkung. Einschränkungen: Murines CD155 (mCD155/Tage4) dient nicht als Rezeptor des PV, doch ist es Eintrittsvermittler für PRV und BHV (s.o.). Eine mögliche Interaktion von murinem Tage4 mit CD96, DNAM-1, CD44, Fibronectin ist noch nicht geklärt.

Reymond et al. konnten zeigen, dass neben Pecam-1 (Muller, 1993; Bogen, 1994; Liao, 1997; Mamdouh, 2003), JAMs (Martin-Padura, 1998; Del Maschio, 1999; Ostermann, 2002) und CD99 (Schenkel, 2002), nun auch die Nectine, als vierte Molekülfamilie im Bereich endothelialer Zellzwischenverbindungen, Abläufe bei der Leukozytendiapedese beeinflussen.

1.7. Zielsetzung

Nicht zuletzt aufgrund der von Reymond et al. gemachten Entdeckungen (wie oben beschrieben) lag die Zielsetzung dieser Arbeit nun in der Aufklärung der Rolle des

murinen PVR Orthologs (Tage4, mCD155, (mNecl-5)) bei Transmigrationsprozessen muriner Lymphozyten.

- *In vitro* war beabsichtigt die Rolle von Tage4 (mCD155) in Lymphozyten-transmigrationsassays zu untersuchen. Darüber hinaus wollte man Endothelstimulationsexperimente zur weiteren Klärung der Regulierbarkeit von mCD155 durchführen.
Dazu war die Etablierung einer murinen Primärendothelzellkultur erhofft, um die Vorgänge an Zellen untersuchen zu können, die möglichst naturgetreu erhalten wären.
- *In vivo* sollten Adoptive Lymphozytentransfers in einem Modell zur Kurzzeit-transmigration Aufschluss über eine mögliche Teilfunktion des mCD155 Moleküls geben. Dafür war beabsichtigt die Physiologie naiver Lymphozyten und deren Homingverhalten zu nutzen, um in mCD155 Knock-out Mäusen sowie unter Einsatz von anti mCD155 Antikörpern diese Vorgänge zu untersuchen.
- Zum besseren Verständnis der Funktionen von murinem CD155, mCD112 war es zudem erforderlich dessen endotheliale Expressionsmuster zu studieren, was zudem dabei helfen könnte die Orthologie von CD155/Tage4 besser beurteilen zu können.
- Auch war es von Interesse, ob sich die Expression von mCD155, mCD112 auf Endothelzellen durch eine Stimulation von Entzündungsprozessen mittels LPS regulieren liesse.

2. Material

2.1. Antikörper

Spezifität (gerichtet gegen)	Klon	Isotyp	Konjugat	Herkunft
------------------------------	------	--------	----------	----------

Primäre Antikörper

CD3e (Ar. Ham. a. Maus)	„145-2C11“	IgG1, κ	Cy5	BD Pharmingen
CD4 (Ratte a. Maus)	„RM4-5“	IgG2a, κ	PerCP	BD Pharmingen
CD8 β (Ratte a. Maus)	„H35-17.2“	IgG2b, κ	PE	BD Pharmingen
CD31 (Ratte a. Maus)	„MEC13.3“	IgG2a, κ	FITC	BD Pharmingen
CD31 (Ratte a. Maus)	„390“	IgG2a, κ	FITC	BD Pharmingen
CD45 (Ratte a. Maus)	„30F11“	IgG2b	PE	Caltag Lab.
CD112 a. Maus)	„6B3“	IgG2a	/	E. Kremmer, München
CD155 a. Maus)	„3F1“	IgG2a	/	E. Kremmer, München
CD155 a. Maus)	„8A6“	IgG2a	/	E. Kremmer, München
B220 (Ratte a. Maus)	„Tib146“	IgM	Cy5	LGC Promochem/ATCC
LSEC (Ratte a. Maus)	„ME-9F1“	IgG2a	bio	Miltenyi

MACS-beads

LSEC-beads (Ratte a. Maus)	„ME-9F1“	IgG2a	/	Miltenyi
FITC-beads (Ratte a. Maus)	k.A.	IgG1	/	Miltenyi

Isotypkontrollen

Isotypkontr. (Ratte a. Maus)	„R35-95“	IgG2a, κ	FITC	BD Pharmingen
Isotypkontr. (Ratte a. Maus)	„1H4“	IgG2a	/	E. Kremmer, München

Sekundäre Antikörper

Maus a Ratte Cy5	F(ab') ₂ k.A.	IgG	Cy5	Jackson
SA Cy5 (Ratte a. Maus)	„SA10“ k.A.	k.A.	Cy5	Caltag Lab.

2.2. Chemikalien

- Aceton: Merck
- Ammoniumchlorid: Sigma
- CFSE: Sigma
- Collagen R: Serva
- D(+) Glucose: Sigma

2. Material

- DAPI: Sigma
- Dinatriumhydrogenphosphat: Sigma
- Ethanol: Merck (u.a.)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA): Sigma
- Fructose: Sigma
- Gelatine (Typ A, porcine skin) : Sigma
- Gey's balanced salt solution (GBSS): Sigma
- Glycin: Sigma
- Hepes: Sigma
- Kaliumchlorid: Sigma
- Kaliumhydrogencarbonat: Sigma
- Kaliumdihydrogenphosphat: Sigma
- L-Alanin: Sigma
- L-Asparaginsäure: Sigma
- L-Glutamin: Sigma
- L-Glutaminsäure: Sigma
- Lipopolysaccharide (LPS) Serotyp 026:
B6 aus Escherichia Coli: Sigma
- L-Serin: Sigma
- L-Threonin: Sigma
- Lympholyte M: Cedarlane
- Magnesiumchlorid: Sigma
- Matrigel Substanz: BD Pharmingen
- Methanol: Merck
- Moviol: Sigma
- Natriumchlorid: Sigma
- Natriumdihydrogenphosphat: Sigma
- Natriumhydrogencarbonat: Sigma
- Natriumhydroxid: Sigma
- Nycodenz: Axis-Shield
- Paraformaldehyd: Sigma
- Propidiumiodid (PI): Sigma
- Sucrose: Sigma
- Tris-HCl: Sigma
- Trypanblau: Sigma
- Tween-20: Merck-Schuchard
- 1x Erylyse Reagenz: 899mg NH₄Cl, 0,1g KHCO₃, 3,2mg EDTA,
100ml ddH₂O, pH 7,3 (mit 4MNaOH).

2.3. Enzyme/ Inhibitoren

- Collagenase A: Roche Diagnostics
- Collagenase 1A: Sigma
- DNase1: Roche Diagnostics
- Dispase: BD Biosciences
- Trypsin/ EDTA: Sigma

2.4. Geräte

- Autoklavierer: Systec
- Cytospin Cytofuge: Shandon
- FACS-Calibur: BD Biosciences
- FACS-Aria Sorter: BD Biosciences
- Feinwaage: Sartorius
- Kamera Axiovision Cam: Zeiss
- MACS Multistand: Miltenyi Biotech
- Mini MACS Separator: Miltenyi Biotech
- MIDI MACS Separator: Miltenyi Biotech
- Mikroskop Axiovision: Zeiss
- Mikroskop: Leica/ Olympus
- Multifuge 3F3: Heraeus
- Neubauer-Zählkammer: Brand
- Pipettierhilfe accu-jet: Brand
- Serologische Pipetten (1µl, 100µl, 1000µl): Falcon
- Sterilbank, Herasafe: Heraeus
- Vibrationsschüttler Vortex Genie2: Scientific Industries
- ViCell Zählgerät: Beckman Coulter
- Zellkulturschrank: Heraeus

2.5. Medien, Zusätze und Sera

- D-MEM(1X) 1g /L Glukose., Sodium Pyr.: Invitrogen
- D-MEM(1X) 4,5g/L Glukose., Sodium Pyr.: Invitrogen
- EGM 2 MV: Cambrex
- FBS: Biochrom
- FCS: Invitrogen
- Mausserum: Invitrogen
- Penicillin/ Streptomycin: Invitrogen
- RPMI1640 L-Glutamin: Invitrogen
- RPMI1640 L-Glutamin 25mM HEPES: Invitrogen
- Rattenserum: Invitrogen

2.6. Puffer

- 1x PBS: Biochrom
- 1x TBST: 100ml 10x TBST + 900ml ddH₂O + 1ml Tween 20 (0,05% Tween).
- MACS Puffer: PBS, 1% FCS, 2mM EDTA
- FACS Puffer: PBS, 3% FCS
- Fixierungspuffer: PBS, 2% PFA
- Kalziumfreier Puffer: Sterilfiltration über 0,2µm-Filter; pH 7,4.

0,1 mM L-Asparaginsäure	20 mM Fructose
0,2 mM L-Threonin	197 mM Sucrose
0,3 mM L-Serin	3 mM Kaliumchlorid
0,5 mM Glycin	0,7 mM Natriumdihydrogenphosphat
0,6 mM L-Alanin	0,5 mM Magnesiumchlorid
0,9 mM L-Glutaminsäure	10 mM Hepes
0,9 mM L-Glutamin	24 mM Natriumhydrogencarbonat
20 mM D(+) Glucose	

2.7. Software

- Adobe Photoshop
- Cellquest BD
- Mac OS
- Winlist 5.0
- Microsoft Excel
- Microsoft Windows 2000 Professional
- Microsoft Word

2.8. Sonstige Verbrauchsmaterialien

- Deckgläser: Menzel
- Eppendorftubes (1,5ml): BD Falcon
- Glasobjektträger: Menzel
- MACS Säulen (MS, LS): Miltenyi Biotech
- Pipettenspitzen: BD Biosciences
- Spritzen (1ml): BD Biosciences
- Spritzennadelaufsätze (braun + gelb): BD Biosciences
- Strainer, Filtereinsätze (für 50ml Röhrchen): BD Falcon
- Sterile Pipettenspitzen: BD Biosciences
- Zellkulturplatten (6, 12, 24, 96 Wells): BD Falcon
- Zellkulturschalen (35x10mm, 60x15mm): BD Falcon
- Zentrifugenröhrchen (konisch 15ml/ 50ml): BD Falcon

2.9. Tiere (Spezies: Maus)

2.9.1. Tierstämme

- BALB/c : Charles River
- C57bl6 : Charles River
- Eigenzucht: CD155Knock-out, Wildtypkontrolle (gemischtgenetische Tiere: 129/sv, BALB/c)

Die im weiteren Verlauf dieser Arbeit dargestellten Daten (etwa sämtliche Antigenexpressionsstudien für LSEC-Antigen, mCD112 und mCD155 von endothelialen Zellen, sowie ein Teil der Adoptiven Lymphozytentransfers) wurden anhand von Zellanalysen aus 6-8 Wochen alten, weiblichen BALB/c-Mäusen erhoben.

Ausnahmen von dieser Angabe finden sich in den jeweiligen Kapiteln vermerkt.

3. Methoden

3.1. Einzelzellpräparationen (zur FACS-Analyse und/ oder Sortierung mittels MACS oder FACS)

3.1.1. Allgemeines

Ziel war die Präparation von endothelialen Zellen zum Zweck der Untersuchung auf eine mCD112, mCD155 und im weiteren Verlauf auch auf eine LSEC-Expression, sowie der Ermöglichung einer späteren Sortierung dieses Zelltyps zum Zweck der Generierung einer Primärkultur.

Zur Gewährleistung einer Vergleichbarkeit des mCD112, mCD155 und LSEC-Expressionsprofils wurden stets mehrere verschiedene Organe gleichzeitig zur FACS-Analyse präpariert (vgl. 3.1.1. – 3.2.3.). Da es jedoch nicht möglich war sämtliche der im Ergebnisteil unter 4.2.1. und 4.5.1. dargestellten Organe gleichzeitig in nur einem Experiment parallel aufzubereiten, wurden eine Reihe Experimente dieser Art durchgeführt und dabei die miteinander verglichenen Organe variiert.

Die Präparation von Einzelzellen machte es erforderlich, wenn möglich sämtliche Präparationsschritte bei 4°C - 6°C durchzuführen. Dies bedeutete den Einsatz von gekühlten Reagenzien und das Lagern der Zellen auf Eis. Die verwendeten Enzymtypen und Enzymkonzentrationen wurden aus bereits etablierten Labormethoden des Instituts zum enzymatischen Gewebsaufschluss übernommen. Zudem wurden die Präparations- und auch Antikörperfärbeschritte in/mit Medium (DMEM/RPMI-1640; jeweils mit HEPES gepuffert und pH adjustiert) durchgeführt. Andernfalls bestand Gefahr der frühzeitigen Schädigung der Proben. Abweichungen von dieser Vorgehensweise finden sich in der jeweiligen Beschreibung.

3.1.2. Zellpräparation aus Herz-, Lungen-, Nieren- und Hirngewebe

Die Mäuse wurden in CO₂ Atmosphäre eingeschläfert. Zur Präparation der Organe wurde ein weitleumiges Thoraxfenster geschaffen. Entlastungsschnitte wurden mit einem Skalpell an der Vena Cava Inferior, den Carotiden und den Axillargefäßen gesetzt. Danach erfolgte die Perfusion des gesamten Gefäßsystems mit etwa 10-15ml PBS bei Raumtemperatur (RT) durch Punktion des linken Ventrikels mit einer 20g Nadel. Es wurde langsam perfundiert. Zur gründlichen Lungenperfusion wurde die Perfusionsspritze in den linken Vorhof gebracht. Zur gründlichen Herzperfusion erfolgte ein separates Spülen der Vorhöfe und Kammern. Bei Nierenpräparationen wurde das Abdomen durch Längsschnitt eröffnet. Die Präparation des Hirngewebes erfolgte durch Dekapitation mit anschließender vorsichtiger Entfernung der Kalotte. Meningeale Reste wurden mittels Pinzette beseitigt. Der Perfusionserfolg wurde durch

Beobachtung eines deutlichen Aufhellens vom Lungen- und/ oder Nierengewebes kontrolliert. Gegebenenfalls wurde nachgespült. Die zu präparierenden Organe wurden dann mittels Schere in Plastikschaalen zerkleinert. Anschliessend wurden diese Gewebstücke mit der Verdauungslösung vermengt und in 15ml Falcon-Röhrchen verbracht. Das Volumen der Verdauungslösung betrug pro Organ je 5-6ml. Sie setzte sich zusammen aus RPMI 1640 mit 10% FCS, 0,025% Collagenase A und 0,0025% DNase1. Der Organverdaу erfolgte dann im Wasserbad bei 37°C für 40 Minuten. Das Sediment wurde gelegentlich manuell aufgeschüttelt. Ein Anteil von ca. 10% FCS in der Verdauungslösung ist notwendig, um unspezifische Enzymwirkungen sowie die Trypsinfunktion zu unterbinden. Denn es besteht die Gefahr eines Antigenandaus. Der Verdaу wurde danach durch Gazenylonmembran filtriert. Die angedauten Organbestandteile wurden auf diesem Filter vorsichtig mit einem Spritzenstempel zerrieben, um die Zellausbeute zu erhöhen. Die vollständige Homogenisierung verbliebener Organbestandteile etwa durch starkes Zerquetschen bewirkte lediglich die Freisetzung von Bindegewebsgrundsubstanz und Gewebstrümmern, jedoch keinen Zugewinn an Zellausbeute. Das Nachspülen erfolgte mit RPMI 1640 (10% FCS). Zusätzlich wurden dieser Zellsuspension dann etwa 500µl reines FCS auf etwa 15 ml Filtrationsvolumen zugesetzt. Das Filtrat wurde stets auf Eis prozessiert. Diese Massnahmen, zusammen mit der starken Verdünnung der Ausgangsverdaуsuspension sollten die Enzymwirkungen unterbinden. Sämtliche Reagenzien, die nach diesem Verdaуschritt zur Weiterverarbeitung der Zellsuspension verwendet wurden, waren auf etwa 4°C vorgekühlt. Das Filtrat wurde dann in neue 15ml Falcon-Röhrchen überführt. Danach erfolgte eine Pelletion für 10 Minuten bei 350g, 4°C. (Der Zellverlust durch Verbleib im Überstand liegt bei etwa 10-15%, bei einem Probenvolumen von 15ml, nach einmaliger Pelletion). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 500µl aufgenommen. Danach erfolgte die Bestimmung der Zellzahl durch Verwendung einer Neubauer-Zählkammer. Das weitere Vorgehen zur Zellzahlbestimmung von Zellsuspensionen wird unter Punkt 3.1.5. beschrieben.

3.1.3. Zellpräparation aus Milz- und Lymphknotengewebe

Hier werden lediglich die Unterschiede bei der Präparation dieser Organe geschildert. Bei der Lymphknotenpräparation wurde auf eine Vermeidung der Mitnahme von umgebendem Fett- und Bindegewebe geachtet. Um genügend Zellmaterial zu erhalten, wurden mehrere Lymphknoten gepoolt. Dazu zählten cervicale, axilläre, brachiale, inguinale, popliteale, paraaortale und der Mesenterische Lymphknoten. Bei einer Milzpräparation wurde über den linken Ventrikel mit 10-20ml PBS

3. Methoden

(Raumtemperatur) perfundiert. Auch hier erfolgten zuvor Entlastungsschnitte an der Vena Cava Inferior. Die Organe wurden in 6- Wells auf Nylongaze (ca. 1cm²) platziert und unter sorgfältigem, vorsichtigem Zerdrücken mittels Spritzenstempel prozessiert. Ein Zerreiben der Organe wurde vermieden, da sich zeigte, dass dadurch die Viabilität auf dieser Präparationsstufe reduziert wurde. Die auf den Nylongazestücken haftenden Festgewebsanteile wurden dann mit Medium (RPMI 1640 10% FCS) gründlich nachgespült. Anschliessend wurden diese mitsamt Gaze in 15ml Falcon-Röhrchen überführt (praktischerweise mittels Pinzette). Der Verdau erfolgte dann wie bereits unter Punkt 3.1.2. beschrieben. Anschliessend erfolgte der Filtrationsschritt. Zur Erhöhung der Zellausbeute wurden die Nylongazestücke aus den Verdauansätzen auf neue, filternde Gazemembran verbracht und gründlich mit Medium gespült. Die Gewebsbestandteile wurden auf dieser Gaze vorsichtig zerrieben. Eine vollständige Homogenisierung verbliebener Organbestandteile etwa durch übertriebenes Pipettieren oder Zerreiben bewirkte lediglich die Freisetzung von Bindegewebsgrundsubstanz. Diese Faserfetzen waren besonders problematisch bei einer eventuell bevorstehenden Sortierung. Der weitere Präparationsablauf erfolgte wie unter 3.1.2. beschrieben.

3.1.4. Zellpräparation aus Lebergewebe

Bei der Leberpräparation zur Gewinnung von Einzelzellsuspension mit dem Ziel der FACS-Analyse endothelialer Zellen oder aber deren Sortierung galt es Folgendes zu beachten: Thorax und Abdomen wurden weiltumig geöffnet. Die Vena Cava Inferior wurde dann im Thoraxraum auf Höhe des Zwerchfelldurchtritts durchtrennt. Anschliessend wurde die Pfortader mittels 0,4mm Spritzenaufsatz punktiert. Hier nun kann man zwei verschiedene Präparationsmethodiken unterscheiden. Zur alleinigen FACS-Analyse wurden langsam ca. 10-20 ml PBS (RT) injiziert, bis sich das Lebergewebe deutlich von rot-bräunlich zu gelb-weiss aufhellte. Die Leber wurde entnommen und in einer Plastikschaale mittels Skalpells weitgehend zerkleinert. Der Verdau erfolgte pro Einzelorgan in 10ml RPMI 1640 mit 10% FCS, 0,025% Collagenase A und 0,0025% DNase1 für 40 Minuten bei 37°C im Wasserbad unter gelegentlichem Schütteln. Der Verdau wurde durch Nylongaze filtriert und mit reichlich Medium (RPMI 1640 mit 10% FCS) gespült. Zusätzlich erfolgte dann je 50ml Falcon-Röhrchen die Zugabe von FCS. Zellen einer Leber wurden auf zwei 50ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Die verdaubedingte Freisetzung grosser Mengen an Bindegewebsgrundsubstanz und Zellschutt machte ein Aufreinigungsverfahren notwendig. Dazu wurden in Anlehnung an ein Protokoll der Arbeitsgruppe um Hideki Ohdan (Onoe et al., 2004) mehrere Zentrifugationsschritte durchgeführt. Hierdurch

sollten vorwiegend Hepatozyten sowie Gewebstrümmer entfernt werden. Dazu erfolgte eine dreimalige Zentrifugation der Suspensionen bei je 50g für eine Minute. Die Überstände wurden jeweils abgesaugt und die Pellets resuspendiert. Die Falcons wurden jeweils mit PBS (3%FCS) aufgefüllt. Die so erhaltene Zellsuspension wurde zur FACS-Analyse dann gemäss Punkt 3.2.2. gefärbt und entsprechend Punkt 3.2.3 eingemessen und analysiert. Zur Separation von Lebersinusendothelzellen wurde ein Protokoll der Arbeitsgruppe um Professor Knolle (Heidelberg) verwendet. Dazu wurde die Leber mit 5ml eines möglichst frisch zubereiteten kalziumfreien Puffers perfundiert, dem 50 µl Collagenase (Stocklösung 50mg/ ml in GBSS) zugesetzt war. Die Leber wurde entnommen und in einem Plastikgefäss mittels Skalpell sorgfältig zerkleinert. Der Verdau erfolgte dann in einem 50ml Falcon-Röhrchen in ca. 2ml Verdaulösung. Diese wurde stets frisch angesetzt und bestand aus 2ml GBSS und 16µl Collagenase (Stocklösung 50mg/ ml in GBSS). Verdaut wurde für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad unter gelegentlichem Schütteln. Der Verdau wurde anschliessend durch Nylongaze filtriert, mit GBSS nachgespült und das Filtrat auf zwei 50ml Falcon-Röhrchen verteilt. Anschliessend erfolgte eine Pelletion für 10 Minuten bei 1500 U/min bei 4°C. Die Überstände wurden abgesaugt die Pellets mit GBSS resuspendiert und in einem 50ml Falcon-Röhrchen vereinigt. Es wurde ein zweites Mal zentrifugiert. Das nun erhaltene Pellet wurde in der Restflüssigkeit resuspendiert und das Volumen bestimmt. Die Zellsuspension wurde dann mit 30-prozentiger Nycodenzlösung (Nycodenz in GBSS gelöst) gemischt. Das Volumen der Nycodenzlösung sollte das 1,23-fache des Zellsuspensionsvolumens betragen. Dieses Gemisch wurde dann in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt und mit GBSS überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte dann für 20 Minuten bei 1400g und RT ohne Bremse und mit einer Beschleunigung vom Betrag sieben. Die weitere Präparation wird in Punkt 3.3.3. beschrieben.

3.1.5. Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer (improved)

Dem jeweiligen Probenvolumen wurden jeweils 10µl entnommen und mit 490µl PBS verdünnt. Hiervon wurden 10µl in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau gemischt. Gegebenenfalls erfolgte eine weitere Verdünnung. Die Zählkammer besteht aus vier grossen Quadraten, die wiederum in 16 kleine Quadrate unterteilt sind. Nach der Auflage eines Deckglases entsteht ein definiertes Volumen, in welches das Probenvolumen der jeweiligen Zellsuspension eingebracht wird. Die durch Auszählung von vier grossen Zählquadraten gemittelte Zellzahl Trypan-negativer, viabler Zellen multiplizierte man (für die oben beschriebene Verdünnungsvorgabe) mit dem Faktor 1×10^6 ($2 \times 50 \times 10^4$, siehe auch nachstehende Formel) und erhielt so die

3. Methoden

Zellkonzentration der jeweiligen Probe als Zellzahl pro Milliliter. Durch anschliessende Multiplikation dieser Konzentrationsangabe mit dem jeweiligen Probenvolumen liess sich die Gesamtzellzahl der jeweiligen Probe errechnen. Die Zellsuspension (490µl) wurde anschliessend den Antikörperfärbungen zugeführt (siehe Punkt 3.2.2.).

Es gilt: **Zellzahl/ml = n x VF x 10⁴**

wobei: **n** = Anzahl der Zellen innerhalb eines grossen Quadrates (bzw. gemittelter Wert aus mehreren Zählquadraten)

und **VF** = Verdünnungsfaktor

3.2. Endothelzelluntersuchungen mittels Durchflusszytometrie (u.a. Favre et al., 2003; Muczynski et al., 2003; Rauscher et al., 2003; Bailey et al., 2004; Katz et al., 2004; Kutcher et al., 2004; Hisatsune et al., 2005; Stadtfeld und Graf, 2005; Reutershan et al., 2006)

Sämtliche durchflusszytometrischen Messungen erfolgten an einem FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) mit der Software „Cellquest“. Für jede Messung wurden wenigstens 1x10⁴ Ereignisse erfasst. Die Auswertungen der FACS-Daten erfolgten anschliessend mit „Winlist“.

3.2.1. Antikörperfärbungen von Gewebeverdaus

Bei der Antikörperfärbung von Zellen in Einzelzellsuspensionen wurde darauf geachtet eine Zellkonzentration von 1x10⁷ Zellen auf 100µl Einzelprobenvolumen nicht zu überschreiten.

Zur Identifikation muriner endothelialer Zellen mittels Durchflusszytometrie wurde in Anlehnung an Favre et al. (2003), Katz et al. (2004) und vgl. Referenzen unter 3.2. die Kombination aus einem panleukozytären Marker wie CD45 (Ledbetter und Herzenberg, 1979; Thomas, 1989; Johnson et al., 1997; Lagasse et al., 2000) und einem panendothelialen Marker wie CD31 (Vecchi et al., 1994; DeLisser et al., 1994; Suri et al., 1996; Dong et al., 1997; Vanzulli et al., 1997; siehe auch S.2) gewählt. Darüber hinaus wurde auch aus Gründen der zusätzlichen Validierung des endothelialen Charakters (CD31+, CD45-, PI-) Zellen ein Antikörper verwendet, der gegen LSEC-Antigen gerichtet ist. Dieser bindet an Maus-Endothelzellen, einschliesslich Lebersinusendothelzellen, glatte Muskelzellen und Basalmembranen (Harder et al., 1991; Katz et al., 2004).

Da es durchaus eine Interpretationsleistung darstellt, (CD31+, CD45-, PI-) Zellen als Endothelzellen zu bezeichnen, möchte ich sogleich auf das Diskussionskapitel dieser Arbeit verweisen, um so die Bezeichnung putativer endothelialer Zellen im weiteren

Verlauf dieser Arbeit (insbesondere im Ergebniskapitel) vermeiden zu können.

Für sämtliche Antikörperfärbungen zur FACS-Analyse wurden die Färbevolumina bei 50 – 100µl je Einzelprobe gehalten. Die Färbungen erfolgten in 96 Wells mit einer Antikörper-Inkubationszeit von 20-30 Minuten auf Eis. Zwischen den einzelnen Färbestufen und nach der finalen Antikörperinkubationsstufe wurden die Proben 2x mit FACS-Puffer gewaschen. Die Zentrifugationsschritte wurden für 2x 3 Minuten bei 1200 U/min, 4°C durchgeführt. Zur FACS-Analyse wurden die gefärbten Zellen in 50µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Probenröhrchen überführt. Hier nun erfolgt die Beschreibung der einzelnen Färbestufen: Die Zellsuspensionen wurden mit 7% Mausserum (passend für dieses Färbeschema) für 10 Minuten auf Eis geblockt, um nichtspezifische Bindungen über FC-Rezeptoren zu vermeiden. Zur Sicherstellung einer vergleichbaren Färbung wurden für die zu vergleichenden Proben eines jeden Experiments dieselben Antikörperverdünnungen hergestellt. Anschliessend erfolgte die Inkubation mit unkonjugierten Primärantikörpern (anti mCD155: „3F1“, „8A6“; anti mCD112: „6B3“; Isotypkontrolle (IgG2a) für anti mCD155 und anti mCD112 „1H4“). In der zweiten Färbestufe wurden die Zellen mit anti-Primärantikörpern (Sekundärantikörpern) beladen (hier in der weiteren Schilderung mit einem mouse anti-rat Cy5 Antikörper). Nach dieser Stufe erfolgte ein erneuter Serumblock. Diesmal mit 7% Rattenserum für 10 Minuten auf Eis, um die freien Bindungsstellen des Sekundärantikörpers zu sättigen. Nach diesem Schritt erfolgte dann die finale bzw. präfinale Färbestufe mit direktmarkierten Ratten anti-Maus-Antikörpern, bzw. der Kontrollfärbungen. Typische Verwendung fanden dabei „rat anti mouse CD31FITC“ (CD31FITC) und „rat anti mouse CD45PE“ (CD45PE). Eine auf dieser Stufe durchgeführte Inkubation mit anti LSEC (biotinyliert) machte eine zusätzliche Färbestufe mit einem Streptavidin-Fluochrom markierten Antikörper notwendig. Die FSC-SSC Lage CD45+ Zellen wurde zudem mit reinen Lymphozytensuspensionen verglichen, wodurch sich die Zuordnung putativer Lymphozyten in den Gewebsverdaus ergab (vgl. S. 46).

3.2.2. FACS-Messungen und Auswertungen

Um relative Fluoreszenzintensitätsänderungen erfassen zu können, wird zunächst ein jeweiliger Referenzwert mit Negativkontrollen eingestellt. Als Negativkontrollen finden etwa Proben Verwendung, die mit einem jeweiligen Isotypkontrollantikörper, oder solche, die lediglich mit dem jeweils entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert wurden.

Zur Kontrolle der Fluoreszenzsignale der untersuchten Antigencharakteristika der

3. Methoden

endothelialen Zellen sind Isotypkontrollen mitgeführt worden. Lediglich das Signal für LSEC spezifisches Antigen wurde durch alleinige Verwendung des Sekundärantikörpers kontrolliert. Kurz vor der FACS-Analyse wurden die Proben mit 0,7µl Propidiumiodid (PI) (0,5mg/ml) versetzt. Dieses machte den Ausschluss geschädigter Zellen möglich, da der Farbstoff lediglich aufgrund von Membrandefekten eine Anfärbung der genetischen Substanz von Zellen bewirkt. Bei der Probeneinmessung wurde auf ein starkes Strecken des FSC geachtet. Des weiteren ist gerade bei Propidiumiodideinsatz die Kompensation zum Fluoreszenzkanal zwei zu korrigieren. Zur Auswertung verweise ich auf den Ergebnisteil dieser Arbeit.

3.3. Sortierung endothelialer Zellen

3.3.1. Prinzip der MACS-Sortierung (magnetic activated cell sorting) (u.a. Gerritsen et al., 1995; Dong et al., 1997; Izawa et al., 1999; Bowden et al., 2000; Lim et al., 2003; Hida et al., 2004)

Die MACS-Separation beruht darauf, dass MACS-Antikörper, die mit Nano-Magnetit Partikeln gekoppelt sind, an spezifische Antigenstrukturen der Zielzellen binden. Dieses geschieht entweder direkt oder aber indirekt über die an den Zielzellen bereits gekoppelten Primärantikörper. Die mit MACS-Antikörpern versehenen Zellen, die sich in Zellsuspensionen verschiedenster Zelltypen befinden, werden dann auf Plastikseparationssäulen gegeben. Diese Säulen beinhalten eine Art dichten Metallschaumes, in dem sich die mit MACS-beads markierten Zellen anreichern. Diese Anreicherung geschieht dann, wenn die Säulen mitsamt den MACS-bead gekoppelten Zellen unter dem Einfluss eines starken Magnetfeldes stehen. Dazu setzt man die Separationssäulen in den passenden MACS-Magneten. Bei der Magnetischen Zellseparation lassen sich theoretisch zwei verschiedene Selektionsmethoden unterscheiden. Zum einen die Negativselektion, auch Depletion genannt. Damit adhäriert man Zellen, die vom Gros der weiterzuverwendenden Zellarten separiert werden sollen. Die bei dieser Selektionsstrategie verwendeten Säulen sind etwas länger und mit einer grösseren Metallschaumboberfläche versehen, als die Positivselektionssäulen. Somit soll eine verbesserte Depletion gewährleistet werden. Der Durchlauf bei einer solchen Depletion ist dann abgereichert von den selektierten Zellen. Als Beispiel sind hier (CD31+, CD45+) Leukozyten zu nennen, die sich über CD45 depletieren lassen, bevor eine MACS-bead Kopplung über das FITC-Konjugat an anti CD31 Antikörper erfolgt. Die zweite Selektionsstrategie, die Positivselektion, hat zum Ziel die zur Weiterverwendung erhofften Zellen in einer Säule zu adhären. Auch hier lässt sich eine direkte MACS-Antikörper Markierung

an Zellstrukturen der Zielzellen von einer indirekten Markierung unterscheiden (s.o.). Der Vorteil der Positivselektion gegenüber der Negativselektion ist sicherlich der direkte Weg, um wenige Zielzellen aus einem grossen Gemisch verschiedenster Zelltypen zu separieren. Man kann so recht schnell eine Anreicherung der Zielzellen erreichen.

Letztlich ist auch an eine kombinierte Sortierungsstrategie zu denken, die sowohl die Positivselektion als auch die Depletion einschliesst. Die MACS-Zellseparation ermöglichte es innerhalb kurzer Zeit Zellen anzureichern. Ein höherer Reinheitsgrad liess sich erzielen, wenn konsekutive Säulenläufe durchgeführt wurden. Diese Strategie aufeinanderfolgender Säulendurchgänge konnte auch mit der MACS-Separation Reinheiten von 90-95% erzielen. Allerdings stieg der Anteil zerstörter Zellen deutlich mit diesem Vorgehen, was auf einen nicht unerheblichen Stressor für die Zellen schliessen lässt.

Zur Sicherstellung einer erfolgreichen Sortierung galt es Folgendes zu beachten:

- Der MACS-Puffer sollte EDTA (2-3mM) und nur einen geringen Serumanteil (1%) enthalten.
- Die Zellsuspension sowie der MACS-Puffer sollten stets stark gekühlt sein. Auch dies beugt einer Verklumpung vor.
- Die MACS-bead gekoppelte Zellsuspension sollte in einem recht grossen Volumen suspendiert werden, um eine Vereinzelung der Zellen zu fördern (typisch 3-4ml für MS-Säulen).
- Falls nötig sollte die zu separierende Suspension vor dem Säulenlauf filtriert werden.
- Die Suspension sollte nur in kleinen Portionen (500µl) auf die Säule gegeben werden, um eine Sedimentation zu vermeiden.
- Eventuell ist zu prüfen, ob die vom Hersteller empfohlene MACS-bead Konzentration optimal ist, oder aber eine geringere Konzentration gewählt werden kann. Dies könnte dann den Reinheitsgrad erhöhen, doch gleichzeitig eventuell die Ausbeute mindern.

3.3.2. MACS-Positivseparation aus Herz- und Lungengewebe

Das Primärziel dieser Separationsmethoden war die Generierung einer möglichst reinen endothelialen Zellpopulation. Diese sollte sich mit einem begrenzten Aufwand gewinnen und anschliessend kultivieren lassen. Daher wurde bei Versuchen zur Kultivierung der sortierten endothelialen Zellen stets auf eine sterile Proben-

3. Methoden

prozessierung geachtet. Das bedeutete das Arbeiten unter der Zellkulturbank, das Sterilfiltrieren von Enzymlösungen und das Autoklavieren von potentiell kontaminierenden Verbrauchsgütern sowie Arbeitsgeräten. Die Separation von Zellen aus Herz- und Lungengewebe erfolgte über Positivselektionsschritte durch die Bindung von anti FITC-beads an CD31FITC markierte Zellen. Dazu wurden die Gewebe zunächst präpariert und die Zellzahlen bestimmt, wie es unter Punkt 3.1.2. geschildert wird. Die Zellsuspensionen wurden zumeist in 15ml Falcon-Röhrchen weiterprozessiert. Mit 7% Rattenserum wurde auf Eis geblockt. Anschliessend inkubierte man mit CD45PE und CD31FITC Antikörpern für 20 Minuten auf Eis. Parallel dazu wurde eine kleine Menge der Ausgangszellsuspension mit IgG2aFITC Isotypkontrollantikörpern und CD45PE gefärbt. Hiernach wurde auf 15ml mit Medium aufgefüllt und die Suspension für 10 Minuten bei 1200 U/min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde auf ein Restvolumen von etwa 500µl sorgsam abgesaugt. Anschliessend wurde daraus eine kleine Probe zur späteren FACS-Analyse entnommen. Diese Probe gab den Anteil (CD31+, CD45-, PI-) Zellen vor der MACS-Separation wieder. Die verbliebene gefärbte Zellsuspension (etwa 490µl) wurde dann mit MACS-Puffer auf ein grösseres Volumen adjustiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass 1×10^7 Zellen in 100µl aufgenommen wurden. Auf 100µl dieser adjustierten Zellsuspension wurden dann jeweils 10µl anti FITC beads gegeben. Die Suspension wurde gründlich, jedoch vorsichtig gemischt und 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach etwa 7 – 8 Minuten wurde die Suspension erneut vorsichtig aufgeschüttelt. Nach diesem Inkubationsschritt wurde das Falcon-Röhrchen auf 15ml mit MACS-Puffer gefüllt und die Zellen wie oben beschrieben pelletiert. Der Überstand wurde abermals auf ca. 500µl abgesaugt. Zwischenzeitlich ist eine MS-MACS-Säule zur Sortierung vorbereitet worden. Dazu wurde diese in den MACS-Multistand verbracht. Anschliessend spülte man die Säule 2-3 mal mit jeweils 3ml MACS-Puffer. Das Volumen der Zellsuspension wurde auf 3ml erhöht, und dann mittels Pipette in 500µl Portionen auf diese Säule gegeben. Diese Portionierung erfolgte vorsorglich, um eine Sedimentierung und damit mögliche Verklumpung der Zellen zu vermeiden. Eine erneute Filtration der gefärbten Zellsuspension vor dem Säulenlauf wurde bei Herz – und Lungengewebe nicht vorgenommen, da keine Säulenverstopfung beobachtet worden ist. Die Säule wurde anschliessend 3x mit je 3ml MACS-Puffer gespült. Der gesamte Durchlauf wurde zu weiteren Analysezwecken gesammelt. Nach diesen Waschschritten wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und auf ein neues 15ml Falcon-Röhrchen gebracht. Die im Stahlwollenetzwerk adherierten Zellen wurden durch Zugabe von 3ml MACS-Puffer unter Anwendung des Säulenstempels eluiert. Sowohl der Durchlauf als auch das Eluat wurde danach wie oben beschrieben

pellettiert. Diese Säulenläufe wurden in einigen Versuchen bis zu insgesamt 2x wiederholt. Parallel wurden Zellzahlbestimmungen mittels Neubauerkammer durchgeführt. Die Zellfraktionen (Vor der Sortierung, Isotypkontrollen, Abfang 1-3, Durchlauf 1-3) wurden anschliessend auf Populationen mit dem Charakter (CD31+, CD45-, PI-) im FACS untersucht. Die FACS-Messung und Analyse ist dem Punkt 3.2.3. zu entnehmen. Einige Versuche dienten der alleinigen Analyse und der Methodenoptimierung, andere hingegen der Primärkultivierung der sortierten Zellen.

3.3.3. MACS-Positivseparation aus Lebergewebe

Die MACS-Separation von Lebersinusendothelzellen (LSECs) erfolgte nach der Durchführung eines Nycodenz-Gradienten, der unter Punkt 3.1.4. beschrieben wird. Die trübe Zwischenschicht des erfolgten Nycodenz-Gradienten wurde mittels Pipette in ein neues 15ml Falcon-Röhrchen überführt und dieses mit MACS-Puffer aufgefüllt. Anschliessend erfolgte eine Zentrifugation bei 1500U/min für 10 Minuten (RT). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 250µl MACS-Puffer aufgenommen. Eine Probe von 10µl dieser Suspension wurde zur Zellzahlbestimmung mittels Neubauerkammer verwendet. Ein Probenvolumen von 40µl wurde zur FACS-Analyse aufbewahrt. Den 200µl der verbliebenen Zellsuspension wurden 20µl anti LSEC-beads zugesetzt. Die Inkubation erfolgte dann für 15 – 20 Minuten bei ca. 6°C im Kühlschrank. Nach etwa 7-10 Minuten wurde die Suspension vorsichtig aufgeschüttelt. Nach der Inkubation wurde das Röhrchen mit MACS-Puffer aufgefüllt und für 10 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in etwa 4ml MACS-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde anschliessend durch Nylongaze filtriert. Unterblieb diese Filtration, kam es im Gegensatz zu den Separationen von Zellen des Herz- und Lungengewebes zu Säulenverstopfungen. Das Filtrat wurde dann in 500µl Portionen auf eine vorbereitete MS-MACS-Säule gegeben (s.o.). Die weitere Verfahrensweise gleicht der unter Punkt 3.3.2. beschriebenen. Die Pelletion erfolgte dann jedoch für lediglich 5 Minuten bei 1500 U/min. Die Zellen wurden dann in EGM2 MV Medium resuspendiert und in einer Neubauerkammer gezählt. Anschliessend erfolgte eine Aufteilung der Zellen in Zellkulturtestplatten. Die Ausbeute an Zellen aus einer murinen Leber belief sich auf etwa 2×10^6 Zellen. Davon wurden bis zu 5×10^5 Zellen in eine Vertiefung eines 48 Wells verbracht. Die Menge von 1×10^6 Zellen kam in eine 24 Well Vertiefung. Diese Platten waren zuvor mit R-Collagen oder auch Gelatine beschichtet worden (s. Punkt-3.4.2.). Zur Adhäsionsunterstützung wurden die zellbeladenen Testplatten bei 1200 U/min über 3 Minuten mit einer Zentrifugenbeschleunigung vom Betrag 5 zentrifugiert und danach in den Zellkulturschrank gestellt. Die weitere Beschreibung der

3. Methoden

Kultivierung dieser Zellen erfolgt unter Punkt 3.4.4.. Anstatt einer Kultivierung der sortierten LSECs wurden ebenso FACS-Analysen durchgeführt. Zum einen interessierte der Antigencharakter und die Streueigenschaften der sortierten Zellen. Zum anderen war es von Interesse die Effizienz sowohl des Nycodenzgradienten als auch der MACS-Separation zu überprüfen. Dazu nahm man Proben der Zellsuspensionsfraktionen zum Zeitpunkt vor der Dichtegradientenzentrifugation, nach dieser und nach der MACS-Separation. Die anschliessende Antikörperfärbung erfolgte mit CD31FITC, CD45PE und einer entsprechenden Isotypkontrolle IgG2aFITC (s. Punkt 3.2.2.). Die Messungen und Auswertungen erfolgten gemäss Punkt 3.2.3..

3.3.4. FACS-Sortierungen aus Lungen- und Lymphknotengewebe

Es erfolgten Präparationen gemäss den Punkten 3.1.2./3.1.3. Die Zellsuspensionen wurden mit Rattenserum geblockt wie unter 3.2.2. beschrieben. Anschliessend erfolgte die Antikörperinkubation mit CD31FITC und CD45PE für 20 Minuten auf Eis. Die Sortierung erfolgte am FACS-Aria Sortierungsgerät unter Einsatz von PI. Die Gatingstrategie ist unter Punkt 4.1. beschrieben. Auf diese Weise liessen sich ca. 2×10^5 endotheliale Zellen aus dem Lungengewebe einer 6-8 Wochen alten BALB/c isolieren.

3.3.5. Zellzentrifugate

Zur Anfertigung eines Zellzentrifugats wurden jeweils etwa 5×10^4 sortierter Zellen in 100 -150µl PBS pro Objektträger (Silikabeschichtung) verwendet. Dazu wurde die Zellsuspension in eine Cytospin-Trichterapparatur pipettiert. Die Zentrifugation erfolgte für 5 Minuten bei 800 U/min (RT). Dieses Verfahren ermöglichte eine bessere mikroskopische Betrachtung.

3.3.6. Fluoreszenzmikroskopie

Die durch Cytospins zellbeschichteten Glasobjektträger wurden über Nacht unter Lichtabschluss getrocknet. Nach Fixierung in Aceton/ Methanol (1:1) wurden die Proben zwei bis drei mal mit TBST gewaschen und anschliessend für zwei Minuten mit DAPI-Kernfärbereagenz in PBS gefärbt. Nach erneuter zwei- bis dreimaliger Waschung mit TBST wurden die Proben mittels Moviol und Deckglas eingebettet und nach Aushärtung im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.4. Zellkultur

3.4.1. Allgemeines

Bei sämtlichen Arbeiten mit dem Ziel der Primärkultivierung muriner Zellen wurde zur Vermeidung bakterieller sowie fungiformer Kontaminationen auf sauberes Arbeiten geachtet. Wenn möglich wurden die Präparationsschritte unter Sterilbänken durchgeführt. Medien und Puffer waren mit Penicillin/Streptomycin (PS) versetzt. Verwendung fanden nur sterile Pipetten und zumeist Einmalgebrauchsgegenstände. Nicht steriles Verbrauchsmaterial wurde autoklaviert. Aminosäurehaltige Reagenzien und Enzymlösungen wurden sterilfiltriert. Präparationsbesteck wurde regelmässig mit 70% EtOH benetzt oder über offener Flamme entkeimt.

3.4.2. Beschichtung von Zellkulturschalen mit Matrigel, Gelatine und Collagen

Matrigel

Die Matrigelsubstanz wurde über Nacht auf Eis aufgetaut.

Die Zellkulturtestplatten und Pipettenspitzen wurden etwa 30 Minuten vor der Plattenbeschichtung bei -20°C vorgekühlt. Die Platten wurden dann mit einer feinen Schicht dieser Matrixsubstanz versehen und für 30 Minuten im Brutschrank verfestigt. Matrigelverdünnungen mit serumfreien Medium wurden ebenfalls verwendet. Der Nachteil dieser Verdünnungen bestand jedoch darin, dass gerade bei geringeren Matrigelkonzentrationen ein schollenartiger Beschichtungszerfall erfolgte, der dann nicht unerhebliche Zellverluste hervorrief. Eine Lagerung Matrigel-beschichteter Schalen wurde vermieden.

Gelatine

Die Zellkulturtestplatten und Schalen wurden mit 0,2% Gelatine beschichtet und anschliessend für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Der verbleibende Überstand wurde abgesaugt und die Gefässflächen zweimal mit PBS gespült. Die Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank. Die Herstellung der 0,2% Gelatinelösung erfolgte mit dem Lösen porciner Gelatinefestsubstanz in destilliertem Wasser (H₂Odest.) und darauffolgender Autoklavierung (120°C, 20 Minuten).

Collagen

Die Rattencollagenlösung wurde 1:10 mit H₂Odest. (steril) verdünnt. Die Zellkulturtestplatten und Schalen wurden damit benetzt und etwa zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Überstände wurden abgesaugt und die Vertiefungen mit PBS zweimal nachgespült. Die Aufbewahrung beschichteter Objekte erfolgte für etwa maximal zwei Wochen bei RT (gemäss Herstellerangaben).

3.4.3. Primärzellkultur aus Aortenexplantaten (Shi et al., 2000; Masson et al., 2002; Hatley et al., 2003; auch Kobayashi et al., 2005).

Eine notwendige Voraussetzung für das Gelingen dieser Methode war eine möglichst keimarme Präparation. Dazu wurde das Besteck nach jedem potentiell kontaminierendem Schritt mit 70% ETOH benetzt und/ oder abgeflammt. Die Herauslösung des Herz-Aortenkomplexes geschah in der Regel unter einer Sterilbank. Die toten Mäuse wurden zuvor in 70% ETOH getaucht. Anschliessend wurde das Fell weiträumig abgezogen (hier höchste Kontaminationsgefahr- Erreger auf Haut und im Fell). Nach der Schaffung eines weiten Thoraxfensters wurde die Vena Cava Inferior durchtrennt und der Oesophagus entfernt. Die Durchtrennung der Aorta erfolgte dann zunächst auf Höhe des Zwerchfelldurchtritts. Über den linken Ventrikel wurde mit PBS (steril, Raumtemperatur) perfundiert. Mit einer spitzen Pinzette wurde dann zwischen Aorta und Wirbelsäule entlanggegangen. Dadurch löste man die gefässfixierende Bindegewebsmatte. Anschliessend wurden Herz und Aorta als Verbund entnommen und in einer verschliessbaren und sterilen Plastikschiene in antibiotikahaltigem Zellkulturmedium DMEM/ RPMI auf Eis platziert. Die weitere Präparation geschah dann unter einem Stereomikroskop. Die Aorta wurde penibel von umgebendem Fett- und Bindegewebe befreit und danach erst vom Herz getrennt. Auf diese Weise behielt man eine bessere Orientierung, zudem erleichterte man sich die Präparation. Mittels Skalpell wurde das Gefäss in Ringe von 2-3mm Dicke unterteilt, alternativ wurden auch Plättchenzuschnitte durchgeführt. Hierbei wurden die Ringe nochmals in Gefässlängsrichtung durchtrennt, wodurch plattenartige Gefässpräparate entstanden. Das Problem der Plättchenzuschnitte war der erhöhte präparatorische Schwierigkeitsgrad, zudem bestand die Gefahr, dass sich das Gewebstück auf die adventitielle Seite lagerte. Die Organstücke einer einzelnen Aorta konnten nun auf einzelne Matrigeltropfen oder aber auf einen komplett beschichteten Grund eines 6-Wells gebracht werden. Innerhalb der folgenden zwei Tage wurde nur minimal Medium zugesetzt. Andernfalls wurden die Organstücke aufgeschwemmt, wodurch ein Zellauswuchs ausblieb. Dieses war das Hauptproblem bei dieser Präparationsmethode. Die Gewebstückentfernung erfolgte dann etwa fünf Tage nach der Explantation. Ein Mediumwechsel erfolgte nach jeweils zwei bis drei Tagen. Bei etwa 80%iger Konfluenz, was etwa dem 10.-14. Tag nach der Explantation entsprach, wurden die Zellen zur FACS-Analyse gewonnen. Dazu spülte man diese 2-3x mit PBS und gab Dispase hinzu, welche zuvor auf 37°C vorgewärmt wurde. Nach etwa 15 Minuten Inkubation im Zellkulturschrank wurden die Zellen unter leichtem Klopfen zusätzlich gelockert. Anschliessend spülte man mit DMEM Medium (10%FCS, PS) gründlich nach und überführte die Suspension in 15ml Falcon-Röhrchen. Die

Pelletierung erfolgte dann für 10 Minuten bei 1200 U/min und 4°C. Dieser Ablöseprozess wurde ebenfalls für die Passagierung der Zellen verwendet. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in ca. 500µl Medium aufgenommen. Eine kleine Probe wurde zur Bestimmung der Zellzahl in der Neubauerkammer entnommen. Die restlichen Zellen wurden zur FACS-Analyse verwendet. Die Antikörperfärbungen und anschliessende Analytik ist unter Punkt 3.2.2./3.2.3. beschrieben. Eine Abweichung bestand dabei in der höheren Zellgrösse, verglichen mit den durch Gewebeverdaus erhaltenen Einzelzellen, die eine Anpassung der FACS-Einstellungen erforderte. Es wurden kultivierte aortale Zellen verschiedener Passagestufen analysiert.

3.4.4. Primärzellkultur sortierter LSECs

Die sortierten Lebersinusendothelzellen (vgl. 3.3.3.) wurden dann nach etwa drei Stunden gewaschen. Dieses geschah, um zumeist tote, nicht adhärente Zellen zu entfernen. Dazu wurden die Wells etwa 2 mal mit warmen PBS +1%FCS befüllt und mittels 1000µl Pipette vorsichtig gespült. Danach wurde sofort Medium nachgefüllt. Der Mediumwechsel erfolgte nach jeweils zwei bis drei Tagen.

3.5. LPS in vivo Stimulationen (u.a. Schleiffenbaum et al., 1998)

Es ist bekannt, dass die intraperitoneale (i.p.) Applikation von LPS eine systemische Entzündungsreaktion bewirkt. Dies machte man sich bei der Untersuchung, ob eine LPS-Stimulation einen Einfluss auf die endotheliale mCD155 Expression hat, zu Nutze. Dazu wurden 50µg LPS (Serotyp 026: B6 E.Coli) in 200µl PBS aufgenommen und in einer 1ml Spritze samt 0,4mm Spritzenaufsatz aufgezogen. Die intraperitoneale Applikation erfolgte durch tangentielle Injektion in den linken unteren abdominalen Quadranten. Die Stimulationszeit wurde zwischen etwa fünf und 17 Stunden variiert. Die Kontrolltiere blieben gänzlich unbehandelt. Die Organpräparationen und die anschliessende Einzelzellgewinnung zur FACS-Analyse erfolgten dann gemäss Punkt 3.1.2./3.1.3.. Anzumerken ist, dass das Präparationsbesteck nach jedem einzelnen Versuchstier des jeweiligen Experiments gründlich gespült oder aber gewechselt wurde. Dies geschah, um Verfälschungen im Experiment zu minimieren.

Folgende Experimente dieses Typs sind durchgeführt worden:

- Experiment 1: 2 Tiere (BALB/c) 50µg LPS i.p. mit 2 Kontrollen; Tötung nach 5-6h.
Untersuchtes Gewebe: Lunge.

- Experiment 2: 2 Tiere (C57bl6) 50µg LPS i.p. mit 2 Kontrollen; Tötung nach 17h.
Untersuchtes Gewebe: Lunge, Lymphknoten.
- Experiment 3: 2 Tiere (BALB/c) 50µg LPS i.p. mit 4 Kontrollen; Tötung nach 15-17h.
Untersuchtes Gewebe: Lunge, Herz.
- Experiment 4: 2 Tiere (BALB/c) 50µg LPS i.p. mit 3 Kontrollen; Tötung nach 15-17h.
Untersuchtes Gewebe: Lunge, Herz.

Zur Sicherstellung einer grösstmöglichen Vergleichbarkeit wurden bei den FACS-Färbungen, je Experiment, dieselben Antikörperverdünnungen für die LPS-behandelten Tiere und die entsprechenden Kontrollen verwendet, gemäss Punkt 3.2.2./3.2.3..

3.6. Adoptive Lymphozytentransfers (u.a. Faveeuw et al., 2001)

3.6.1. Isolierung von murinen Lymphozyten

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob mCD155 einen Einfluss auf Transmigrationsprozesse im murinen System hat, bediente man sich des Prinzips Adoptiver Lymphozytentransfers.

Aus einer Spendermaus wurden die Milz, die peripheren Lymphknoten (submandibulär, facial, axillär, brachial, suprailiakaal, popliteal) und der Mesenterische Lymphknoten sowie retroperitoneale Lymphknoten separat gewonnen und in 6-well Vertiefungen auf Gazylenmembran in 0,5ml FACS-Puffer auf Eis gepoolt. Die Organe wurden mittels Spritzenstempel sorgfältig zerdrückt. Die Gewebshomogenisate wurden mit je 5-10ml FACS-Puffer nachgespült. Nach der Filtration der Zellsuspension (ca. 40ml Volumen) wurde diese auf 15ml Lympholyte-M (Raumtemperatur) geschichtet. Die Dichtezentrifugation erfolgte für 20 Minuten bei 2200 U/min (ohne Bremse, bei RT). Der Phasenring wurde entnommen und anschliessend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgte in 50ml Volumen für 10 Minuten bei 2000 U/min (bei RT), der Zweite in 15 Millilitern für 10 Minuten bei 1200 U/min (4°C). Dieses Pellet wurde in 5ml RPMI 1640 Medium (10% FCS, PS, 25mM Hepes) aufgenommen. Zur Zellzahlbestimmung wurden 10µl dieser Suspension mit 490µl FACS-Puffer verdünnt. Hiervon wurden 10µl in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau gemischt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer-Kammer. Durchschnittlich erhielt man $1 - 1,5 \times 10^8$ (Maximum ca. $2,2 \times 10^8$) splenozytäre Zellen aus einer 6-8 Wochen alten BALB/c Maus.

3.6.2. CFSE-Färbung muriner Lymphozyten

Zur Erzielung einer möglichst einheitlichen Färbung wurden bis zu 4×10^7 Zellen mit 10ml RPMI1640 (10% FCS, PS, 25mM Hepes) in einem 50ml Falcon-Röhrchen verdünnt. Diese Suspension wurde für 25 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die Färbung erfolgte dann durch Zugabe von 7,5µl CFSE (5mM) für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Der Markierungsprozess wurde durch Auffüllen mit eiskaltem FACS-Puffer auf 50ml beendet. Nach der Pelletierung erfolgte ein erneuter Waschschrift. Die Pelletaufnahme geschah anschliessend in PBS ohne Serumzusatz. Eine erneute Zellzahlbestimmung mittels Neubauerkammer war aufgrund von nicht vermeidbaren Zellverlusten und zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit von mehreren Transferexperimenten erforderlich.

3.6.3. Transferierung CFSE-markierter Splenozyten

Die Versuchstiere wurden unter Beobachtung für etwa 5 Minuten unter eine Infrarotlampe gestellt, um eine Vasodilatation der Schwanzvenen zu fördern. Das experimentelle Design zur Untersuchung der durch anti mCD155 Antikörper beeinflussten Kurzzeittransmigration erforderte die Gabe von Antikörpern vor dem Schritt des Zelltransfers. Hierzu erfolgte die Injektion von 400µg spezifischer Antikörper bzw. eines Isotypkontrollantikörpers 30 Minuten vor dem eigentlichen Zelltransfer. Die Antikörper wurden mit einer 1ml Spritze samt 0,4mm Nadelaufsatz in eine Schwanzvene injiziert. Die CFSE-gefärbte Suspension der zuvor isolierten Splenozyten wurde ebenfalls in eine 1ml Spritze aufgenommen und wenigstens auf Raumtemperatur vorgewärmt. Es wurden etwa 1×10^7 Zellen in maximal 200µl je Empfängertier transferiert. Die Injektion erfolgte mittels 0,4mm Nadel in eine Schwanzvene.

3.6.4. Gewinnung der transferierten Zellen

Nach jeweils etwa zwei Stunden wurden die Empfängertiere getötet. In der Regel wurden die Zellen auf Eis kühlgehalten, andernfalls wird nachfolgend eine veränderte Behandlungstemperatur vermerkt. Die Milz, der Mesenterische Lymphknoten und einander entsprechende periphere Lymphknoten wurden separiert und getrennt prozessiert. Hierzu bedurfte es bei den Lymphknoten lediglich des Zerquetschens auf Gazenylonmembran in FACS-Puffer und dem anschliessenden Nachspülen, der Filtration und der Pelletion für 10 Minuten bei 1200 U/min und 4°C. Die Aufnahme erfolgte in 0,5ml FACS-Puffer. Die Milzzellsuspension wurde darüber hinaus für 7 Minuten mit Erylysepuffer bei RT inkubiert. Zu diesem Zweck wurden 1ml Zellsuspension mit 9ml Erylysepuffer in einem 15ml Falcon-Röhrchen vermischt. Nach

3. Methoden

Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 1ml FCS. Nach der Pelletion (10 Minuten, 1200 U/min, 4°C), erfolgte ein Waschschrift mit FACS-Puffer (10 Minuten, 1200 U/min, 4°C). Die Zellen wurden dann in 2ml FACS-Puffer aufgenommen. Man erhielt je Tier somit drei Zellsuspensionsfraktionen: Die Suspension der Milz, Zellen des Mesenterischen Lymphknotens und eine Zellsuspension mehrerer peripherer Lymphknoten, äquivalenter Lokalisation. Die Zellzahlen der je Tier erhaltenen Zellsuspensionsfraktionen wurden dann mittels ViCell Zählgerät bestimmt.

3.6.5. Zusammenfassung der Experimente dieses Typs

Es wurden insgesamt vier unabhängige Experimente dieses Typs unter Anwendung verschiedener anti mCD155 Antikörper (bezeichnet als „3F1“, „8A6“, „5A5“) oder eines mCD155Fusionsproteins (FP) durchgeführt. Die Kontrolltiere erhielten einen nicht für mCD155 spezifischen Antikörper (im Folgenden als Isotypkontrolle bezeichnet bzw. ein human IgG-FP als Kontrolle für das mCD155FP), der jedoch vom gleichen Isotyp wie der „3F1“ und „8A6“ war. Zusätzlich wollte man potentielle Antikörpereinflüsse ausschliessen und bisherige Versuchsbeobachtungen kontrollieren. Daher bediente man sich in einem weiteren Experiment eines Adoptiven Lymphozytentransfers bei mCD155 Knock-out Mäusen (im Folgenden als mCD155KO bezeichnet) und Kontrolltieren. In diesem Experiment wurden zwei mCD155KO Tiere mit zwei Kontrolltieren verglichen. Somit umging man hier den Einsatz von anti mCD155 Antikörpern. Als Lymphozytenspender diente sowohl für die mCD155KO Tiere als auch für die Kontrollen eine BALB/c Maus.

Folgende Experimente dieses Typs sind durchgeführt worden:

- Experiment 1: 2x mCD155FP („Fusionsprotein“), 1x anti mCD112 („6B3“), 1x human IgG (Kontrolle für FP), 2x ohne Antikörper, Fusionsproteine;
- Experiment 2: 2x anti mCD155 („3F1“), 1x anti mCD155 („5A5“), 1x anti mCD155 („8A6“), 2x Isotypkontrolle („1H4“);
- Experiment 3: 2x anti mCD155 („8A6“), 2x Isotypkontrolle („1H4“);
- Experiment 4: 2x mCD155 Knock-outs, 2x Wildtypkontrollen.

3.6.6. Antikörperfärbungen, FACS-Messung und Auswertung

Die Zellsuspensionen wurden mit jeweils 7% Ratten- und Mausserum für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Für die einzelnen Proben eines Experimentes sind dieselben Antikörperverdünnungen verwendet worden, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen CD3, CD4, B220 für 20

Minuten auf Eis. Nach zweimaligem Waschen bei 1200 U/min für je 3 Minuten bei 4°C wurden die Proben in 50 – 100µl FACS-Puffer aufgenommen und an einem FACS-Calibur über die Software Cellquest eingemessen. War all dieses an einem einzelnen Versuchstag nicht mehr zu gewährleisten, wurden die Proben mit 0,5% PFA fixiert und bis zur Messung am nächsten Morgen bei ca. 6°C im Kühlschrank aufbewahrt. Sämtliche Auswertungen der FACS-Daten erfolgten dann mittels WinList.

3.7. Erstellung der Graphiken und Diagramme

Die Erstellung der Diagramme erfolgte mit Microsoft Word und MS Excel. Die FACS-Graphiken wurden über WinList in Form von Graphikdateien exportiert. Die Zusammenstellung und Aufbereitung dieser Graphiken wurde dann in Adobe Photoshop vorgenommen. Die Darstellung von Einfachfluoreszenzdiagrammen erfolgte in Form von Kurvenüberlagerungen. Mit dem Ziel der Fokussierung auf die wesentlichen Inhalte dieser Arbeit wurde versucht den Anteil der Diagramme und Graphiken auf ein notwendiges Mass zu beschränken.

3.8. Statistik

3.8.1. Bestimmung des MFI-Quotienten

Gerade wenn es darum geht durchflusszytometrisch-erhaltene Daten bezüglich der Expressionsstärke einzelner Rezeptoren zu vergleichen ist es nötig die MFI-Werte (Werte für die mittlere Fluoreszenzintensität eines Antikörpersignals) zu abstrahieren. Jedoch sollte man dabei darauf achten, dass man möglichst nur einheitliche, normalverteilte Fluoreszenzsignale auf diese Art handhabt. Dazu kann man einen Quotienten bilden, den Mittleren Fluoreszenzintensitätsquotienten (MFIQ, auch MFI-Quotienten). Dieser wird dann für jede miteinander zu vergleichende Probe gebildet. Als Beispiel soll hier der MFIQ für mCD155 auf putativ endothelialen Zellen gebildet werden:

Der Beobachtungsgegenstand sind die mittels FACS gemessenen Fluoreszenzsignale für etwa mCD155 auf (CD31+, CD45-, PI-) Zellen. Zur Ermittlung dieser Populationen verweise ich auf die Punkte 3.2.3. und 4.1.1..

- Die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des spezifischen anti mCD155 Antikörpersignals endothelialer Zellen wird durch die MFI des entsprechenden Isotypkontrollantikörpersignals dieser Zellen dividiert. Für jedes Versuchstier bzw. Organ wurde eine eigenständige Isotypkontrolle für mCD155 geführt.

Es gilt: $\text{MFI}_{\text{anti mCD155}} / \text{MFI}_{\text{Isotyp}} = \text{MFIQ}$.

Diese MFIQ-Werte können dann etwa in Form von Säulendiagrammen dargestellt werden. Es lassen sich so Mittelwerte und Standardabweichungen berechnen und man kann so die erhaltenen Werte der jeweiligen Vergleichsgruppen miteinander vergleichen.

3.8.2. Überprüfung auf Signifikanz

Zur statistischen Überprüfung der Ergebnisse auf Signifikanz wurde der t -Test für unverbundene Stichproben (Zwei-Stichproben- t -Test, doppelter t -Test) (unter der Annahme gleicher Varianzen) verwendet. Das Konfidenzniveau beträgt $p = 0,05$.

Gegeben seien zwei Stichproben mit den Parametern $(n_1, \bar{x}_1, s_1)$ und $(n_2, \bar{x}_2, s_2)$, wobei

n_1, n_2 die Anzahl der miteinander zu vergleichenden Versuchstiere;

$\bar{x}_1, \bar{x}_2$ die jeweils aus den Versuchstierreihen erhaltenen Mittelwerte;

s_1, s_2 die jeweils aus den Versuchstierreihen erhaltenen Standardabweichungen.

Geprüft werden soll die Hypothese $H (\mu_1 = \mu_2)$ (Mittelwerte der jeweiligen Stichprobe) dafür, dass die Mittelwerte in beiden Stichproben (bzw. Grundgesamtheiten) gleich sind.

Als Testgrösse verwendet man

$$t = \left(\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s} \right) \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

Die Darstellung der Messwerte erfolgte soweit möglich als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SAW), wobei für die Testgrösse t die gemeinsame Standardabweichung s berechnet wird aus

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Diese Testgrösse t ist bei Gültigkeit der Nullhypothese t - verteilt mit $n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgraden.

4. Ergebnisse

4.1. Endothelzellen in der Durchflusszytometrie

4.1.1. Identifizierung endothelialer Zellen verschiedener Organe

Unser besonderes Interesse besteht in der Aufklärung der Funktionen des Tage4/murinen CD155 (mCD155) Moleküls. Die Untersuchung des Expressionsprofils dieses Rezeptors hilft dabei und liefert zudem Informationen darüber, inwieweit eine Orthologie zwischen dem humanen CD155 und Tage4 (mCD155) besteht. So entwickelten wir eine durchflusszytometrische Methode, die es uns erlaubt murine endotheliale Zellen verschiedener Gewebe auf deren Antigenexpressionseigenschaften zu untersuchen.

Da durch enzymatische Gewebsaufschlüsse unweigerlich Zellen anfallen, die in ihrer strukturellen Integrität nachhaltig gestört sind, ist der Gebrauch eines DNA-Interkalators wie Propidiumiodid vorteilhaft. So lassen sich tote, PI positive Zellen in der Analyse ausschliessen. Es stellte sich im Verlauf der Arbeit heraus, dass weder CD31 als alleiniger Marker, noch in Kombination mit ICAM-2 zur Identifikation endothelialer Zellen im FACS ausreichend ist. Die Darstellung dieser endothelialen Zellen im FACS gelingt unter Verwendung von Antikörpern gegen CD31 (als panendothelialer Marker) und CD45 (als panleukozytärer Marker). Hier sei sogleich auf das Diskussionskapitel verwiesen, um Argumentationen nicht vorwegzunehmen.

Dieses Färbeschema ermöglichte die Zuordnung endothelialer Zellen mittels FACS in Gewebspräparationen von Herz, Lunge, Niere, Gehirn und sogar Lymphknoten, nicht jedoch für Milz- und Lebergewebe (vgl. 4.1.2). Zur Veranschaulichung der Identifikation endothelialer Zellen mittels Durchflusszytometrie dient die Abbildung 7. Diese zeigt Daten eines Lungengewebsverdaus.

Im FSC-SSC Diagramm wird eine Region R1 erstellt und so ein Trümmerausschluss vorgenommen. Die selektierten Partikel werden nun auf ein Fluoreszenzsignal in Kanal-3 (Propidiumiodid) analysiert. PI negative Zellen werden in der Region R2 erfasst. Diese im FSC-SSC vorselektierten, PI negativen Zellen werden nun in einem Zweifachfluoreszenzdiagramm, in dem eine Abgrenzung über CD31 und CD45 erfolgt, dargestellt. Die Abszisse stellt Fluoreszenz 1 dar und repräsentiert das eingemessene Signal für CD31 (FITC konjugierter Antikörper). Die Ordinate gibt den panleukozytären Marker CD45 wieder. Dieser liegt in Kanal 2 (PE gekoppelter anti CD45 AK). Die endotheliale Zellpopulation findet sich als (CD31+, CD45-, PI-) in R3. Die grosse uneinheitlichere Population am oberen Rand dieses Diagramms stellt das Gemisch aus verschiedenartigen leukozytären Zellen dar, die u.a. als Lymphozyten und

4. Ergebnisse

Neutrophile Granulozyten identifiziert werden konnten. Diese sind sowohl als CD31+ aber auch als CD31- zu erkennen. Vergleicht man nun die physikalischen Eigenschaften der endothelialen Zellen auf der einen und die der Leukozyten auf der anderen Seite, findet sich Folgendes: Das untere linke FSC-SSC Diagramm zeigt die Population endothelialer Zellen mit den Eigenschaften: (CD31+, CD45-, PI-) (entsprechend R3). Das untere rechte FSC-SSC Diagramm stellt (CD45+, PI-) Zellen dar, denen somit eine leukozytäre Herkunft zugeschrieben werden kann. Dies ermöglicht nun einen direkten Lagevergleich beider Zellarten. Dabei erkennt man, dass die endothelialen Zellen im Mittel kleiner sind als Leukozyten. Zudem lassen sich die endothelialen Zellen als einzelne, homogene, sowie gut abgrenzbare Population im FSC-SSC Diagramm darstellen. Die (CD45+, PI-) Population hingegen besteht aus Zellen mit heterogenen physikalischen Streueigenschaften.

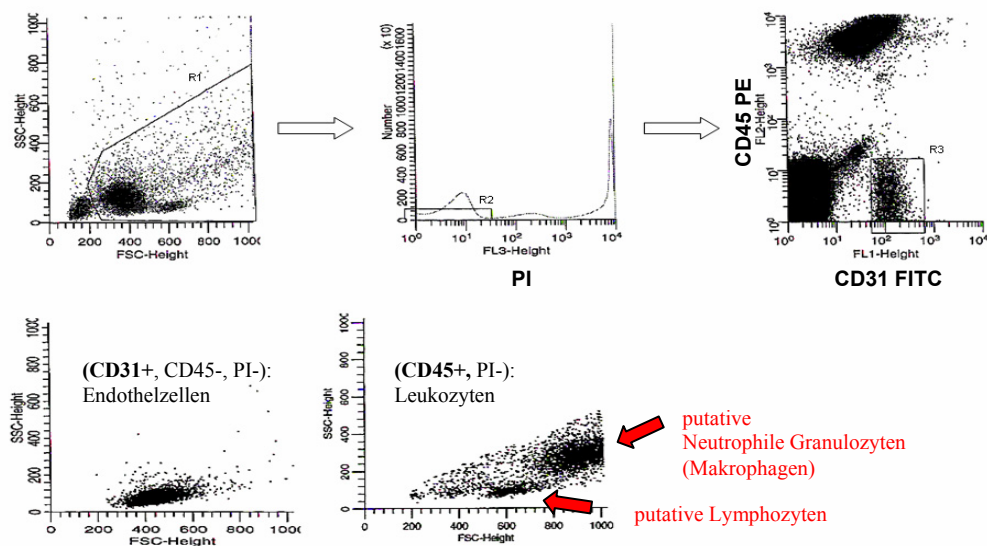


Abb. 7: Durchflusszytometrische Analyse endothelialer Zellen (hier Lungengewebe)

Lungengewebe wurde wie unter Methoden, 3.1.1, 3.1.2., 3.1.5., 3.2.2., 3.2.3. beschrieben zur FACS-Analyse aufbereitet und analysiert.

4.1.2. Besonderheiten der Identifikation in Milz- und Lebergewebe

Für Leber- und Milzgewebe lässt sich durch Kombination von CD31 mit CD45 und PI eine Population endothelialer Zellen nicht sicher abgrenzen wie in den übrigen beschriebenen Organen. Lediglich durch eine Kombination von CD31 mit anti LSEC-Antikörpern (vgl. Ergebnisse, 4.2.1.) kann man in diesen beiden Gewebstypen eine Population identifizieren, die ähnliche physikalische Streueigenschaften aufweist (vergleichbar grosse Zellen), wie die Populationen endothelialer Zellen sämtlicher anderer präparierter Organarten und wir schlussfolgerten somit, dass es sich auch

hier um endotheliale Zellen handelt. Um im FACS-Calibur auch endotheliale Zellen dieser beiden Gewebe auf eine mCD112 und mCD155 Expression untersuchen zu können, wurde hier bei den Analysen die Region im FSC-SSC Diagramm auf einen Bereich zwischen 300 bis 500 beschränkt (vgl. Abb.: 7), da hier die (CD31+/LSEC+) Population gefunden werden konnte. Doch aufgrund dieser Regionssetzung für Milz und Leberpräparationen, zusammen mit der unsicheren Abgrenzung mittels CD31 und CD45 sind die nachfolgenden Fluoreszenzüberlagerungsdiagramme (4.2.1. und 4.5.1.) für Milz und Leber kritisch zu sehen.

4.2. LSEC-Antigen

4.2.1. LSEC-Antigen auf endothelialen Zellen

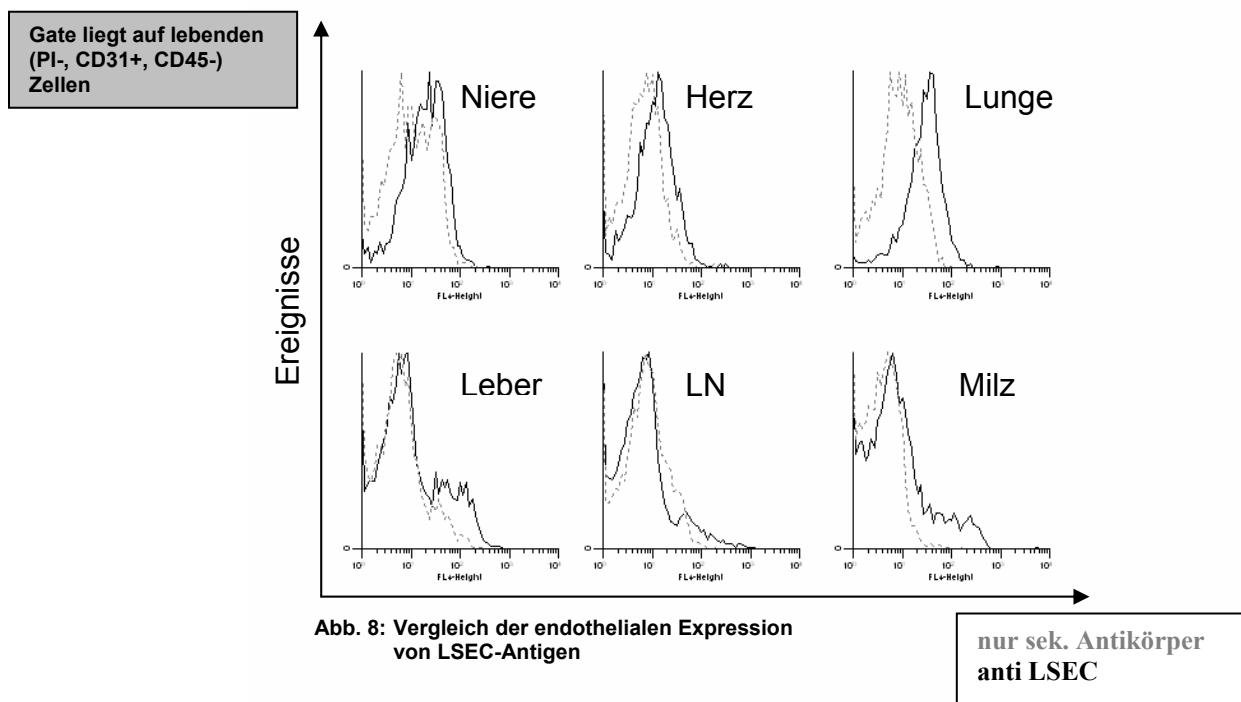
Anti LSEC-Antikörper wurden von Miltenyi (Bergisch Gladbach) eigentlich entwickelt, um damit Lebersinusendothelzellen zu markieren und letztlich auch darüber isolieren zu können. Dieser Antikörper soll an Endothelzellen, besonders an Mikrovaskularendothelzellen, aber auch an glatten Muskelzellen binden. Die Verwendung von anti LSEC-Antikörpern vereint zwei Vorteile. Zum einen lässt sich mit einer Zellmarkierungskombination von PI, CD31, CD45 und anti LSEC der endotheliale Charakter der (CD31+, CD45-, PI-) Fraktion im FACS stützen. Gleichzeitig kann man herausfinden, ob und in welchen Organen ausser der Leber sich endotheliale Zellen dann mittels anti LSEC-MACS-beads isolieren lassen könnten. Denn neben der beschriebenen endothelspezifischen Charakteristik ist dieser Antikörper auch als MACS-bead gekoppelte Variante verfügbar und man würde somit zusätzliche Färbeschritte bei beabsichtigten Zellseparationen vermeiden können. Dadurch würde eine zellschonendere Prozessierungsmethode ermöglicht werden. Die Abbildung 8 zeigt Überlagerungsdiagramme der LSEC-Signale mit der jeweiligen Kontrollprobe in Form von Einfachfluoreszenzdiagrammen. Diese Diagramme sind repräsentativ für wenigstens zwei unabhängige Experimente (Milz, Leber), durchgeführt an verschiedenen Tagen. Die hier miteinander verglichenen Organe wurden parallel zur FACS-Messung prozessiert um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten (vgl. Methoden 3.1.1.).

Dargestellt ist das Fluoreszenzsignal von LSEC-CY5 endothelialer Zellen wie unter 4.1.1. bzw. 4.1.2. beschrieben (CD31+, CD45-, PI-). Der anti LSEC-Antikörper ist nicht mit einem Farbstoff gekoppelt. Daher wird er über einen sek. Antikörper (anti Ratte CY5) abgegriffen. Kontrolliert wurde das Signal für LSEC mit der alleinigen Verwendung des Sekundärantikörpers. Hirngewebe wurde nicht auf eine LSEC-Expression untersucht. Betrachtet man nun die Diagramme, stellt man fest, dass generell ein lediglich schwaches Signal in FL4 (Cy5) vorhanden ist. Auffällig ist jedoch

4. Ergebnisse

vor allem, dass Leber, LN und Milz scheinbar zumindest einen endothelialen Zelltyp vorzuweisen haben, welcher LSEC-Antigen in höherem Ausmass exprimiert. Zumindest Lymphknotengewebe, hier ist eine Abgrenzung endothelialer Zellen durch CD31 und CD45 wie unter 4.1.1. beschrieben möglich, beinhaltet wenigstens zwei endotheliale Zelltypen, die LSEC-Antigen sowohl nur schwach, aber auch in höherem Mass exprimieren. Für Milz- und Lebergewebe besteht eine zu grosse Unsicherheit, ob es sich bei den CD31+, LSEC-, PI- Zellen, welche im Mittel kleiner sind als CD45+ Leukozyten dieser Gewebe ebenfalls um endotheliale Zellen handelt.

Die Gewebe von Niere, Herz und Lunge hingegen erscheinen als nahezu einheitliche Population von schwach LSEC-Antigen exprimierenden Zellen, wobei das Profil der Nierenzellen am uneinheitlichsten ist.



Eine Isolierung von endothelialen Zellen über anti LSEC-beads im MACS erscheint zum Zwecke der Kultivierung somit lediglich für Lebergewebe sinnvoll, denn der Zellgewinn aus Lymphknoten und Milzgewebe ist gering. Interessant ist jedoch die Bedeutung von LSEC-Antigen hochexprimierenden endothelialen Subpopulationen in Leber, Lymphknoten und Milz. Drei Organe, die an wesentlichen Immunfunktionen beteiligt sind.

4.2.2. Statistischer Vergleich von endothelial-exprimiertem LSEC

Die Fluoreszenzintensität für das LSEC-Signal speziell auf endothelialen Zellen des Lungengewebes (wie unter 4.2.1. dargestellt) wurde im Vergleich zur Fluoreszenzintensität des LSEC-Signals auf endothelialen Zellen des Herzgewebes statistisch überprüft. Dazu wurden die MFI-Quotienten (vgl. 3.8.1.) der LSEC-Signale miteinander verglichen. Die Probenzahl für das Herz- sowie das Lungengewebe betrug jeweils ($n_{\text{Lunge}}=4$ und $n_{\text{Herz}}=4$). LSEC scheint danach auf endothelialen Zellen des Lungengewebes nicht stärker exprimiert zu sein, auch wenn Abbildung 8 dies suggerieren könnte.

LSEC Herzendo.	-	LSEC Lungenendo.	n.s.
----------------	---	------------------	------

(- : Kein Unterschied, n.s., nicht signifikant; Probenanzahl Herz: $n_{\text{Herz}}=4$; Probenanzahl Lunge: $n_{\text{Lunge}}=4$)

Abb. 9: LSEC-Antigen Expressionsvergleich von Herz- und Lungenendothelzellen

4.3. Isolierung muriner Endothelzellen mittels MACS und FACS

Verschiedene Variationen zur Isolierung von (CD31+, CD45-) Zellen wurden erprobt. Endotheliale Zellen konnten aus Herz- und Lungengewebe, aber auch aus Leber- und Lymphknotenmaterial mittels MACS angereichert werden. Die besten Resultate in Bezug auf die Reinheit und somit auf eine Isolation von Endothelzellen gelang mittels durchflusszytometrischer Sortierung. So konnten wir aus Lungengewebe einer acht Wochen alten weiblichen BALB/c Maus etwa 2×10^5 Zellen isolieren, die das Kriterium (CD31+, CD45-, PI-) erfüllten. Aus dem gesammelten Lymphknotengewebe von drei Mäusen gelang es, etwa 1×10^4 solcher Zellen zu separieren. Die Reinheit dieser Populationen betrug jeweils etwa 97-99%. Von solchen Isolaten wurden Proben genommen und mittels Zellzentrifugation auf Objektträger gebracht, um diese mikroskopisch näher zu untersuchen. Sämtliche Versuche, aus solchen Zellisolaten konfluent wachsende Zellkulturen zu erzeugen, scheiterten jedoch. Viele Zellen setzten sich zwar in den Zellkulturtestplatten ab, doch gelang es diese nur wenige Tage am Leben zu erhalten. In Variation dazu versuchten wir auch eine Präparation/ Kultivierung nach einer Anleitung aus dem Labor um Professor Knolle (Heidelberg). Es gelang durch Anwendung eines Dichtegradienten aus Nycodenz und anschließender einfacher MACS-Sortierung mit anti LSEC-beads eine Isolation von ca. $1-3 \times 10^6$ Zellen (putative LSECs) aus Lebergewebe einer einzelnen acht Wochen alten, weiblichen BALB/c Maus zu erreichen. In der FACS-Analyse zeigte sich eine Reinheit von rund 98% dieser Zellen. Auch waren diese einheitlich CD31+. Doch es irritierten zweierlei Feststellungen. Zum einen liessen sich auch diese Zellen nicht

4. Ergebnisse

durch die Kombination aus CD31 mit CD45 von Leukozyten abgrenzen. Eine Besonderheit für endotheliale Zellen des Lebergewebes, die bereits wir mit unserem Präparationsprotokoll feststellen konnten. Doch die putativen LSECs, welche mit diesem neuen Präparationsprotokoll separiert werden konnten, wiesen darüber hinaus physikalische Streueigenschaften auf, die denen von leukozytären Zellen ähneln und somit aus Zellen bestanden, die im Mittel die gleiche Grösse hatten wie Neutrophile Granulozyten. Diese putativen Lebersinusendothelzellen bestanden somit aus Zellen die im Mittel grösser waren, als die endothelialen Zellen, die wir bislang in sämtlichen Organen, einschliesslich der Leber haben vorfinden können. Zudem konnte die von uns als CD31 und LSEC kopositiv identifizierte Population, die im Mittel aus kleineren Zellen bestand, verglichen mit Leukozyten in solchen Leberpräparationen, nicht vorgefunden werden. Dazu kommt, dass sich zwar ein Grossteil der putativen Lebersinusendothelzellisolate in Zellkulturtestschalen setzte, doch konnte auch hier kein ausreichend konfluentes Wachstum festgestellt werden, wie es für etwaige Transmigrationsexperimente erforderlich gewesen wäre. Solche Kulturen konnten in EGM2 Medium für etwa eine Woche erhalten werden.

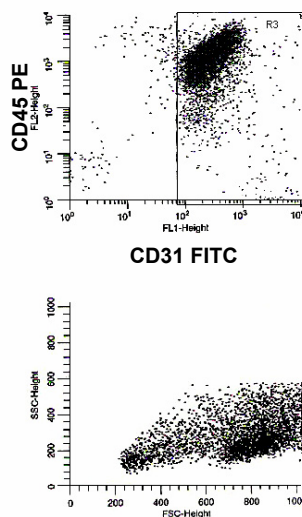


Abb. 10: Putative Lebersinusendothelzellen nach einem Nycodenz-Gradienten und einfacher MACS-Anreicherung (vgl. 4.1.1.).

Die Reinheit von putativen LSECs in R3 beträgt ca. 98%. Die untere Abbildung zeigt die Lage dieser Zellen im FSC-SSC Diagramm. Die Analyse erfolgte durch Setzung einer Region R1 im FSC-SSC Diagramm zum Trümmerauschluss und anschliessende Überprüfung auf PI-Negativität. Es wurden dieselben FACS-Einstellungen beibehalten, wie für Punkt 4.1.1. (vgl. Abb.: 7).

Die MACS-Separationsvorgänge erwiesen sich als unzureichend und schlecht funktionierend, wenn nicht eine weitere Aufreinigungstechnik damit kombiniert wurde, wie etwa eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Nycodenz, oder aber eine durchflusszytometrische Nachsortierung.

4.4. Murine Primärzellkulturen aus Aortenexplantaten

Ein anderer Ansatz zur Kultivierung endothelialer Zellen aus murinem Gewebe war der Versuch, diesen Zelltyp mittels Aortenexplantaten zu gewinnen. Dabei umgeht man den Gewebsverdauungsprozess. Die Methode der Endothelzellkultivierung durch Aortenexplantate ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden. Die Zellausbeute mit dieser Methode war beeindruckend. Es bedurfte lediglich 10 -14 Tagen um einen konfluenten Zellrasen in einer 10cm Kulturschale aus dem Gewebe dreier Aortenbäume zu generieren. Das entspricht etwa 2×10^6 Zellen. Doch sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im FACS konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Zellen offenbar nicht um endotheliale Zellen handelte. Denn lediglich 0,5% der gezüchteten Zellen vor der ersten Passage waren CD31+ und noch ca. 0,3% etwa 9 Tage nach der ersten Passage konnten als CD31+ identifiziert werden. Auch das Wuchsbild dieser Zellen vermittelte den Eindruck eines inhomogenen Zelltyps. Zwar waren inselartige Abschnitte zu erkennen, die ein in der Literatur beschriebenes „kopfsteinpflasterartiges“ Wuchsbild aufwiesen, doch liess sich so keine homogene Primärendothelzellkultur erzeugen, um damit Transmigrations-Assays durchzuführen. Die Abbildung 11 zeigt exemplarisch Zellen aus Aortenexplantaten am Tag 9 nach der ersten Passage. Immerhin konnte man die Spezifität des mCD155 Antikörpers „3F1“ stützen. So wurden Zellkulturen aus Aortenexplantaten von einer mCD155 Knock-out-Maus, einer Wildtypkontrolle und einem für mCD155 heterozygotes Tier hergestellt. So liessen sich diese Zellen auf deren mCD155 Expressionsmuster untersuchen, wie in Abbildung 12 dargestellt.

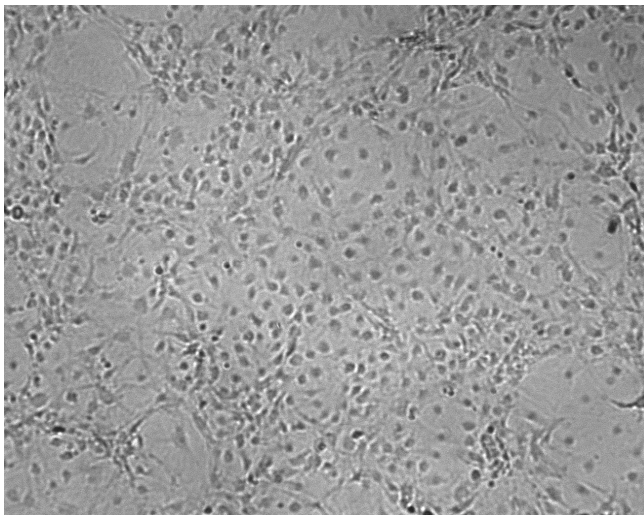


Abb. 11: Zellkultur Aortenexplantat: 9 Tage nach Passage 1 im 10x Phasenkontrast

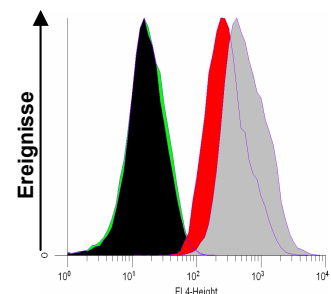


Abb. 12: mCD155 Expression kultivierter Aortenzellen: 22d nach Explantation, Zustand 9d nach Passage 1; (Gate auf lebenden Zellen).

mCD155 Wildtypkontrolle (WT)
 mCD155 Heterozygot (HT)
 mCD155 Knock-out (KO)
 mCD155 Isotypkontrolle (der WT-Probe)

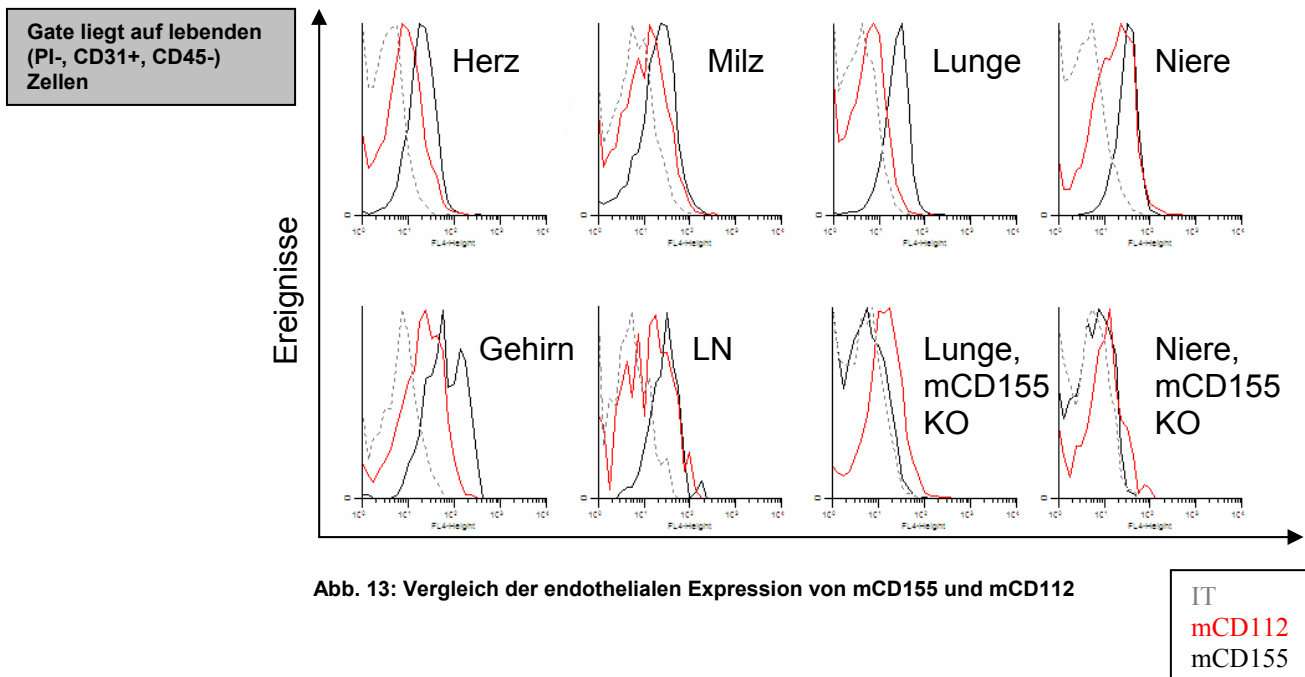
4.5. Expression von Molekülen der Nectinfamilie auf endothelialen Zellen

4.5.1. Durchflusszytometrischer Nachweis von mCD112 und mCD155

Über PVR (CD155) und PRR2 (CD112) ist bekannt, dass diese auf einer Vielzahl verschiedener Zelltypen exprimiert werden, darunter auch auf Endothelzellen. Von Interesse ist es zum einen mehr über die Expressionsmuster von mCD112 und mCD155 muriner Zellen zu lernen. So könnte man auch mehr über die Orthologie von humanem CD155 und mCD155 erfahren. Zum anderen ist es interessant, ob sich womöglich Unterschiede in Bezug auf die Expressionsstärke dieser Rezeptoren auf endothelialen Zellen verschiedener Organe im Vergleich finden lassen.

Die Abbildung 13 stellt im Einfachfluoreszenzdiagramm Fluoreszenzüberlagerungen der Signale für mCD112 (mPRR2), mCD155 (Tage4) und die Isotypenkontrolle dar. Der untersuchte Zelltyp ist definiert als (CD31+, CD45-, PI-) (vgl. 4.1.1. bzw. 4.1.2.) und daher als endothelial bezeichnet. Die Graphen stehen repräsentativ für wenigstens zwei unabhängige Experimente. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden pro Experiment mehrere Organe parallel zur FACS-Messung aufbereitet. Da es jedoch methodisch nicht möglich war stets sämtliche dieser Gewebe parallel zur FACS-Messung zu präparieren, wurden in weiteren Versuchen verschiedene Kombinationen dieser Organe prozessiert. Somit konnten dann die Expressionsmuster für mCD112 und mCD155 direkt miteinander verglichen werden (vgl. Methoden, 3.1.1.).

Die Spezifität der Signale für mCD155 wurde darüber hinaus durch die Präparation einiger Organe von mCD155 Knock-out Mäusen gesichert (Herz, Lunge, Niere).



Betrachtet man die Diagramme, fällt auf, dass die Signale sowohl für mCD155 als auch für den mCD112 schwach ausfallen. Auffallend ist jedoch auch, dass sich das Signal für mCD112 stets als geringer darstellt, als das für mCD155. Die Ausnahme von dieser Beobachtung findet sich im Nierengewebe. Hier sind endotheliale Zellen zu finden, für die sich im ähnlichen Ausmass Fluoreszenzsignale für mCD112 und mCD155 nachweisen lassen. Aber auch in der Niere sind gleichzeitig endotheliale Zellen vorhanden, die ein nur sehr schwaches mCD112 Signal vorweisen. Eine „Zweigipfligkeit“ des Signals für mCD112 findet sich neben dem Nierengewebe auch auf endothelialen Zellen der Milz. Hier sogar noch deutlicher. Jedoch gilt es auch hier eine Einschränkung der Datensicherheit bezüglich des Milzgewebes zu beachten (vgl. 4.1.2.). Eine ausgeprägte „Zweigipfligkeit“ des mCD112 Signals findet sich bei Lymphknotenendothelzellen (LN). Hier sind zwei endotheliale Zellpopulationen zu unterscheiden: mCD155+/ mCD112- und mCD155+/ mCD112+ (HEV-Endothelzellen sind mCD155+/ mCD112+). Die Feststellung des Vorhandenseins von mCD155+ jedoch gleichzeitig mCD112- Endothelzellen, stimmt mit fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen der Arbeitsgruppe überein.

Auffallend ist auch, dass das mCD155 Signal der endothelialen Zellen dieser sechs Organsysteme sich stets nahezu „eingipflig“ darstellt. Die Ausnahme von dieser Beobachtung ist einzig im Diagramm des Gehirns zu erkennen. Hier erscheint das Signal für mCD155 „zweigipflig“. Man erkennt, dass das Signal für mCD155 auf einer endothelialen Subpopulation des Gehirns deutlich stärker ausfällt, verglichen mit dem der übrigen Organe.

4.5.2. Statistischer Vergleich von endothelial-exprimiertem mCD112 und mCD155

Anhand der Daten, welche aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen gewonnen werden konnten liessen sich statistische Vergleiche der mCD112 und der mCD155 Signale zwischen endothelialen Zellen von Herz- und Lungengewebe anstellen. Dazu wurden die MFI-Quotienten (vgl. Methoden 3.8.1.) der miteinander verglichenen Werte gebildet. Das Signal von mCD155 auf endothelialen Zellen von Herzgewebe (n=7) scheint sich dabei nicht von der mCD155-Signalgebung endothelialer Zellen von Lungengewebe (n=7) zu unterscheiden. Dieses ist ebenfalls für mCD112 der Fall, wenngleich Abbildung 13 dieses anders suggerieren könnte. Zur Übersicht dient die Abbildung 14.

4. Ergebnisse

Zusammenfassend:

mCD155 Herzendo.	–	mCD155 Lungenendo.	n.s.
mCD112 Herzendo.	–	mCD112 Lungenendo.	n.s.

(- : Kein Unterschied, n.s., nicht signifikant; Probenanzahl Herz: $n_{\text{Herz}}=7$; Probenanzahl Lunge: $n_{\text{Lunge}}=7$)

Abb. 14: Übersichtstabelle der mCD112 und mCD155 Expression endothelialer Zellen des Herz- und Lungengewebes

4.6. LPS-Experimente

4.6.1. Allgemeines

Von besonderem Interesse ist es, ob sich die endotheliale Expression von mCD112 und mCD155 verändert, wenn es zu Entzündungsreaktionen kommt. Um möglichst realitätsnahe Daten erheben zu können, bediente man sich Experimenten am lebenden Tier (vgl. Methoden, Punkt: 3.5.). Es ist bekannt, dass die intraperitoneale (i.p.) Applikation von LPS eine generalisierte Entzündungsreaktion im Mausorganismus bewirkt. Insgesamt wurden vier unabhängige in vivo Experimente dieser Art durchgeführt. Die Verfahrensweisen zur Organpräparation, Einzelzellseparation, Antikörperfärbung und FACS-Analyse sind im Methodenteil zu finden (vgl. Methoden Punkt: 3.1., 3.2., 3.5., sowie 4.1.1.).

4.6.2. LPS-bedingte pulmonale Leukozytenrekrutierung

Als Kontrolle für die erfolgreiche Stimulierung einer Entzündungsreaktion im Maussystem konnte Folgendes gefunden werden: Da bei sämtlichen dieser Versuche Lungengewebe prozessiert und stets mit PI, CD31 und CD45 gefärbt wurde, war es möglich den Leukozytenanteil im Lungengewebe über CD45 zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass der Anteil sowohl der Gesamtleukozyten, als auch einer leukozytären Subpopulation, die Neutrophilen Granulozyten am ehesten nahekommen dürfte (ich verweise auf das Diskussionskapitel), bei sämtlichen der mit LPS auf die oben beschriebene Weise behandelten Tiere zunahm. Die Abbildungen 15-17 zeigen diese Daten solcher Experimente. Dargestellt sind jeweils die erhaltenen Mittelwerte mitsamt einfacher Standardabweichung. Die roten Balken repräsentieren die Daten der LPS-behandelten Tiere. Die weissen Balken stellen die Werte der unbehandelten Kontrolltiere dar.

Der Anteil der Gesamtleukozyten wurde bestimmt durch (vgl. 4.1.1.):

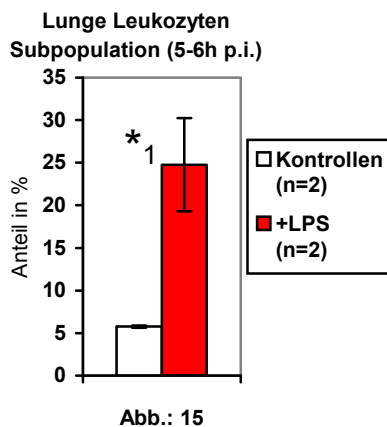
- Legen eines Gates auf putativ vitale Zellen im FSC-SSC Diagramm (Trümmerausschluss);
- Verknüpfung dieses Gates mit einem Einfachfluoreszenzdiagramm (FL3 für Propidiumiodid zum Ausschluss toter Zellen);
- Verknüpfung des FSC-SSC Gates und des FL3 Gates mit einem 2-fach Fluoreszenzdiagramm (FL1 CD31FITC – FL2 CD45PE);
- Ermittlung des Anteils (CD45+, PI-) Zellen.

Der Anteil der leukozytären Subpopulation wurde dann bestimmt durch:

- Verknüpfung dieser CD45+, PI- Zellfraktion auf ein neues FSC-SSC Diagramm;
- Darin erfolgte dann die Anteilsbestimmung der sich unter LPS-Einfluss deutlich verändernden Population, putativer Neutrophiler Granulozyten.

4.6.2.1. 5-6h nach der Gabe von 50µg LPS i.p.

Abbildung 15 ist repräsentativ für lediglich ein Experiment mit zwei LPS-behandelten Tieren und zwei unbehandelten Kontrollen. Etwa 5-6 Stunden nach der i.p. Injektion von 50µg LPS wurden die Tiere getötet. Das Diagramm 15 zeigt, dass bereits nach 5-6h eine im Mittel Vervierfachung dieser leukozytären Subpopulation zustande gekommen ist. Das Sternchen-1 deutet dabei einen signifikanten Unterschied beider Gruppen zum Signifikanzniveau von $p < 0,05$ an.



BALB/c: Kontrollen (n=2); +LPS (n=2); 5-6h.

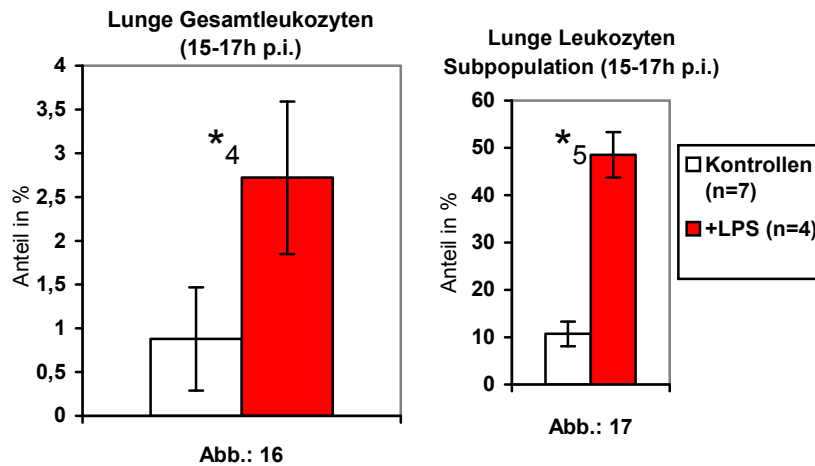
(Der Fehlerbalken der Kontrollen ist nicht erkennbar, da die Standardabweichung zu gering ausfällt.)

*1 signifikant ($p < 0,05$)

4.6.2.2. 15-17h nach Gabe von 50µg LPS i.p.

Die Diagramme 16 und 17 entstammen den zusammengefassten Daten zweier unabhängiger Experimente (BALB/c Mäuse), bei denen eine Stimulationszeit von etwa 15-17h gewählt wurde. Das Diagramm 16 „Lunge Gesamtleukozyten“ veranschaulicht den Anteil der Gesamtleukozyten im Lungengewebe in Bezug zum Anteil der Gesamtheit erhaltener, vitaler (PI-) Zellen. Man erkennt, dass sich der Gesamtleukozytenanteil im Lungengewebe der +LPS-Tiere im Mittel um einen Faktor von etwa drei erhöht.

Das Balkendiagramm „Lunge Leukozyten Subpopulation“ stellt die Population heraus, die den massgeblichen Anteil an der Gesamtleukozytenzunahme im Lungengewebe LPS-behandelter Mäuse ausmacht. Diese leukozytäre Subpopulation ist im Lungengewebe LPS-behandelter Tiere im Mittel um den Faktor von etwa 4,5 grösser verglichen mit den Kontrolltieren.



*4 signifikant ($p < 0,001$)

*5 signifikant ($p < 0,0001$)

Zusammengefasst:

Die Feststellung einer Leukozytenzunahme im Lungengewebe +LPS-Tiere konnte man bereits 5-6h nach der i.p. Injektion von LPS beobachten. Diese hielt auch noch mindestens 15-17h nach der LPS-Injektion an.

4.6.3. Endotheliales mCD112 und mCD155 unter LPS-Einfluss

Die Abbildungen 18-27 zeigen die jeweils erhaltenen MFIQ-Mittelwerte (vgl. Methoden 3.8.1.) für die jeweiligen Antigene (mCD112, mCD155, LSEC) auf Endothelzellen untersuchter Gewebe mitsamt einfacher Standardabweichung. Die roten Balken repräsentieren die Daten der LPS-behandelten Tiere (+LPS). Die weissen Balken stellen die Werte der Kontrolltiere dar.

4.6.3.1. 5-6h nach der Gabe von 50µg LPS i.p.

In einem einzelnen Experiment wurden zwei BALB/c Mäusen 50µg LPS i.p. injiziert und nach bereits 5-6h die Organe zur FACS-Messung aufbereitet (vgl. 4.6.2.1.). Hierbei konnten wir bei den +LPS-Tieren keinen Unterschied der Expression von mCD155 auf endothelialen Zellen der Lunge verglichen mit der von zwei Kontrolltieren finden. Abbildung 18 verdeutlicht dieses.

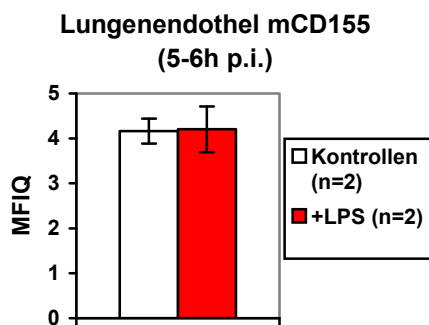
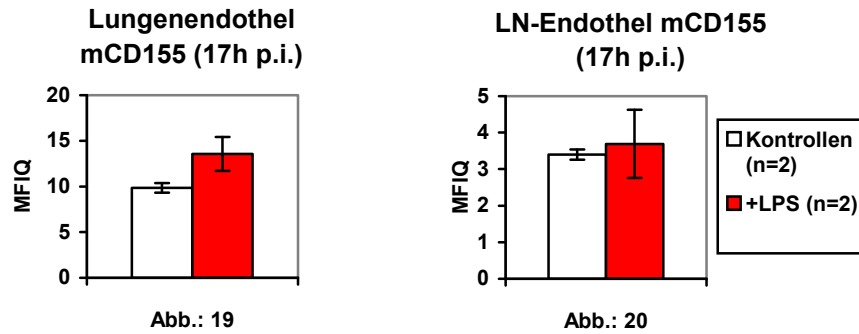


Abb.: 18

4.6.3.2. 17h nach der Gabe von 50µg LPS i.p. in C57bl6

Ein weiteres Experiment fand in C57bl6 Mäusen statt. Hier wurde 17h mit der Organentnahme gewartet. Präpariert wurden Lymphknoten- und Lungengewebe. Es fanden sich im Lungengewebe Hinweise auf eine mögliche Expressionszunahme des mCD155 der zwei +LPS-Tiere verglichen mit den beiden Kontrolltieren. Der Unterschied beider Gruppen für das Lungengewebe ist jedoch nicht signifikant. Der errechnete t-Wert liegt bei $t = 2,74$ ($t_{krit} = 2,92$). Somit liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit bei $0,05 < p < 0,2$. Die Abbildungen 19 und 20 sollen die Ergebnisse verdeutlichen.



So lässt sich nur eine Tendenz für eine etwaige Hochregulation von mCD155 auf Lungenendothelien nach 17-stündiger LPS-Stimulation vermuten.

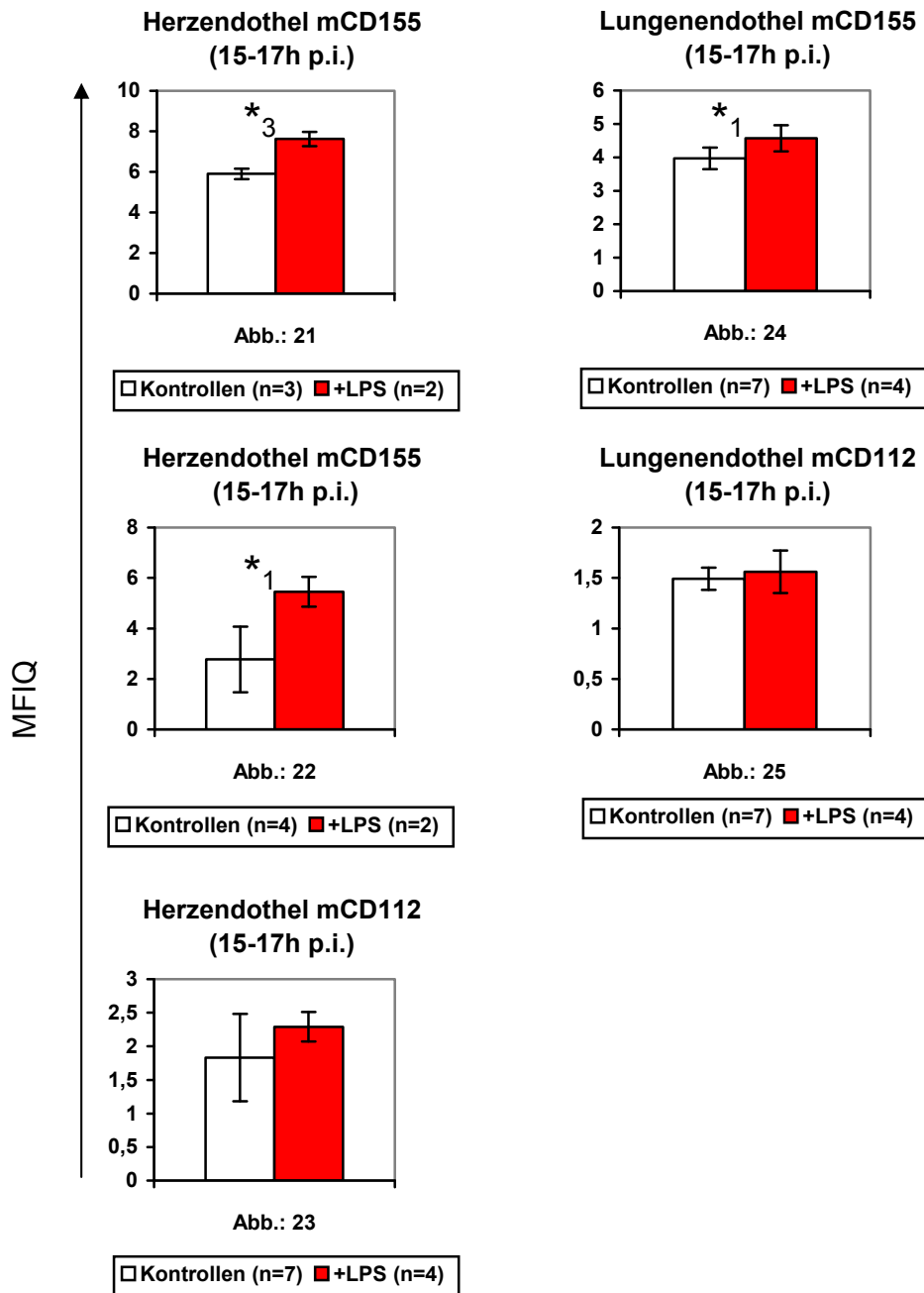
4.6.3.3. 15-17h nach der Gabe von 50µg LPS i.p. in BALB/c

Zwei weitere Experimente dieser Art wurden in BALB/c durchgeführt. Neben dem Lungengewebe wurde nun der Einfachheit halber Herzgewebe zur FACS-Messung prozessiert. In diesen Experimenten wurden jeweils zwei +LPS-Tiere einmal mit drei und einmal mit vier Kontrolltieren verglichen.

Die Resultate dieser beiden Versuche sind in den Abbildungen 21-27 dargestellt.

Für jedes dieser beiden separaten Experimente deutet sich eine signifikante Zunahme der mCD155 Expression auf endothelialen Zellen von Herzgewebe an. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten liegen dabei zum einen bei $p < 0,05$ (Sternchen-1) und zum anderen bei $p < 0,01$ (Sternchen-3).

Eine signifikante Zunahme der mCD155 Expression konnten wir auch auf endothelialen Zellen von Lungengewebe nachweisen. Dazu wurden die ermittelten MFIQs der beiden Experimente zusammengefasst, so dass man vier +LPS-Tieren sieben Kontrollen zuordnen konnte. So ergab sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit für eine eventuelle Übereinstimmung der Mittelwerte der Grundgesamtheiten μ_{+LPS} und $\mu_{Kontrollen}$ von $p < 0,05$. Bezüglich der mCD112 Expression fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Jedoch lässt sich ebenfalls für dieses Molekül eine Expressionssteigerung auf endothelialen Zellen sowohl von Herz- als auch Lungengewebe vermuten. Dies deuten die einheitlichen Zunahmen der MFIQ-Mittelwerte +LPS-Tiere im Vergleich zu den Kontrollen an, doch wäre eine höhere Fallzahl nötig.

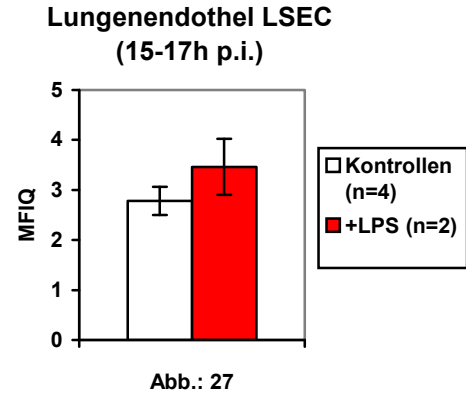
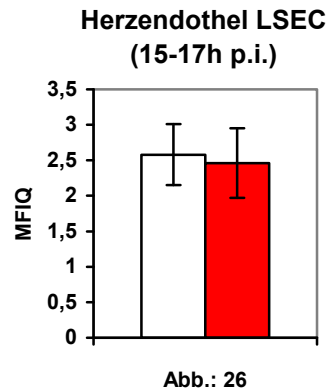


*1 signifikant ($p < 0,05$)

*3 signifikant ($P < 0,01$)

4. Ergebnisse

Ebenso wie bei mCD112 lässt sich auch für LSEC-Antigen kein signifikanter Unterschied zwischen +LPS-Tieren und den Kontrollen finden. Doch kann man zumindest für Lungenendothelzellen eine LSEC-Antigen Expressionszunahme vermuten, nicht jedoch für endotheliale Zellen von Herzgewebe im Gegensatz zu mCD112. Zur weiteren Klärung wären auch für LSEC-Antigen wiederholte Experimente mit somit höheren Fallzahlen nötig.



Diese Daten einer LPS-bedingten Expressionszunahme von mCD155 auf endothelialen Zellen von Herz- sowie Lungengewebe sollten in weiterführenden Experimenten, sowohl dieses Typs, als auch eventuell mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zusätzlich gesichert werden. Die Abweichung der Mittelwerte der LSEC-Antigenexpression auf Lungenendothelzellen beläuft sich auf rund 24%, ist jedoch nicht signifikant. Es fand sich für Lungenendothelzellen eine mittlere Expressionssteigerung für mCD155 von 15%. Der ermittelte Expressionszuwachs von mCD155 auf Herzendothelzellen betrug zwischen rund 29 bis 97%.

4.6.4. In vitro Stimulation von Zellen murinen Lungengewebes über 15h

Die Lungen zweier BALB/c Mäuse wurden mit PBS gründlichst perfundiert und anschliessend wie zur FACS-Analyse (vgl. 3.1.1., 3.1.2., 3.1.5., 3.2.2.) prozessiert. Die aus dem Verdau erhaltenen Einzelzellsuspensionen wurden in sechs Vertiefungen einer Zellkulturtestplatte aufgeteilt. Jeweils ca. 4×10^7 Zellen wurden in je 2ml DMEM 4500 Glukose aufgenommen. Den drei +LPS-Proben wurde LPS (Serotyp 026: B6 aus E. Coli) in einer Endkonzentration von $2\mu\text{g/ml}$, $25\mu\text{g/ml}$ und $50\mu\text{g/ml}$ hinzugefügt. Von den hier als Kontrollen bezeichneten Proben erhielt keine LPS. Jedoch wurden zwei dieser im Nachhinein als Kontrollen bezeichneten Proben TNF-alpha in einer Endkonzentration von einmal 3ng/ml und 7ng/ml zugesetzt. Eine Kontrolle blieb gänzlich ohne Zusatz von TNF-alpha. Diese Zellsuspensionen wurden dann im Kulturschrank für 15h stimuliert bzw. aufbewahrt und anschliessend der FACS-Analyse zugeführt. Je Probe konnten lediglich 5×10^4 Ereignisse eingemessen werden. Beobachtungsziel waren (CD31+, CD45-, PI-) endotheliale Zellen (vgl. 3.2.3., 4.1.1.). Zur Auswertung wurden auch hier die MFIQ-Werte errechnet (vgl. 3.8.1.). Dargestellt sind auch hier die erhaltenen Mittelwerte mitsamt der einfachen Standardabweichung. Die Sternchen-1/ -2 deuten dabei einen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen in Bezug auf die mCD112 und mCD155 Expression an.

**Lungenendothel mCD112
(15, in vitro)**

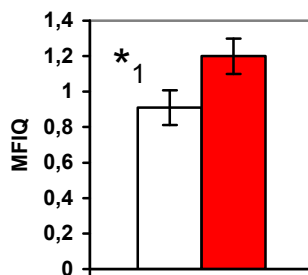


Abb.: 28

**Lungenendothel mCD155
(15h, in vitro)**

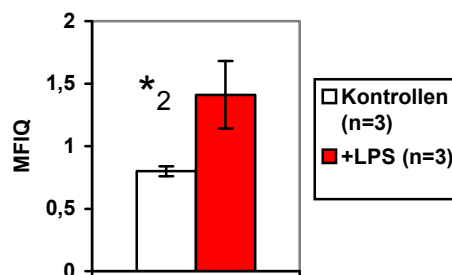


Abb.: 29

*₁ signifikant ($p < 0,05$)

*₂ signifikant ($p < 0,02$)

Nicht zuletzt, da es sich hier um einen einzelnen Versuch handelt, ist dieses Experiment eher als Fingerzeig auf eine mögliche endotheliale Hochregulation von mCD155 und mCD112 anzusehen. Das Signal der (mCD112 und mCD155) Isotypkontrolle „1H4“ war hier verhältnismässig hoch, so dass der MFI-Quotient < 1 ist. Dieser Versuch war letztlich der Anlass für die 15-17h in vivo LPS-Stimulationen (vgl. 4.6.3.2. und 4.6.3.3.).

4.7. Adoptive Lymphozytentransfers

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob sich für mCD155/ Tage4 eine Teilfunktion bei der transendothelialen Migration von naiven (nicht stimulierten) Lymphozyten nachweisen lassen könnte. Die experimentelle Vorgehensweise wird im Methodenteil dieser Arbeit ausführlich beschrieben. Resultate sind in den Abbildungen 33–38 zusammengestellt. Sie wurden aus den FACS-Daten dieser Experimente ermittelt. Zur Veranschaulichung der Vorgehensweise dieser Analytik dient Abbildung 30. Eine Region R1 wurde in einem FSC-SSC Diagramm zum Trümmerausschluss erstellt. In einem Zweifachfluoreszenzdiagramm wurden diese vorselektierten Zellen für CD3 gegen CFSE (T-Lymphozyten) bzw. für B220 gegen CFSE (B-Lymphozyten) dargestellt. Daraufhin wurden (CD3+/CFSE+) Zellen (R3) auf eine Expression von CD4 und CD8beta (CD8 β) in einem weiteren Zweifachfluoreszenzdiagramm analysiert, um so (CD3+/CD4+) T-Zellen (R9), von (CD3+/CD8beta+) T-Zellen (R6) und von (CD3+/CD4+/CD8beta+) Zellen (R7) differenzieren zu können. Zur Identifikation von B-Lymphozyten begnügten wir uns mit B220 (R11). Dieser ist zwar nicht nur auf B-Lymphozyten exprimiert, doch aufgrund des durch den Lympholyte-M-Gradienten (vgl. 3.) vorselektierten Zellpools der nun CFSE+ Zellen, erschien uns dieser Marker als ausreichend.

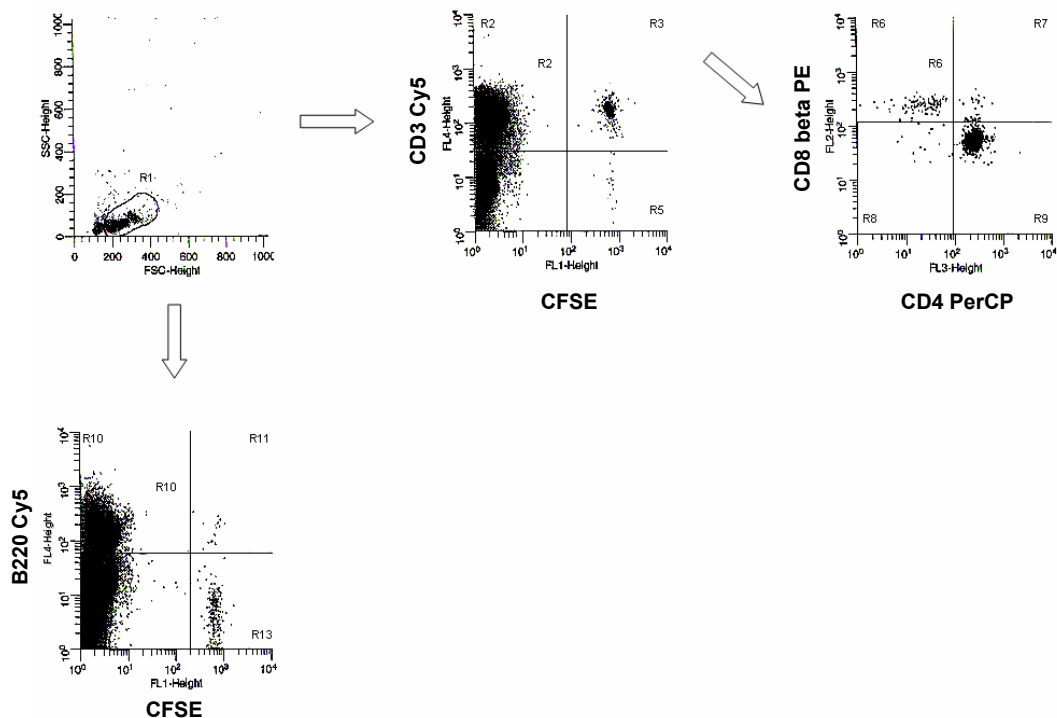


Abb. 30: Darstellung der Vorgehensweise zur Analyse durchflusszytometrisch erhobener Daten

Die nachfolgenden Säulendiagramme zeigen die entsprechenden Mittelwerte mitsamt der einfachen Standardabweichung.

4.7.1. Verhältnisse der CFSE-negativen residenten Lymphozytenfraktionen

von WT-Kontrolle und mCD155 Knock-out im Vergleich

Anteil CD3⁺ T-Lymphozyten in Bezug zu Gesamtzellen des jeweiligen sek. lymphat. Organs (periphere LNs; mesent. LN; Milz)

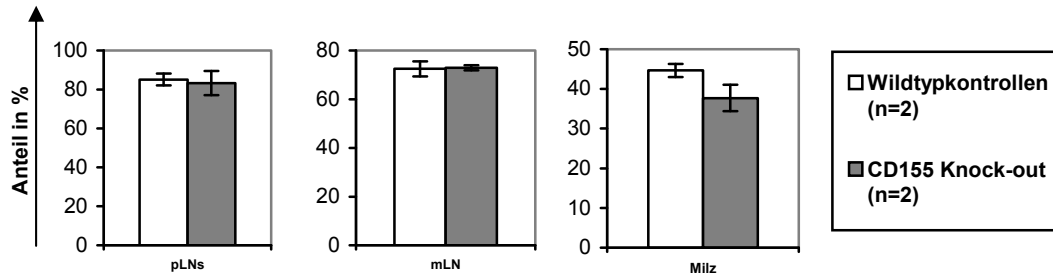


Abb.: 31

Anteil B220⁺ Zellen in Bezug zu den CFSE- Gesamtzellen des jeweiligen sek. lymphat. Organs (periphere LNs; mesent. LN; Milz)

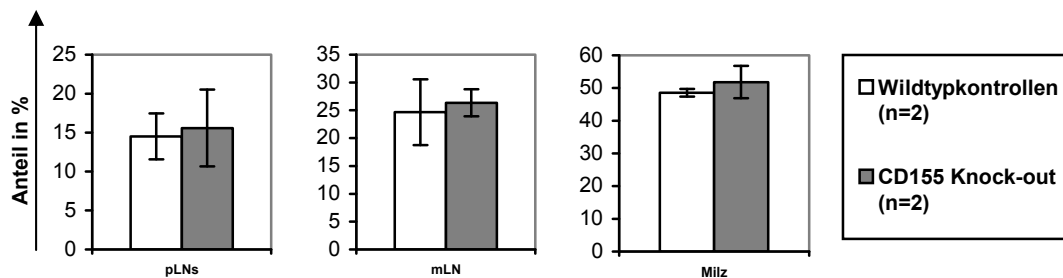


Abb.: 32

Anteilig befinden sich die meisten CD3⁺ Zellen im Lymphknotengewebe. Die meisten B220⁺ Zellen hingegen finden sich in der Milz. Signifikante Unterschiede in der Verteilung dieser Zelltypen beider Vergleichsgruppen finden sich nicht. Ob der im Mittel geringere CD3⁺ Zellanteil im Milzgewebe von mCD155 KO Tieren nicht zufallsbedingt ist, bleibt zu klären.

4. Ergebnisse

Zu Vergleichszwecken sind im Folgenden die Ergebnisse zweier verschiedener Typen eines Adoptiven Lymphozytentransfers gegenübergestellt worden, um somit eventuelle Tendenzen ausmachen zu können. Die methodische Vorgehensweise findet sich unter Punkt 3.6. des Methodenteils ausführlich beschrieben.

- Typ 1: Vergleichsgruppe (weiss-grau): Die Spenderzellen wurden aus normalen BALB/c WT-Mäusen gewonnen. Der Transfer dieser Zellen erfolgte in mCD155 KO Tiere (grau, n=2), sowie in entsprechende WT-Kontrolltiere (weiss, n=2).
- Typ 2: Vergleichsgruppe (gelb-blau bzw. lila): Die Spenderzellen wurden aus normalen BALB/c WT-Mäusen gewonnen. Der Transfer erfolgte in normale WT BALB/c Mäuse. Von diesen erhielt Gruppe (blau bzw. lila, n=3 bzw. n=2) 30 Minuten vor dem Zelltransfer anti mCD155 Antikörper i.v.. Die Vergleichsgruppe erhielt stattdessen einen Isotypkontrollantikörper i.v..

4.7.2. Anteil transferierter CFSE+ Zellen im Empfängerewebe

(anteilig vom Gesamtzellpool des jeweiligen sek. lymphat. Gewebes)

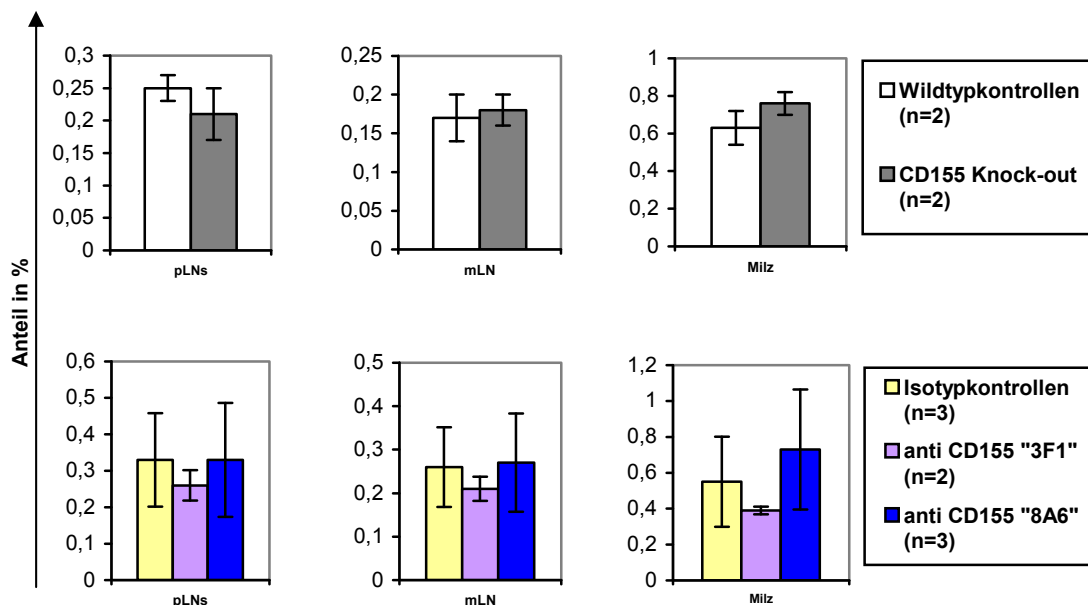


Abb.: 33

Zunächst lässt sich den Daten entnehmen, dass der Grossteil der transferierten Zellen offenbar im Milzgewebe vorzufinden ist. Diese Aussage ist nicht nur für den relativen Zellanteil innerhalb des Milzgewebes, sondern auch als absolute Zahl gültig. Doch

dann schon wird deutlich, dass zwischen den jeweiligen Vergleichsgruppen kein bemerkenswerter Unterschied bezüglich des Anteils CFSE+ Zellen in präparierten sekundär-lymphatischen Organen vorzufinden ist. Dieses ist der Fall sowohl bei mCD155 Knock-out im Vergleich zu Wildtypkontrolltieren, als auch bei Versuchsreihen, in denen Antikörper gegen mCD155 Anwendung fanden.

Allerdings geben diese Daten noch keinen Aufschluss darüber, ob eventuell Verschiebungen einzelner Zellpopulationen CFSE+ Zellen innerhalb dieser sekundär-lymphatischen Organe stattgefunden haben. Zur Abklärung dieser Möglichkeit sollen die nachfolgenden Säulendiagramme beitragen.

4.7.2.1. Anteil transferierter B220+ Zellen

((CFSE+/B220+/CD3-) Zellen im Empfängergewebe anteilig vom CFSE+ Gesamtzellpool)

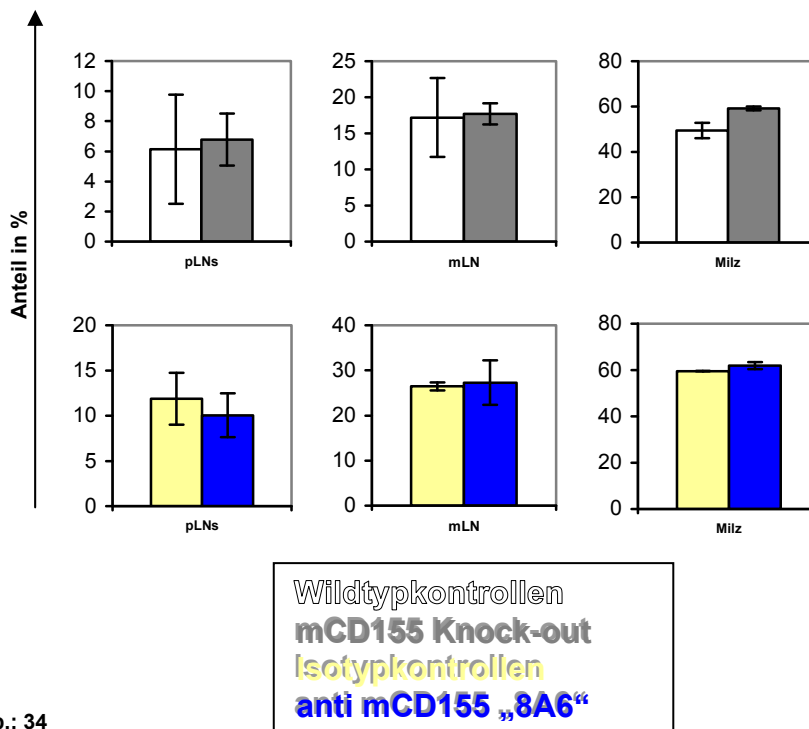


Abb.: 34

Der grösste Anteil der transferierten B220+ Zellen lässt sich im Milzgewebe wiederfinden. Dies passt zum Verteilungsmuster unter Punkt 4.7.1.. Signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen bestehen nicht. Interessant könnte möglicherweise der im Mittel geringfügig erhöhte Anteil B220+ Zellen im Milzgewebe von mCD155 KO- und von mit anti mCD155 Antikörpern-behandelten Tieren sein.

4.7.2.2. Anteil transferierter T-Lymphozyten

((CFSE+/B220-/CD3+) Zellen im Empfängergerewebe anteilig vom CFSE+ Gesamtzellpool)

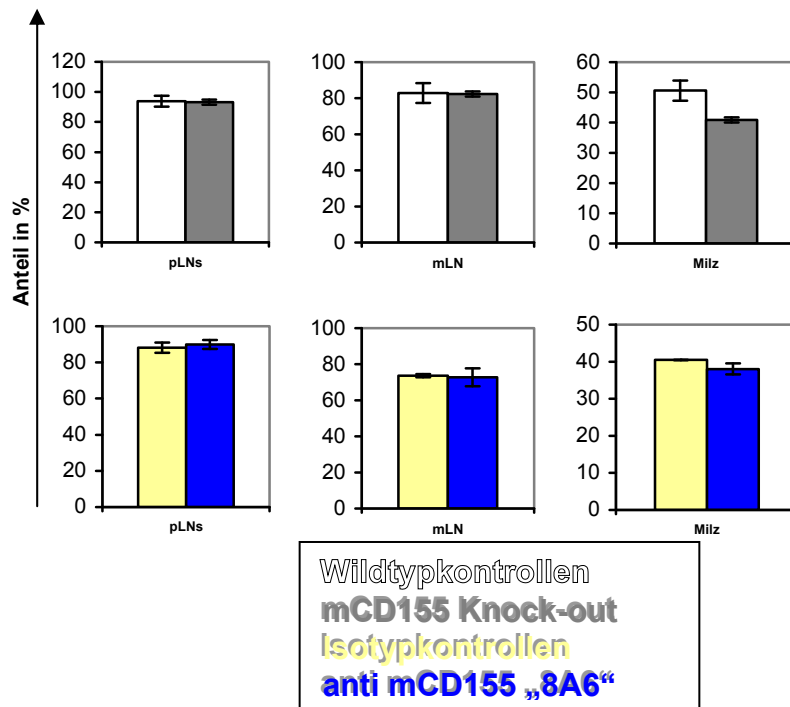


Abb.: 35

Der Grossteil der transferierten Zellen besteht aus CD3+ Lymphozyten. Diese finden sich hauptsächlich in den Lymphknotenregionen wieder. Der CD3+ Zellanteil im Milzgerewebe beträgt im Mittel weniger als 50% der dort vorgefundenen CFSE+ Zellen. Signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen bestehen nicht. Ob der im Mittel geringere Anteil an CD3+ Zellen im Milzgerewebe von mCD155 funktionsgehemmten Tieren nicht zufallsbedingt ist (eine mCD155 funktionshemmende Wirkung durch anti mCD155 Antikörpereinsatz wird angenommen), bleibt zu klären. Doch auch hier sind die Abweichungen der Mittelwerte beider Vergleichsgruppen klein.

Zur weiteren Differenzierung innerhalb der CD3+ Zellfraktion (T-Zellpool) dienen die nun nachfolgenden Diagramme, in denen die Verteilungen von (CD3+/CD4+), (CD3+/CD8 β +) und (CD3+/CD4+/CD8 β +) Zellen gegenübergestellt wurden.

4.7.2.3. Anteil transferierter CD4+ T-Zellen

((CFSE+/CD3+/CD4+/CD8 β -) Zellen im Empfängerorgewebe anteilig vom CFSE+ T-Zellpool)

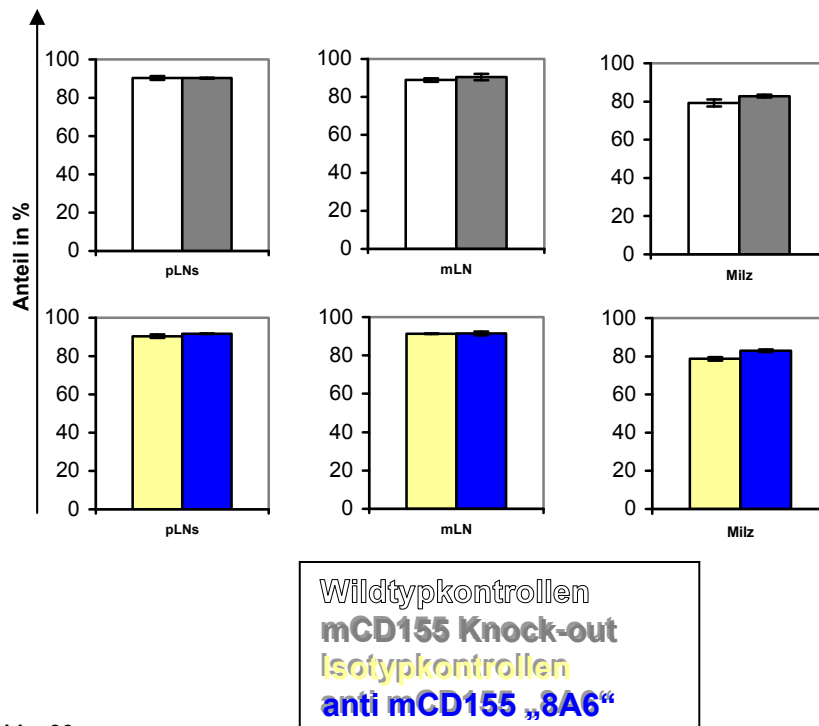


Abb.: 36

Der grösste Anteil der T-Lymphozyten wird durch CD4+ T-Lymphozyten gestellt. Die verhältnismässige (nicht die absolute Zellzahl) Verteilung transferierter CD4+T-Zellen scheint im Mittel recht homogen auf die drei sekundär-lymphatischen Organe verteilt zu sein. Wenngleich die absolute Zahl auch dieser Zellen im Milzgewebe überwiegt. Ob der im Mittel minimalst höhere CD4+ T-Zellanteil im Milzgewebe sowohl der mCD155 Knock-out Tiere im Vergleich zu den Wildtypkontrollen, als auch der mit dem anti mCD155 Antikörper „8A6“ behandelten Tiere verglichen mit den Isotypkontrollantikörper-Empfängern zufallsbedingt ist, könnte man weiter abklären.

4.7.2.4. Anteil transferierter CD8 β + T-Zellen

((CFSE+/CD3+/CD4-/CD8 β +) Zellen im Empfängergerewebe anteilig vom CFSE+ T-Zellpool)

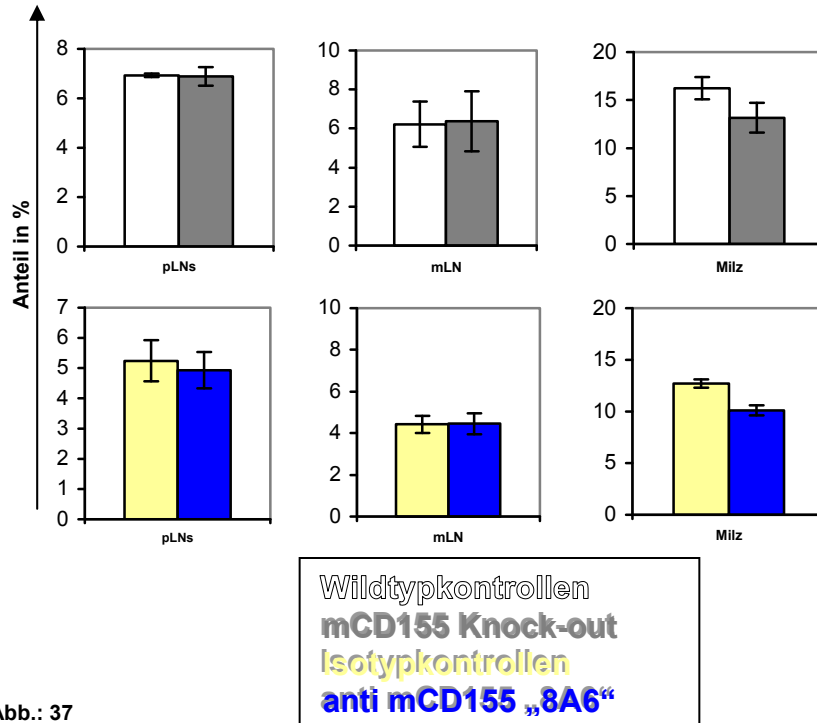


Abb.: 37

CD8 β + T-Zellen stellen nur einen geringen Teil der transferierten T-Zellen. Offenbar gelangen die meisten Zellen dieses Typs ins Milzgewebe.

Ansonsten findet sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Vergleichsgruppen. Ob der im Mittel geringere Anteil (CD3+/CD8 β +) Zellen im Milzgewebe sowohl bei mCD155 Knock-out Tieren als auch bei mit anti mCD155 Antikörpern-behandelten Tieren nicht auf einen Zufall zurückzuführen ist, könnte man abklären. Bemerkenswert ist zudem die Symmetrie beider Versuche zueinander bezüglich der Anteilsverteilungen (CFSE+/CD8 β +) T-Zellen.

4.7.2.5. Anteil transferierter CD4⁺/CD8^β + T-Zellen

((CFSE⁺/CD3⁺/CD4⁺/CD8^β +) Zellen im Empfängergerewebe anteilig vom CFSE⁺ T-Zellpool)

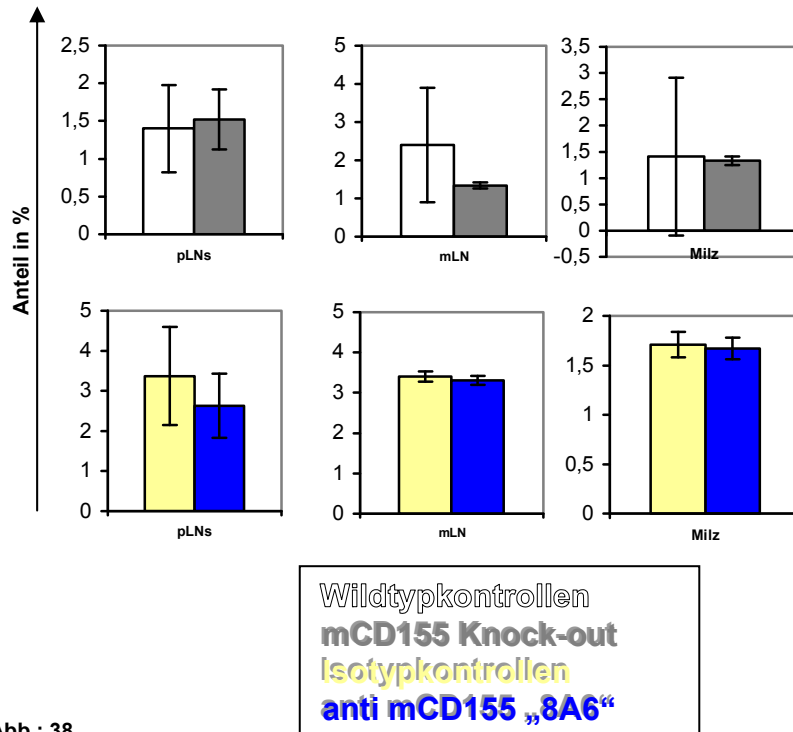


Abb.: 38

Der Anteil dieses Zelltyps ist recht gering, er scheint im Lymphknotengewebe verhältnismässig stärker vertreten zu sein als in der Milz. Auffällig sind die z.T. grossen Fehlerbalken, die sich u.a. auch auf den geringen Zellanteil zurückführen lassen. Auch hier finden sich keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen.

4.7.2.6. Zusammenfassung

Einen signifikanten Unterschied im Hinblick auf den Anteil CFSE⁺ und somit transferierter Zellen konnten wir weder bei mCD155 Knock-outs noch bei mit mCD155 Antikörpern behandelten Tieren im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen finden. Auch unter Einsatz von CD155FP und anti mCD112 Antikörpern (Daten nicht gezeigt) fand sich kein wirkliches Indiz für einen möglichen Einfluss dieser Nectine auf Transmigrationsprozesse transferierter naiver Lymphozyten.

Bedeutsame Verschiebungen leukozytärer Subpopulationen fanden sich ebenfalls in keinem dieser Experimente.

5. Diskussion

5.1. Allgemeines

Grundlage dieser Arbeit waren Beobachtungen, dass erstens Endothelien der Maus mCD112 und/oder mCD155 exprimieren (Nachweis durch Immunhistologie) und zweitens für humane Monozyten in vitro nachgewiesen wurde, dass huCD155 an der Transmigration durch Endothelien (HUVECs) beteiligt ist. Letzteres wird durch die Interaktion von endothelial-exprimiertem huCD155 mit huCD226 (DNAM-1) auf Monozyten ermöglicht.

Deshalb ist es von Interesse, die Expression von mCD155 und mCD112 auf Mausendothelien zu studieren, wozu eine Isolationsmethode endothelialer Zellen entwickelt werden sollte, die beides erlaubt hätte: Endothelzellen durchflusszytometrisch zu analysieren (und das Expressionslevel von mCD112 und mCD155 damit zu quantifizieren) und die isolierten Endothelzellen zu kultivieren. Weiterführend wären so in vitro Transmigrationsexperimente (im Maussystem) mit verschiedenen Leukozytenpopulationen durchführbar gewesen. Auch hätte so das endotheliale Expressionsverhalten von mCD112 und mCD155 unter Einfluss von etwa LPS untersucht werden können.

5.2. Durchflusszytometrische Untersuchung endothelialer Zellen

5.2.1. Allgemeines

Die Möglichkeit der Identifikation und Zuordnung endothelialer Zellen im FACS bietet mehrere Vorteile. Zum einen besteht so die Möglichkeit diese Zellen zu isolieren, sei es mittels FACS- oder durch MACS-Sortierungsvorgänge. Denn ein Ziel dieser Arbeit war der Kultivierungsversuch muriner Endothelzellen. Zum anderen ist man natürlich auch in der Lage eine Aussage darüber zu machen, ob sich diese Zellen in ausreichendem Mass aus murinem Gewebe präparieren lassen. Auch lassen sich durch FACS-Analysen Aussagen über die Expression von Oberflächenrezeptoren wie mCD155, oder auch mCD112 im direkten Organvergleich machen. Darüber hinaus ergibt sich dann die Perspektive auch funktionelle Aspekte der Oberflächenrezeptorenexpression muriner Endothelzellen untersuchen zu können. Denn es ist durchaus von Interesse, ob sich die endotheliale Expression von mCD112 und mCD155 beispielsweise durch Stimulierung von Entzündungsprozessen, wie durch LPS möglich, beeinflussen lässt. Eben hierbei liegt ein Vorteil der FACS-Analyse gegenüber der Immunfluoreszenzmikroskopie, da FACS-Ergebnisse klar quantifizierbar sind. Zudem war von einer schwachen Expression und somit einer erschwerten Nachweisführung von mCD155 auszugehen (Chadenau, 1994, 1996;

Ikeda, 2003). Daher ist das FACS als Untersuchungsmethode vorzuziehen. Denn die Durchflusszytometrie ermöglicht es bereits winzige Fluoreszenzunterschiede zu detektieren, wohingegen dieses in der Fluoreszenzmikroskopie nicht in diesem Umfang der Fall ist. Ein entscheidender Nachteil des FACS gegenüber der Immunfluoreszenzmikroskopie ist jedoch der, dass es nicht möglich ist eine eventuelle besondere Anordnung des mCD112/ mCD155 auf endothelialen Zellen ausfindig zu machen. Zudem lassen Einzelzellpräparationen aus Organgeweben keine detaillierten anatomisch-histologischen Zuordnungen mehr zu.

5.2.2. Analyse endothelialer Zellen verschiedener muriner Gewebe

Die Sicherheit der Charakterisierung eines Zelltyps gerade im FACS, wo eine anatomisch-histologische Zuordnung nicht mehr möglich ist, steigt mit der Anzahl der gegen zelltypspezifische Antigene gerichteten Antikörper.

Unser Ziel war es eine möglichst simple und universelle Färbestrategie zu entwickeln, um so mit möglichst wenigen Antikörpern eine Abgrenzung endothelialer Zellen verschiedener Organsysteme zu erzielen. Dazu scheint die Kombination aus einem panleukozytären Marker wie CD45 mit einem panendothelialen Marker wie CD31 geeignet. Wobei sich durch diese Färbekombination endotheliale Vorläuferzellen nicht abgrenzen lassen, da auch diese noch als CD45+ erscheinen sollen (Urbich und Dimmeler, 2004). Eine Abgrenzungsstrategie endothelialer Zellen für die Durchflusszytometrie durch Leukozytenmarker wie CD45 oder auch CD18 und/ oder CD31 als Endothelmarker wurde u.a. von Favre et al., 2003; Muczynski et al., 2003; Rauscher et al., 2003; Bailey et al., 2004; Katz et al., 2004; Kutcher et al., 2004; Hisatsune et al., 2005; Stadtfeld und Graf, 2005; Reutershan et al., 2006 beschrieben. Detaillierte Darstellungen zur Identifikation endothelialer Zellen mittels Durchflusszytometrie sind in der Literatur allerdings spärlich gesät.

Katz et al. erwähnten Probleme bei der Darstellung endothelialer Zellen des Lebergewebes (speziell LSECs) durch Verwendung der Kombination CD31 und CD45. Sie diskutierten, dass LSECs autofluoreszente Eigenschaften besäßen. Dieses ist konform zu unseren Ergebnissen bezüglich der Darstellung von Leber- sowie Milzendothelzellen. In sämtlichen anderen Organen erzielten wir eine gute Abgrenzung endothelialer Zellen durch die Kombination von CD31 mit CD45.

Das Antigen CD31 ist als panendothelialer Marker beschrieben und als solcher weit akzeptiert (Bsp.: Hewett und Murray, 1993; Scholz und Schaper, 1997). Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1, CD31) gilt als konstitutiv auf adulten wie auch auf embryonalen Endothelzellen ubiquitär exprimierter Marker, der auch schwach auf Leukozyten und Thrombozyten exprimiert ist (Parums et al., 1990;

5. Diskussion

Hewett und Murray, 1993; Vecchi et al., 1994; DeLisser et al., 1994; Watt et al., 1995; Suri et al., 1996; Vanzulli et al., 1997; Newman, 1999). Dabei findet sich CD31 auf Endothelien etwa zehnmal stärker exprimiert (Dong et al., 1997). Die leukozytäre CD31 Expression machte es erforderlich einen weiteren Differenzierungsmarker zur durchflusszytometrischen Untersuchung von Endothelzellen zu verwenden. Dies ist CD45. Es ist bekannt, dass sämtliche leukozytären Zellen das Antigen CD45 exprimieren (Ledbetter und Herzenberg, 1979; Thomas, 1989; Johnson et al., 1997; Lagasse et al., 2000). Daher ist als Minimalanforderung für die Zuordnung von endothelialen Zellen mittels Durchflusszytometrie die Kombination von PI (Ausschluss toter Zellen), CD31 (als panendothelialer Marker) und CD45 (als panleukozytärer Marker) anzusehen. Zusätzlich fand ein weiterer Antikörper Verwendung, der spezifisch gegen ein als L-Sign bezeichnetes Antigen binden soll. Dieses ist als ein vorwiegend auf Mikrovaskularendothelzellen vorzufindendes Antigen beschrieben worden. Er soll an Maus-Endothelzellen, einschliesslich Lebersinusendothelzellen, glatte Muskelzellen und Basalmembranen binden (Harder et al., 1991; Katz et al., 2004). Der LSEC-Antikörper konnte die Charakterisierung der (CD31+, CD45-, PI-) Population als endothelial stützen.

5.2.3. LSEC-Expressionsmuster

Endothelzellen von Herz- und Lungengewebe exprimieren LSEC-Antigen nahezu einheitlich, wohingegen das LSEC-Expressionsmuster der Niere am uneinheitlichsten erscheint. In Milz-, Leber- und Lymphknotengewebe fanden sich Endothelzellen, die das LSEC-Antigen in höherem Ausmass exprimierten. Während man für Lymphknotengewebe aussagen kann, dass sich unter der Endothelzellgesamtpopulation wenigstens ein Typus befindet, der das LSEC-Antigen deutlich exprimiert und zugleich ein Endotheltypus dort vorzufinden ist der das LSEC-Antigen nicht, oder zumindest nur minimalst exprimiert, können wir diese Aussage über Endothelzellen des Milz-, und Lebergewebes nicht machen. Ob diese deutlich LSEC-positiven Endothelzellpopulationen dieser drei Gewebe im Zusammenhang mit möglichen immunologischen Funktionen gesehen werden können - LN-, und Milzgewebe zählen bekanntlich zu den sekundär-lymphatischen Organen - bleibt aufzuklären.

5.2.4. Argumente gegen eine thrombozytäre Zuordnung

Es ist bekannt, dass CD31 nicht nur auf Endothelzellen und auf einem beträchtlichen Anteil leukozytärer Zellen vorkommt, sondern auch auf Thrombozyten zu finden ist (s.o.). Daher könnte man in Frage stellen, ob es sich bei der (CD31+, CD45-, PI-) Population nicht eventuell um Thrombozyten anstatt von Zellen endothelialer Herkunft

handelt. Um diesen Verdacht auszusräumen möchte ich im Folgenden Argumente benennen, die diese These widerlegen sollen:

- Durch eine zusätzliche Färbung dieser (CD31+, CD45-, PI-) Population mit anti LSEC-Antikörper konnten diese als positiv auch für dieses Antigen identifiziert werden.
- Mikroskopische Untersuchungen sortierter Zellen dieser Antigencharakteristik aus Herz-, Lungen- und Lymphknotengewebe zeigten, dass diese Zellen abgerundet, klein und mit wenig Zytoplasma versehen waren, nicht zuletzt besaßen sie einen Kern. Thrombozyten demgegenüber sind kernlos und weisen in der Regel auch keine rundliche Form auf, vor allem nach den vorhergegangenen Präparationen.
- Die (CD31+, CD45-, PI-) Zellpopulationen unterschieden sich von einem Organsystem zum Nächsten geringfügig. So waren Zellen aus Herzverdaus geringfügig kleiner als etwa solche aus dem Lungengewebe. Und auch Zellen dieser Charakteristik aus Gehirnpräparationen waren grösser als die anderer untersuchten Organe.
- Thrombozyten haben zudem einen recht geringen Anteil in Bezug zu den Gesamtblutzellen.
- Zudem ist davon auszugehen, dass bei Organverdaus, selbst wenn Organe zuvor nicht perfundiert worden sind, Thrombozyten zerstört oder aber letztlich aufgrund ihrer hohen Aggregationspotenz bei nachfolgenden Filtrationsprozessen eliminiert würden.

Neben einer unterschiedlichen Expression für LSEC-Antigen (eine „Zweigipfligkeit“ fand sich in Milz- Leber- und Lymphknotengewebe) und einer ebensolchen für mCD155, fand sich ebenfalls ein organabhängiges Expressionsmuster für mCD112 auf Zellen dieser Charakteristik. Handelte es sich bei der (CD31+, CD45-, PI-) Zellpopulation tatsächlich um Thrombozyten, so müsste man doch von einem einheitlichen Expressionsmuster für LSEC (Thrombozyten sind nicht als LSEC+ beschrieben worden), mCD155 und mNectin-2 ausgehen. Darüber hinaus wäre eine einheitliche, vom Organsystem unabhängige Übereinstimmung in Bezug auf die physikalischen Eigenschaften dieser Zellen zu erwarten.

5.2.5. Schlussfolgerungen

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann man postulieren, dass es sich bei Zellen mit der Charakteristik (CD31+, CD45-, PI-), tatsächlich um Endothelzellen handelt.

5. Diskussion

Somit können wir zeigen, dass mit dieser minimalistischen Färbestrategie eine Abgrenzung endothelialer Zellen verschiedenster Gewebe im FACS gelingt. Die Zellmarkierungskombination aus PI, CD31FITC und CD45PE ist somit eine schnelle, einfache und zuverlässige Methode, um endotheliale Zellen aus verschiedenen murinen Gewebsaufschlüssen in einem 4-fach-Fluoreszenzgerät wie dem FACS-Calibur darzustellen. Einschränkend muss man anmerken, dass nicht bekannt ist welcher Anteil endothelialen Gewebes sich bei Organpräparationen wie sie in dieser Arbeit beschrieben werden, tatsächlich gewinnen lässt. So konnten wir (CD31+, CD45, PI-) einheitliche Zellpopulationen aus Zellsuspensionen verschiedener Organe identifizieren, die im Mittel aus kleineren Zellen bestanden als etwa Lymphozyten. Diese Feststellung stimmt mit den Ergebnissen von Favre et al. (2003) überein. Diese Gruppe beschrieb detailliert, dass die von Ihnen identifizierten Lungenendothelzellen im Mittel aus Zellen kleinerer Grösse bestanden als CD18+ Leukozyten. Dabei fanden wir von Organtyp zu Organtyp geringfügige Grössenvarianzen dieser (CD31+, CD45-, PI-) Zellen. Die mittlere Zellgrösse endothelialer Zellen des Hirngewebes war grösser als in den übrigen untersuchten Organen. Dieses ist zumindest für humane Endothelzellen des Hirngewebes beschrieben worden (Thorin et al., 1997). In diesem Zusammenhang kann man sicherlich auch die Beobachtung der im Mittel grösseren Lebersinusendothelzellen sehen, die sich mit einem andersartigen Präparationsprotokoll (Arbeitsgruppe um Prof. Knolle, Heidelberg) gewinnen liessen. Do et al. (1999) gaben die Zellgrösse von LSECs mit 8-10µm an. Man muss aber vorsichtshalber zudem davon ausgehen, dass die in FACS-Analysen untersuchten endothelialen Zellen im besten Fall einen Querschnitt der diversen Endotheltypen eines jeweiligen Organsystems repräsentieren. Doch ist es nicht auszuschliessen, dass stets ein besonderer Endotheltyp aus den jeweiligen untersuchten Organen herauspräpariert werden konnte, sei es da die Enzymlösung zu schwach war um den Grossteil endothelialer Zellen abzulösen, oder aber sei es dass zumindest ein Teil der zu präparierenden endothelialen Zellen bei den Präparationsprozessen zerstört worden sind.

5.3. Zellsortierungen und Zellkultivierungen

Eine Reihe von Autoren beschrieben, dass sich durch Aortenexplantate brauchbare Endothelzellkulturen gewinnen liessen (Shi et al., 2000; Masson et al., 2002; Hatley et al., 2003; auch Kobayashi et al., 2005). Dieses bezweifeln wir mittlerweile. Zellkulturen, die wir aus Aortenexplantaten gewinnen konnten, waren deutlich vitaler als solche aus Organverdaus. Doch eine CD31-Expression liess sich nur auf einem Bruchteil dieser Zellen nachweisen. Dafür kann auch eine Herunterregulation dieses

Markers diskutiert werden (Thum et al., 2000), doch wäre somit die Nachweisführung eines endothelialen Charakters dieser Zellen deutlich erschwert.

Auch ist denkbar, dass Fibroblasten oder auch Muskelzellen anteilig stärker zunehmen als endotheliale Zellen. Frid et al. berichteten 2002 gar von einer Potenz endothelialer Zellen zur Transdifferenzierung in glatte Muskelzellen.

So müsste man eine Vielzahl verschiedener Endothelmarker einsetzen, wie etwa Von-Willebrand-Faktor, VE-Cadherin, oder evtl. auch anti LSEC-Antikörper. Zelltypcharakterisierungen mittels Dil-Ac-LDL (u.a. Biomedical Technologies) hingegen, wie sie in der Literatur zu finden sind, erscheinen uns fragwürdig, da eine hohe Unspezifität anzunehmen ist. Denn man weist dadurch lediglich eine Endozytosefähigkeit für markierte LDL-Partikel nach und eine solche Eigenschaft ist für verschiedenste Zelltypen anzunehmen.

Eine hochreine Endothelzellkultur unter alleiniger Verwendung von MACS-Separationsvorgängen erscheint demgegenüber durchaus möglich (u.a. Gerritsen et al., 1995; Dong et al., 1997; Izawa et al., 1999; Bowden et al., 2000; Lim et al., 2003; Hida et al., 2004), doch ist diese Variante überaus ineffizient. Die Ineffektivität zum Gewinn von möglichst reinen Endothelzellkulturen aus murinem Gewebe zeigt sich unter anderem an der hohen Tierzahl (Bsp.: n=40), die von Autoren eingesetzt wurden (Izawa et al., 1999). So kann man spekulieren, dass Verdauprozesse einen besonders kritischen Bestandteil bei Zellisolierungen darstellen. Sortierte Zellen aus Organverdaus waren in Kultur nicht länger als etwa eine Woche überlebensfähig.

5.4. Endotheliale Expression von mCD112 und mCD155

Nectin-1-3 sind auf den verschiedensten Zelltypen zu finden (Takai, 2003). Nectin-2, wie auch der PVR, finden sich in vielen verschiedenen normalen Geweben schwach exprimiert, darunter in neuronalem, epithelialem und endothelialem Gewebe sowie auf Fibroblasten (Campadelli – Fiume, 2000).

Murines CD155 und mNectin-2 konnten wir auf Endothelzellen verschiedener Gewebe als schwach exprimiert nachweisen. Bemerkenswert dabei ist die Heterogenität der Expressionsmuster dieser Moleküle. So fand sich auf einem Teil endothelialer Zellen des Gehirngewebes mCD155 deutlich stärker exprimiert. Ob hier eine Beziehung zur Blut-Hirn-Schranke besteht, bleibt abzuklären. Einer Rolle bei der Bildung von Zell-Zell Verbindungen im Bereich der Adherens Junctions (AJs) wird für CD155 vermutet (Takai, 2003). CD155 soll dabei zur Neuformierung der AJs beitragen. Der Expressionsnachweis für mCD112 war mit Ausnahme des Nieren- und eventuell des Lymphknotengewebes stets schwächer ausgeprägt als der für mCD155. Ob dieser

Sachverhalt in Bezug zur Antikörperaffinität des anti mCD112 Antikörpers („6B3“) zu sehen ist, bleibt zu klären. Die Spezifität für mCD155 konnten wir darüber hinaus durch Untersuchung von mCD155 Knock-out Tieren bestätigen.

5.5. Endotheliale Expression von mCD112 und mCD155 unter LPS

Die systemische Anwendung subletaler Dosen von Lipopolysacchariden (LPS), ein Bestandteil der Aussenhülle sämtlicher gramnegativer Bakterien, bewirkt auch bei Mäusen ein Systemisch Inflammatorisches Antwortsyndrom (SIRS) samt akut entzündlicher Lungenschädigung (ALI) (Beutler und Cerami, 1988; Brigham und Meyrick, 1986; Rojas et al., 2004).

Wenngleich dieses experimentelle Design zur Untersuchung der Abläufe während eines septischen Geschehens des menschlichen Organismus oft herangezogen wird, sind doch die Unterschiede zu beachten. Zum einen werden unverhältnismässig hohe LPS-Dosierungen eingesetzt, die das Niveau während einer Sepsis des Menschen deutlich übersteigen. Nicht zuletzt deshalb kann man differente Gewebsantworten im Maussystem erwarten. Ein Entzündungsmodell durch i.p. LPS-Injektion stellt somit, obwohl diese in einen Gesamtorganismus erfolgt, lediglich eine Annäherung an humane pathophysiologische Prozesse aufgrund einer Sepsis dar.

LPS bedingt darunter direkt diverse Endothelantworten: Die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL6 (Grau et al., 1996; Jirik et al., 1989), IL8 (Anrather et al., 1997; Grau et al., 1996; Zhao et al., 2001), und IL1beta (Dinarello, 1997; Libby et al., 1986), die erhöhte Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen wie etwa E-Selectin, Interzellulärem Adhäsions-Molekül (ICAM)-1, und dem Vaskulären Zell Adhäsionsmolekül (VCAM)-1 (Chen et al., 1995; Engelberts et al., 1992; Grau et al., 1996; Jersmann et al., 2001).

So reagieren endotheliale Selectine in vitro wie in vivo auf LPS-Stimulationen und zeigen sich bereits 3-5h nach LPS-Applikation deutlich stärker exprimiert (Eppihimer et al., 1996). Bedeutende Funktionen bei der Leukozytentransmigration konnten diesen Molekülen ebenfalls zugeschrieben werden (Eppihimer et al., 1996). Und auch endotheliale CAMs sprechen recht frühzeitig auf proinflammatorische Reize wie eine systemische LPS-Applikation an (u.a. Fries et al., 1993).

Da endotheliale Selectine und auch endotheliale CAMs bereits nach einer kurzen Zeit von 3-6h p.i. von LPS als deutlich stärker exprimiert beschrieben wurden, wählten auch wir zunächst eine vergleichbare Stimulationszeit.

Wie wir zeigen konnten, ist es unter i.p. LPS-Applikation in BALB/c bereits nach einer Wirkungsdauer von 5-6 Stunden zu einer signifikanten Zunahme leukozytärer Zellen (putativer Neutrophiler Granulozyten) im Lungengewebe gekommen. Wie wir dabei jedoch auch gleichzeitig feststellen konnten, kam es während dieses Zeitraumes noch zu keiner deutlichen Expressionszunahme des mCD155 auf Lungenendothelzellen. Auch im Mittel unterschieden sich die Werte beider Vergleichsgruppen nahezu nicht. Da dieser Versuch nur einmal durchgeführt worden ist, sollte man diese Daten natürlich entsprechend vorsichtig handhaben.

Dann erhöhten wir die Wirkungszeit von 5-6h auf etwa 15h (nicht zuletzt auch aus Gründen der praktischeren Handhabung). In vitro zeigte sich bei 15h LPS-stimulierten Einzelzellsuspensionen aus einem Lungenverdau eine signifikant höhere mCD155 und auch mCD112 Expression auf Lungenendothelzellen. Es handelt sich hierbei jedoch um einen einzelnen Versuch und die untersuchten Zellzahlen waren gering, weswegen dieses Experiment sicherheitshalber lediglich als Hinweis auf eine mögliche endotheliale Expressionssteigerung von mCD112 und mCD155 zu interpretieren ist.

Aus Gründen der Verfügbarkeit führten wir hier eine LPS-Stimulation in C57/bl6 Mäusen durch. Die Stimulationszeit dehnten wir dabei auf etwa 17h aus. Sowohl für LN-Gewebe als auch für Lungengewebe konnten wir keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Mittelwerte der MFIQs beider Vergleichsgruppen feststellen. Jedoch veranlasste uns der erhöhte Mittelwert des MFIQs für mCD155 auf LPS-stimulierten Lungenendothelzellen zu weiteren Versuchen dieses Typs.

Wie bereits nach einer Stimulationszeit von 5-6h konnten wir auch noch nach 15-17h einen signifikanten Anstieg leukozytärer Zellen (vorwiegend bedingt durch putative Neutrophile Granulozyten) im Lungengewebe von +LPS-Tieren feststellen.

Zu den putativen Neutrophilen Granulozyten:

Die putativen polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) sind von uns als nichtlymphozytär identifiziert worden (nicht lymphozytäre Leukozyten) und stellen sich im Mittel grösser als Lymphozyten dar. Auch zeigen sich diese putativen PMNs als recht homogene Population im FSC-SSC Diagramm. Alternativ wären Makrophagen zu vermuten, doch erscheint dies eher unwahrscheinlich, da nicht zuletzt der Neutrophilenanteil unter den Gesamtleukozyten im Blut etwa 10-mal höher ist als der der Monozyten. Auch konnten Li et al. zeigen, dass der Anteil an PMNs im Lungengewebe nach 18h LPS-Stimulation bedeutsamer zunahm als der der

5. Diskussion

Monozyten/ Makrophagen. Trotzdem ist es wahrscheinlich, dass ab 8-12h Makrophagen zusätzlich rekrutiert werden. (Li et al., 1998; Zhou et al., 1998; Andonegui et al., 2003).

In zwei voneinander unabhängigen und vergleichbaren Versuchen mit längerer Stimulationszeit (15-17h) verglichen wir nun die Expression von mCD112, mCD155 und in nur einem dieser Versuche zusätzlich LSEC-Antigen auf Lungenendothel und nicht zuletzt aus Gründen der vereinfachten Präparation diesmal zusätzlich auf Herzendothel.

Dabei konnten wir für jeden dieser beiden Versuche getrennt einen signifikanten mCD155 Expressionszuwachs auf Herzendothelien feststellen. Durch das Kombinieren der Daten beider Versuche mit einer Anzahl von letztlich vier +LPS-Tieren zu insgesamt sieben Kontrolltieren, fanden wir auch für Lungenendothelzellen einen signifikanten Expressionsanstieg für mCD155. Die Mittelwerte für mCD112 lagen bei LPS-stimulierten Tieren sowohl auf Herz-, als auch auf Lungenendothelzellen nur geringfügig höher. Für LSEC-Antigen fand sich lediglich auf Lungenendothelzellen eine etwa 24-prozentige Zunahme der Mittelwerte, nicht jedoch für Herzendothelzellen. Hier erscheint eine Wiederholung eines solchen Versuchstyps zur zusätzlichen Untersuchung auf das Verhalten der LSEC-Antigen Expression unter LPS-Einfluss besonders sinnvoll. Die von uns durch diese LPS-Experimente erhobenen Daten bezüglich der mCD112, mCD155 und LSEC-Antigen Expression auf Endothelzellen finden sich in der Literatur bislang noch nicht beschrieben und über deren Funktion lässt sich hier nur spekulieren.

Das Messen eines leukozytären Zuwachses im Lungengewebe LPS-stimulierter Mäuse nach bereits 5-6h, zusammen mit der Feststellung einer bis zu diesem Zeitpunkt scheinbar nahezu unmerklichen Expressionssteigerung von mCD155 gibt Anlass zur Spekulation, dass mCD155 bei akuten Entzündungsreaktionen von geringerer Bedeutung sein könnte, um einen vermehrten Einstrom von Neutrophilen Granulozyten zu erlauben. Allerdings könnte für diesen Prozess die bereits im nicht-entzündeten Zustand vorhandene Menge an mCD155 auf den Endothelien ausreichend sein. Zudem ist bekannt, dass durch Entzündungsprozesse auch andere für den Gesamtprozess der Transmigration essentielle Moleküle (wie etwa die Adhäsionsmoleküle: ICAM-1, VCAM-1) auf Endothelien hochreguliert werden (vgl. 5.5. oben).

Die ermittelte Expressionssteigerung von mCD155 nach einer Wirkungszeit von etwa 15-17h auf Herz- und Lungenendothelzellen LPS-stimulierter Mäuse könnte nahelegen, dass eventuell eine Interaktion zwischen Endothel und Makrophagen gestützt werden soll. Auch könnte man spekulieren, ob die mCD155 Expressionssteigerung zumindest für untersuchtes Herz- und Lungenendothel Ausdruck einer sich erneut ausbildenden Abdichtung des Parazellulären Raumes darstellt, wenn man die Spekulationen von Takai et al. (2003) betreffend der Funktionen von CD155 zugrunde legt.

Man weiss, dass Nectine JAM-A während der Bildung der TJs steuern (Takai, 2003; Fukuhara, 2002a, b). Und JAM-A findet sich bei Endothelaktivierung am apikalen Zellpol konzentriert (Ozaki, 1999). Es trägt zudem zur LFA1 abhängigen Leukozytenrekrutierung bei (Ostermann, 2002).

Möglicherweise könnte sich darüber hinaus auch für mNectin-3 ein LPS-abhängiger Effekt im ähnlichen Ausmass wie für mCD155 zeigen, wenn man dessen Interaktionsfähigkeit mit mCD155 zugrunde legt. CD155 soll Nectin-3 zu Zell-Zell Kontaktarealen rekrutieren (Ikeda, 2003; Mueller, 2003). Eine weitere Möglichkeit der Funktion einer erhöhten endothelialen Expression von mCD155 könnte durchaus auch in Bezug auf eine Unterstützung der reversen transendothelialen Leukozytenmigration gesehen werden, gemeint ist der Abtransport der im Parenchym zumindest im Lungengewebe befindlichen Leukozyten über Blutgefässe.

Solch ein in vivo Modell bietet den Vorteil einer relativ naturgetreuen Entzündungsstimulierung, bei der Entzündungszellen, das Komplementsystem und auch Endothelzellen neben weiteren Faktoren miteinander in Wechselwirkung treten können. Im Gegensatz zu in vitro Modellen, in denen die natürlichen Beziehungen einzelner Komponenten eines Gesamtorganismus abstrahiert und schematisiert werden. Dieses gilt auch für das im Folgenden diskutierte Modell zur Kurzzeittransmigration mittels Adoptiver Lymphozytentransfers.

5.6. Adoptive Lymphozytentransfers

Man könnte sich fragen, ob die Vermutung einer Teilfunktion des mCD155 Moleküls für Prozesse der transendothelialen Migration überhaupt gerechtfertigt ist.

Zum einen muss man zwischen Maus und Mensch unterscheiden, nicht zuletzt aufgrund der Übereinstimmung von CD155 mit Tage4 (mCD155) von nur etwa 45% auf der Ebene der Aminosäuresequenz, kann man Differenzen diskutieren.

Zum anderen sollte man zwischen abstrahierten in vitro Versuchen und solchen, die im hochkomplexen lebenden Organismus durchgeführt werden, differenzieren. Auf

5. Diskussion

beiden dieser Vergleichsebenen können sich durchaus diverse deutliche Unterschiede finden.

Zudem muss man sich fragen, ob Interaktionen von Monozyten oder auch NK-Zellen mit endothelialen-, CD155-exprimierenden Zellen zu dem Schluss führen können, dass auch Lymphozyten diesen Mechanismus benutzen. Der von uns vermutete Interaktionspartner von endotheliale mCD112 und mCD155 ist das DNAM-1 der Lymphozyten, neben weiteren noch unbekannten lymphozytären Oberflächenrezeptoren. Dabei ist wie bereits erwähnt sowohl endothelial-, als auch lymphozytär-exprimiertes mCD155 für mögliche Interaktionsprozesse während transendothelialen Migrationsvorgängen von Interesse (vgl. Reymond et al., 2004). In dieser Arbeit legten wir den Schwerpunkt auf den endothelialen Expressionsort von mCD112 und mCD155.

Auch die von uns gegen mCD155 gerichteten Antikörper binden lediglich gegen die C-Domänen von mCD155. Hingegen ist beschrieben, dass viele Zell-Zell Interaktionen über die äusserste Domäne von CD155 bewirkt werden. Für Interaktionen von Nectin-1 mit Nectin-3 und Nectin-1 mit Nectin-4 zeigen die V-V Interaktionen eine prädominante Rolle (Reymond, 2001; Fabre, 2002). Demgegenüber konnten Reymond et al. allerdings auch zeigen, dass sowohl die V-, als auch die C-Domäne für die Interaktion von CD155 mit DNAM-1 von Bedeutung ist (Reymond et al., 2004). Auch darin kann man die Ursache für einen fehlenden, oder womöglich nur minimalen Effekt auf transendotheliale Migrationsprozesse von murinen Lymphozyten sehen. Jedoch muss hier angemerkt werden, dass sich auch bei mCD155 KO-Tieren als Empfänger kein bemerkenswerter Effekt in Bezug auf das Homingverhalten transferierter naiver WT-Lymphozyten feststellen liess.

Die kurze Transferzeit wählten wir u.a. aufgrund der Erkenntnis, dass naive Lymphozyten durchschnittlich etwa nur 30 Minuten in der Blutbahn verbringen, bevor diese erneut in ein sekundär-lymphatisches Gewebe eintreten (Pabst, 1988) und auch in Anlehnung an Publikationen wie etwa die von Faveeuw et al. (2001).

Interessant bleibt die Beobachtung eines im Mittel minimal erhöhten B220+ Zellanteils und eines gleichzeitig geringfügig verminderten T-Zellanteils im Milzgewebe von mCD155 Knock-outs. Dies betraf sowohl die residenten-, als auch die CFSE+ transferierten Zellen. Bemerkenswert dabei ist die Beobachtung, dass sich auch bei Tieren, die mit anti mCD155 Antikörpern behandelt worden sind, ein entsprechender

geringfügig höherer B220+ Zellanteil und zugleich ein geringfügig verminderter T-Zellanteil im Milzgewebe zeigte. Eine weitere Diskussion etwaiger tendenzieller Zellpopulationsverschiebungen erscheint bis dato wenig sinnvoll, da dies viel zu spekulativ wäre.

Letztlich bleibt es ungeklärt, ob mCD155 transendotheliale Migrationsprozesse von Lymphozyten beeinflusst. Dies müssten weitere Experimente zeigen. Jedoch kann man aussagen, dass ein eventueller Beitrag von mCD155 bei solchen Vorgängen von kleinem bis sehr kleinem Ausmass sein dürfte, denn wir fanden nahezu keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Vergleichsgruppen.

Dieses widerspricht auch nicht den Ergebnissen, die Reymond et al. für die Funktion von CD155 finden konnten. Denn beispielsweise handelt es sich bei unseren Experimenten um in vivo Bedingungen, um dabei die Interaktionen von Endothel und Lymphozyten via mCD155 zu untersuchen.

Da bekannt ist, dass mCD155 nicht nur auf Endothelzellen, wie wir in dieser Arbeit zeigen konnten, sondern auch auf nahezu sämtlichen Leukozyten exprimiert ist, könnte man sich fragen, warum man nicht der Einfachheit halber die zu transferierenden Lymphozyten mit anti mCD155 Antikörpern beladen hat. Sehr wahrscheinlich hätten diese Komplementkaskaden in Empfängertieren aktiviert. Die einzig sichere Möglichkeit, um die Leukozyten–Endothelinteraktion über mCD155 in umgekehrter Version zu testen, wie wir es mit unseren bisherigen Transferexperimenten getan haben, wäre Lymphozyten aus mCD155KO Tieren zu isolieren, zu färben und normalen Wildtyptieren zu transferieren.

5.7. Ausblick

In Ergänzung zu den durchflusszytometrischen Untersuchungen könnte man mittels Immunfluoreszenzmikroskopie versuchen, Gehirndothelien zu lokalisieren, welche mCD155 in höherem Mass exprimieren. Möglicherweise liesse sich so eine Verbindung zur Blut-Hirn-Schranke herstellen. Auch die Resultate der LPS-Experimente könnten durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zusätzlich gestützt werden.

Insbesondere wäre es interessant kürzere Stimulationszeiten von 5-6h nochmals auf einen Effekt bezüglich der LPS-bedingten mCD112/ mCD155 Expressionszunahme auf endothelialen Zellen zu überprüfen.

Wenngleich bisherige Transferexperimente keinen deutlichen Unterschied bezüglich der Vergleichsgruppen liefern konnten, bietet sich doch gerade hier ein noch recht grosses Feld an Variationsmöglichkeiten. So könnte man die Zeit bis zum

5. Diskussion

Wiedergewinn transferierter Zellen von 2h auf etwa 24h erhöhen. Zudem wäre es nötig die Fallzahl deutlich zu steigern.

Um methodisch bedingte Schwankungen bezüglich der Anzahl transferierter Zellen zu minimieren und auch um den Einfluss von mCD155 bei transendothelialen Migrationsprozessen Neutrophiler Granulozyten zu untersuchen, könnte man sich der LPS-bedingten pulmonalen Leukozytenrekrutierung bedienen und diesen Tieren neben LPS zuvor lediglich anti mCD155 Antikörper verabreichen.

Es ist schwierig die Einzelbeiträge zur transendothelialen Migration leukozytärer Zellen in dem Orchester der Zell-Zell Adhäsionsmoleküle zu erfassen. Und nicht zuletzt bestimmen diese solche Prozesse nicht allein.

Zusammenfassung

Wir entwickelten eine durchflusszytometrische Methode, um murine Endothelzellen verschiedenster Organe auf Expressionen von Rezeptoren der Nectinmolekülfamilie untersuchen zu können. Murines Nectin-2 und mCD155 zeigten dabei heterogene Expressionsmuster auf Endothelzellen. Die Expressionsstärke von mCD112 sowie von mCD155 zwischen Herz- und Lungenendothelzellen unterscheidet sich dabei nicht. Wir konnten dagegen zeigen, dass einige Endothelzellen des Hirngewebes deutlich stärker mCD155 exprimieren, als dies für Endothelzellen aus Herz, Lunge, Niere, oder Lymphknoten der Fall ist.

Hochreine Sortierungen (97-99% Reinheit) endothelialer Zellen aus Lungen- sowie Lebergewebe gelangen zwar, doch liess sich keine Primärendothelzellkultur etablieren, mit der wir Transmigrationsexperimente hätten durchführen können.

Zur Klärung der Fragestellung, ob mCD155 eine Teilfunktion bei Prozessen der transendothelialen Migration hat, führten wir Adoptive Lymphozytentransfers als Modell einer Kurzzeittransmigration (2h) durch. Dies geschah sowohl mit mCD155 Knock-out Tieren als auch mit anti mCD155 Antikörper- behandelten Tieren als Empfänger der transferierten Lymphozytensuspensionen. In keinem dieser Versuche ergab sich ein signifikanter Nachweis einer möglichen Hemmung des transendothelialen Migrationsprozesses transferierter Lymphozyten in sekundär-lymphatisches Gewebe von Milz und Lymphknoten. Auch signifikante Anteilsverschiebungen transferierter Zellen liessen sich nicht finden. Doch bieten Beobachtungen eines im Mittel gering vermehrten Anteils von CD4⁺ T-Zellen und B-220⁺ Zellen im Milzgewebe und eines im Mittel gering verminderten Anteils von CD8 β ⁺ T-Zellen im Milzgewebe mCD155-defizienter Tiere Anlass zu weiteren Spekulationen.

Vielmehr konnten wir aber sowohl in vitro wie auch in vivo nachweisen, dass die mCD155-Expression auf Endothelzellen des Herz- wie auch des Lungengewebes signifikant zunahm, wenn die Versuchstiere bzw. die Einzelzellsuspensionen über etwa 15-17h LPS ausgesetzt wurden. Für mCD112 gelang dieses nicht, jedoch zeigte sich auch für dieses Nectin eine im Mittel erhöhte Expression auf LPS-behandelten Herz- sowie Lungenendothelzellen.

Abkürzungsverzeichnis

a./anti	gegen	in vitro	in artifizierter Umgebung durchgeführt
Ag	Antigen	in vivo	im lebenden Gesamtorganismus
AG	Arbeitsgruppe	Isotypkontr.	Isotypkontrolle
AJ	adherens junction	J	Journal
ALI	acute lung injury	JAM	junctional adhesion molecule
Ar.	armenisch(er)	k.A.	keine Angabe
AS	Aminosäure	ko	knock-out
bl	black	L	Ligand
bio	Biotin	LDL	low density lipoprotein
BSA	bovine serum albumine	LFA-1	leukozytäres funktionelles Antigen-1
Bsp.	Beispiel	LN	lymph node
bzw.	beziehungsweise	LPS	Lipopolysaccharid(e)
C	constant	LSEC	liver sinusoidal endothelial cell
CAM	cellular adhesion molecule	lymphat.	lymphatisch
CCL	CC chemokine ligand	m	murin
CCR	CC chemokine receptor	MACS	magnetic-activated cell sorting
CD	cluster of differentiation	mAk	monoklonaler Antikörper
CFSE	Carboxyfluorescein-diazetat-succinimidyl-ester	MFI	mean fluorescence intensity
CHO-K:	Zellen aus Ovarien chinesischer Hamster.	MFIQ	MFI-Quotient
cm	centimeter	mesent.	mesenterisch
CXCL	CXC chemokine ligand	mg	Milligramm
CXCR	CXC chemokine receptor	min	Minute
Cy5	Indodicarbocyanin 5	ml	Milliliter
d	Tag	mLN	mesenteric lymph node
dd	doppelt destilliert	mm	Millimeter
Dil-Ac	1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate acetylated	mM	Millimolar
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	mRNA	messenger ribonucleic acid
DNA	desoxyribonucleic acid	MV	mikrovaskular
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	necl	Nectin like
EGM	endothelial growth medium	ng	Nanogramm
endoth.	endothelial	NK	Natürliche Killer(zelle)
et al.	und andere	nm	Nanometer
FACS	fluorescence-activated cell sorting	p.i.	post injectionem
FCS	fetal calf serum	pAk	polyklonaler Antikörper
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	PBS	phosphate buffered saline
FL	Fluoreszenz	PDZ-Domäne:	Eine Proteininteraktionsdomäne, die spezifisch an C-terminale Peptide oder an andere PDZ-Domänen bindet.
FSC	forward scatter	PE	Phycoerythrin
g	gravity	PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt	PFA	Paraformaldehyd
GlyCAM	glycosylierungsabhängiges zelluläres Adhensions-Molekül	pg	Pikogramm
h	hour(s)/ hora	PI	Propidiumiodid
Ham.	Hamster	pLN	peripheral lymph nodes
HCL	Chlorwasserstoff	PMN	polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
HEV	Hoch Endotheliale Venule	pos. (+)	positiv
HLA	humanes leukozytäres Antigen	PRR	poliovirus related receptor
i.p.	intraperitoneal	PVR	Poliovirusrezeptor
i.v.	intravenös	Pyr.	Pyruvat
ICAM	intercellular adhesion molecule	R	Ratte
IFN	Interferon	RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
Ig	Immunglobulin	RT	Raumtemperatur
IL	Interleukin	s.	siehe

S.	Seite
s.c.	subkutan/ subcutaneus
s.o.	siehe oben
SA	Streptavidin
sek.	sekundär
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SSC	side scatter
TBS	tris buffered saline
TBST	tris buffered saline (+Tween)
TEM	Transendotheliale Migration
TJ	tight junction
TNF	Tumor Nekrose Faktor
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	variabel
VCAM	vascular cellular adhesion molecule
VF	Verdünnungsfaktor
vgl.	vergleiche
VLA	very late antigen
x	-fach
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zonula Occludens (Protein)

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

- Aird, W.C.. (2001). Vascular bed-specific hemostasis. Role of endothelium in sepsis pathogenesis. *Crit Care Med*; 29: 28–35.
- Aird, W.C.. (2002). Endothelial cell dynamics and complexity theory. *Crit Care Med*; 30: 180–185.
- Aird, W.C.. (2003). Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med*; 31: 5221–5230.
- Albelda, S.M., Muller, W.A., Buck, C.A., Newman, P.J.. (1991). Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): A novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*; 114: 1059–1068.
- Alon, R., Kassner, P.D., Carr, M. W., Finger, E.B., Hemler, M.E. and Springer, T.A.. (1995). The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol*; 128: 1243–1253.
- Anderson, N.D., Anderson, A.O. and Wyllie, R.G.. (1976). Specialized structure and metabolic activities of high endothelial venules in rat lymphatic tissues. *Immun*; 31: 455–473.
- Anderson, A.O. & Anderson, N.D.. (1976). Lymphocyte emigration from high endothelial venules in rat lymph nodes. *Immun*; 31: 731–748.
- Anderson, A.O. and Shaw, S.. (1993). T cell adhesion to endothelium, the FRC conduit system and other anatomic and molecular features which facilitate the adhesion cascade in lymph node. *Sem Immun*; 5: 271–282.
- Anderson, J.M., Balda, M.S. and Fanning, A.S.. (1993). The structure and regulation of tight junctions. *Curr Opin Cell Biol*; 5: 772–778.
- Andonegui, G., Bonder, C.S., Green, F., Mullaly, S.C., Zbytnuik, L., Raharjo, E. and Kubes, P.. (2003). Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest*; 111: 1011–1020.
- Anrather, J., Csizmadia, V., Brostjan, C., Soares, M.P., Bach, F.H. and Winkler, H.. (1997). Inhibition of bovine endothelial cell activation in vitro by regulated expression of a transdominant inhibitor of NF- κ B. *J Clin Invest*; 99: 763–772.
- Aoki, J., Koike, S., Asou, H., Ise, I., Suwa, H., Tanaka, T., Miyasaka, M., Nomoto, A.. (1997). Mouse homolog of poliovirus receptor-related gene 2 product, mPRR2, mediates homophilic cell aggregation. *Exp Cell Res*; 235: 374–384.
- Aurand-Lions, M.C., Johnson-Leger, C., Wong, L., Du Pasquier, L. and Imhof, B.A.. (2001). Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood*; 98: 3699–3707.
- Ayalon, O., Sabanai, H., Lampugnani, M.G., Dejana, E. and Geiger, B.. (1994). Spatial and temporal relationships between cadherins and PECAM-1 in cell-cell junctions of human endothelial cells. *J Cell Biol*; 126: 247–258.
- Bailey, A.S., Jiang, S., Afentoulis, M., Baumann, C.I., Schroeder, D.A., Olson, S.B., Wong, M.H. and Fleming, W.H.. (2004). Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood*; 103: 13–19.
- Bargatze, R.F. and Butcher, E.C.. (1993). Rapid G protein-regulated activation event involved in lymphocyte binding to high endothelial Venues. *J Exp Med*; 178: 367–372.
- Baumhueter, S., Singer, M.S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S.D. and Lasky, L.A.. (1993). Binding of L-selectin to the vascular sialomucin, CD34. *Science*; 262: 436–436.
- Baury, B., Geraghty, R.J., Masson, D., Lustenberger, P., Spear, P.G. and Denis, M.G.. (2001). Organization of the rat Tage4 gene and herpesvirus entry activity of the encoded protein. *Gene*; 265: 185–194.
- Bazzoni, G., Dejana, E. and Lampugnani, M.G.. (1999). Endothelial adhesion molecules in the development of vascular tree: the garden of forking paths. *Curr Opin Cell Biol*; 11: 573–581.
- Bazzoni, G., Dejana, E.. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: Molecular organization and role in vascular homeostasis. *Phys Rev*; 84: 869–901.
- Belloni, P.N., Nicolson, G.L.. (1988). Differential expression of cell surface glycoproteins on various organ-derived microvascular endothelia and endothelial cell cultures. *J Cell Physiol*; 136: 398–410.
- Bennet, H.S., Luft, J.H. and Hampton, J.C.. (1959). Morphological classification of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol*; 196: 381–390.
- Berg, E.L., Robinson, M.K., Warnock, R.A. and Butcher, E.C.. (1991). The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor. *J Cell Biol*; 114: 343–349.
- Berg, E.L., McEvoy, L.M., Berlin, C., Bargatze, R.F. and Butcher, E.C.. (1993). L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature*; 366: 695–696.
- Beutler, B. and A. Cerami.. (1988). Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: A common mediator. *Annu Rev Biochem*; 57: 505–518.
- Beyer, E.C.. (1993). Gap junctions. *Int Rev Cytol*; 137: 1–37.
- Biederer, T., Sara, Y., Mozhayeva, M., Atasoy, D., Liu, X., Kavalali, E.T., Sudhof, T.C.. (2002). SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science*; 297: 1525–1531.
- Bjerknes, M., Cheng, H. and Ottaway, C.A.. (1986). Dynamics of lymphocyte-endothelial interactions in vivo. *Science*; 231: 402–405.
- Bogen, S., Pak, J., Garifallou, M., Deng, X. and Muller, W.A.. (1994). Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med*; 179: 1059–1064.
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N. et al.. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*; 198: 557–567.
- Bowden, R.A., Entman, M.L., Smith, C.W., Burns, A.R.. (2000). Neutrophil transendothelial migration on cultured murine endothelial cells. *FASEB J*; 14: A704.
- Bowman, P.D., du Bois, M., Shivers, R.R. and Dorovini-Zis, K.. (1991). Endothelial tight junctions. In *Tight Junctions* (ed. M. Cereijido): 305–320.
- Brigham, K. L. and Meyrick, B.. (1986). Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis*; 133: 913–927.
- Briskin, M., Winsor-Hines, D., Shyjan, A., et al.. (1997). Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol*; 151: 97–110.

- Burns, A.R., Walker, D.C., Brown, E.S., Thurmon, L.T., Bowden, R. A., Keese, C. R., Simon, S.I., Entman, M.L. and Smith, C.W.. (1997). Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J Immun*; 159: 2893-2903.
- Butcher, E.C., Picker, L.J.. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*; 272: 60-66.
- Butcher, E.C., et al.. (1999). Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immun*; 72: 209-253.
- Cahill, R.N.P., Frost, H. and Trnka, Z.. (1976). The effects of antigen on the migration of recirculating lymphocytes through single lymph nodes. *J Exp Med*; 143: 870-888.
- Campadelli-Fiume, G., Cocchi, F., Menotti, L. and Lopez, M.. (2000). The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev Med Virol*; 10: 305-319.
- Campbell, J.J. et al.. (1998). Chemokines and the arrest of Lymphocyte rolling under flow conditions. *Science*; 279: 381-384.
- Carlos, T.M., Harlan, J.M.. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*; 84: 2068-2101.
- Carman, C.V. and Springer, T.A.. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol*; 167: 377-388.
- Cella, M. et al.. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type 1 interferon. *Nature Med*; 5: 919 - 923.
- Chadeneau, C., LeMoullac, B., Denis, M.G.. (1994). A novel member of the immunoglobulin gene superfamily expressed in rat carcinoma cell lines. *J Biol Chem*; 269: 15601-15605.
- Chadeneau, C., LeCabellec, M., LeMoullac, B., Meflah, K., Denis, M.G.. (1996). Over-expression of a novel member of the immunoglobulin superfamily in Min mouse intestinal adenomas. *Int J Cancer*; 68: 817-821.
- Chen, C.C., Rosenbloom, C.L., Anderson, D.C. and Manning, A.M.. (1995). Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I κ B- α phosphorylation. *J Immun*; 155: 3538-3545.
- Cinamon, G., Shinder, V. and Alon, R.. (2001). Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nature Immun*; 2: 515-522.
- Cyster, J.G.. (1999). Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*; 286: 2098-2102.
- De Lisser, H.M., Newman, P.J. and Albelda, S.M.. (1994). Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immun Today*; 15: 490-495.
- Dejana, E., Corada, M. and Lampugnani, M.G.. (1995). Endothelial cell-to cell junctions. *FASEB J*; 9: 910-918.
- Dejana, E., Bazzoni, G. and Lampugnani, M.G.. (1999). Vascular endothelial (VE)-cadherin: Only an intercellular glue? *Exp Cell Res*; 252: 13-19.
- Del Maschio, A., De Luigi, A., Martin-Padura, I., Brockhaus, M., Bartfai, T., Fruscella, P., Adorini, L., Martino, G., Furlan, R., De Simoni, M.G. and Dejana, E.. (1999). Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J Exp Med*; 190: 1351-1356.
- Dewey, Jr., C.F., Bussolari, S.R., Gimbrone, M.A., et al.. (1981). The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng*; 103: 177-185.
- Dinarello, C.A.. (1997). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*; 112: 321-329.
- Do, H., Healey, J.F., Waller, E.K. and Lollar, P.. (1999). Expression of Factor VIII by Murine Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *J Biol Chem*; 274: 19587-19592.
- Dong, Q.G., Bernasconi, S., Lostaglio, S., De Calmanovici, R.W., Martin-Padura, I., Breviario, F., Garlanda, C., Ramponi, S., Mantovani, A., Vecchi, A.. (1997). A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues—characterization of two endothelial cell lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 17: 1599-1604.
- Doukas, J. and Pober, J.S.. (1990). IFN- γ enhances endothelial activation induced by tumor necrosis factor but not IL-1. *J Immun*; 145: 1727-1733.
- Drayson, M.T. and Ford, W.L.. (1984). Afferent lymph and lymph borne cells: their influence on lymph node function. *Immunobiol*; 168: 362-379.
- Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C.A. and Springer, T.A.. (1986). Induction by IL 1 and interferon- γ : Tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immun*; 137: 245-254.
- Dustin, M.L. and Springer, T.A.. (1989). T cell receptor cross linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature*; 341: 619-624.
- Eberle, F., Dubreuil, P., Mattei, M.G., Devilard, E. and Lopez, M.. (1995). The human PRR2 gene, related to the human poliovirus receptor gene (PVR), is the true homolog of the murine MPH gene. *Gene*; 159: 267-272.
- Ebnet, K., Schulz, C.U., Meyer, Z.U., Brickwedde, M.-K., Pendl, G.G. and Vestweber, D.. (2000). Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem*; 275: 27979-27988.
- Engelberts, I., van Hoof, S.C., Samyo, S.K., Buurman, W.A. and van der Linden, C.J.. (1992). Generalized inflammation during peritonitis evidenced by intracutaneous E-selectin expression. *Clin Immun Immunopathol*; 65: 330-334.
- Eppihimer, M.J., Wolitzky, B., Anderson, D.C., Labow, M.A. and Granger, D.N.. (1996). Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *Circ Res*; 79: 560-569.
- Esser, S., Lampugnani, M.G., Corada, M., Dejana, E. and Risau, W.. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci*; 111: 1853-1865.
- Fabre, S., Reymond, N., Cocchi, F., Menotti, L., Dubreuil, P., Campadelli-Fiume, G. and Lopez, M.. (2002). Prominent role of the Ig-like V domain in trans-interactions of nectins. Nectin3 and nectin 4 bind to the predicted C-C'-C"-D beta-strands of the nectin1 V domain. *J Biol Chem*; 277: 27006-27013.
- Farquhar, M.G., Palade, G.E.. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*; 17: 375-412.

- Fatehi, M.I., Gerhart, D.Z., Myers, T.G., et al.. (1987). Characterization of the blood-brain barrier: Glycoconjugate receptors of 14 lectins in canine brain, cultured endothelial cells and blotted membrane proteins. *Brain Res*; 415: 30-39.
- Faveeuw, C., Preece, G. and Ager, A.. (2001). Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases. *Blood*; 98: 688-695.
- Favre, C.J., Mancuso, M., Maas, K., McLean, J.W., Baluk, P. and McDonald, D.M.. (2003). Expression of genes involved in vascular development and angiogenesis in endothelial cells of adult lung. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 285: 1917-1938.
- Feng, D., Nagy, J.A., Pyne, K., Dvorak, H.F. and Dvorak, A.M.. (1998). Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med*; 187: 903-915.
- Flaherty, J.T., Pierce, J.E., Ferrans, V.J., et al.. (1972). Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events. *Circ Res*; 30: 23-33.
- Fleming, S. and Jones, D.B.. (1989). Antigenic heterogeneity of renal endothelium. *J Pathol*; 158: 319-323.
- Ford, W.L., Simmonds, S.J. and Atkins, R.C.. (1975). Early cellular events in a systemic graft-vs-host reaction. II. Autoradiographic estimates of the frequency of donor lymphocytes which respond to each Ag-B-determined antigenic complex. *J Exp Med*; 141: 681-696.
- Freemont, A.J. and Jones, C.J.P.. (1983). Light microscopic, histochemical and ultrastructural studies of human lymph node paracortical venules. *J Anat*; 136: 349-382.
- Freemont, A.J.. (1986). Functional and biosynthetic changes in endothelial cells of vessels in chronically inflamed tissues: evidence for endothelial control of lymphocyte entry into diseased tissues. *J Pathol*; 155: 225-230.
- Freemont, A.J., Stoddart, R.W., Steven, F., Jones, C.J., Matthews, S.. (1986). The structure of the basement membrane of human lymph node high endothelial venules: An ultrastructural, histochemical and immunocytochemical study. *Histochem J*; 18: 421-428.
- Freistadt, M.S. and Eberle, K.E.. (1997). *Mol Immun*; 34: 1247-1257.
- Frid, M.G., Kale, V.A., Stenmark, K.R.. (2002). Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation. *Circ Res*; 90: 1189-1196.
- Fries, J.W., Williams, A.J., Atkins, R.C., Newman, W., Lipscomb, M.F. & Collins, T.. (1993). Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. *Am J Pathol*; 143: 725-737.
- Fuchs, A., Cella, M., Giurisato, E., Shaw, A.S. and Colonna, M.. (2004). Cutting Edge: CD96 (Tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immun*; 172: 3994-3998.
- Fukami, T., Satoh, H., Fujita, E., Maruyama, T., Fukuhara, H., Kuramochi, M., Takamoto, S., Momoi, T., Murakami, Y.. (2002). Identification of the *Tslc1* gene, a mouse orthologue of the human tumor suppressor *TSLC1* gene. *Gene*; 295: 7-12.
- Fukuda, Y., Nagura, H., Imoto, M. and Koyama, Y.. (1986). Immunohistochemical studies on structural changes of the hepatic lobules in liver diseases. *Am J Gastroenterol*; 81: 1149-1155.
- Fukuhara, H., Kuramochi, M., Nobukuni, T., Fukami, T., Saino, M., Maruyama, T., Nomura, S., Sekiya, T., Murakami, Y.. (2001). Isolation of the *TSL1* and *TSL2* genes, members of the tumor suppressor *TSLC1* gene family encoding transmembrane proteins. *Oncogene*; 20: 5401-5407.
- Fukuhara, A., Irie, K., Nakanishi, H., Takekuni, K., Kawakatsu, T., Ikeda, W., Yamada, A., Katata, T., Honda, T., Sato, T., Shimizu, K., Ozaki, H., Horiuchi, H., Kita, T., Takai, Y.. (2002a). Involvement of nectin in the localization of junctional adhesion molecule at tight junctions. *Oncogene*; 21: 7642-7655.
- Fukuhara, A., Irie, K., Yamada, A., Katata, T., Honda, T., Shimizu, K., Nakanishi, H., Takai, Y.. (2002b). Role of nectin in organization of tight junctions in epithelial cells. *Genes Cells*; 7: 1059-1072.
- Garlanda, C. and Dejana, E.. (1997). Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 17: 1193-1202.
- Geraghty, R.J., Krummenacher, C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J. and Spear, P.G.. (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science*; 280: 1618-1620.
- Gerritsen, M.E., Shen, C.P., McHugh, M.C., Atkinson, W.J., Kiely, J.M., Milstone, D.S., Lusinskas, F.W., Gimbrone, Jr., M.A.. (1995). Activation-dependent isolation and culture of murine pulmonary microvascular endothelium. *Microcirculation*; 2: 151-163.
- Gesner, B.M. and Gowans, J.L.. (1962). The output of lymphocytes from the thoracic duct of unanaesthetized mice. *Br J Exp Path*; 43: 424-430.
- Ginsberg, M.H., Du, X. and Plow, E.F.. (1992). Inside-out integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol*; 4: 766-771.
- Girard, J.P., Springer, T.A.. (1995). High endothelial venules (HEV): Specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immun Today*; 16: 449-457.
- Gomyo, H., Arai, Y., Tanigami, A., Murakami, Y., Hattori, M., Hosoda, F., Arai, K., Aikawa, Y., Tsuda, H., Hirohashi, S., Asakawa, S., Shimizu, N., Soeda, E., Sakaki, Y., Ohki, M.. (1999). A 2-Mb sequence-ready contig map and a novel immunoglobulin superfamily gene *IGSF4* in the LOH region of chromosome 11q23.2. *Genomics*; 62: 139-146.
- Gowans, J.L. and Knight, E.J.. (1964). The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc Roy Soc Lond Ser B*; 159: 257-282.
- Grau, G.E., Mili, N., Lou, J.N., Morel, D.R., Ricou, B., Lucas, R. and Suter, P.M.. (1996). Phenotypic and functional analysis of pulmonary microvascular endothelial cells from patients with acute respiratory distress syndrome. *Lab Invest*; 74: 761-770.
- Gromeier, M., Lachmann, S., Rosenfeld, M.R., Gutin, P.H., and Wimmer, E.. (2000). Intergenic poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97: 6803-6808.
- Gross, P.L., Aird, W.C.. (2000). The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost*; 26: 463-478.
- Gumbiner, B.M.. (1993). Breaking through the tight junction barrier [comment]. *J Cell Biol*; 123: 1631-1633.

- Gumbiner, B.M.. (1996). Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*; 84: 345–357.
- Gumbiner, B.M.. (2000). Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol*; 148: 399–403.
- Hänninen, A., Taylor, C., Streeter, P.R., Stark, L.S., Saile, J.M., Shizuru, J.A., Simell, O. and Michie, S.A.. (1993). Vascular addressins are induced on islet vessels during insulinitis in NOD mice and are involved in lymphoid cell binding to islet endothelium. *J Clin Invest*; 92: 2590–2515.
- Hall, J.G. and Morris, B.. (1965). The origin of cells in the efferent lymph from a single lymph node. *J Exp Med*; 121: 901–910.
- Harder, R., Uhlig, H., Kashan, A., Schutt, B., Duijvestijn, A., Butcher, E.C., Thiele, H.G., Hamann, A.. (1991). Dissection of murine lymphocyte-endothelial cell interaction mechanisms by SV-40-transformed mouse endothelial cell lines: Novel mechanisms mediating basal binding, and α 4-integrin-dependent cytokine-induced adhesion. *Exp Cell Res*; 197: 259–267.
- Hatley, M.E., Srinivasan, S., Reilly, K.B., Bolick, D.T. and Hedrick, C.C. (2003). Increased production of 12/15 lipoxygenase eicosanoids accelerates monocyte/endothelial interactions in diabetic db/db mice. *J Biol Chem*; 278: 25369–25375.
- Hay, J.B. & Hobbs, B.B.. (1977). The flow of blood to lymph nodes and its to lymphocyte traffic and the immune response. *J Exp Med*; 145: 31–44.
- Hewett, P.W., Murray, J.C.. (1993). Human microvessel endothelial cells: isolation, culture and characterization. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*; 29A: 823–830.
- Hida, K., Hida, Y., Amin, D.N., Flint, A.F., Panigrahy, D., Morton, C.C. and Klagsbrun, M.. (2004). Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Research*; 64: 8249–8255.
- Hirase, T., Staddon, J.M., Saitou, M., et al.. (1997). Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci*; 110: 1603–1613.
- Hirschberg, H., Moen, T. and Thorsby, E.. (1979). Specific destruction of human endothelial cells by antisera. *Transplantation*; 28: 116–120.
- Hirschberg, H., Bergh, O.J. and Thorsby, E.. (1980). Antigen presenting properties of human vascular endothelial cells. *J Exp Med*; 152: 249–255.
- Hisatsune, H., Matsumura, K., Ogawa, M., Uemura, A., Kondo, N., Yamashita, J.K., Katsuta, H., Nishikawa, S., Chiba, T. and Nishikawa, S.-I.. (2005). High level of endothelial cell-specific gene expression by a combination of the 5' flanking region and the 5' half of the first intron of the VE-cadherin gene. *Blood*; 105: 4657–4663.
- Honda, T., Shimizu, K., Kawakatsu, T., Fukuhara, A., Irie, K., Nakamura, T., Matsuda, M., Takai, Y.. (2003a). Cdc42 and Rac small G proteins activated by trans interactions of nectins are involved in activation of c-Jun N-terminal kinase, but not in association of nectins and cadherin to form adherens junctions, in fibroblasts. *Genes Cells*; 8: 481–491.
- Honda, T., Shimizu, K., Kawakatsu, T., Yasumi, M., Shingai, T., Fukuhara, A., Ozaki-Kuroda, K., Irie, K., Nakanishi, H., Takai, Y.. (2003b). Antagonistic and agonistic effects of an extracellular fragment of nectin on formation of E-cadherin based cell-cell adhesion. *Genes Cells*; 8: 51–63.
- Honda, T., Shimizu, K., Fukuhara, A., Irie, K., Takai, Y.. (2003c). Regulation by nectin of the velocity of the formation of adherens junctions and tight junctions. *Biochem Biophys Res Commun*; 306: 104–109.
- Hu, M.C., Holzmam, B., Crowe, D. T., Neuhaus, H. and Weissman, I. L.. (1993). The Peyer's patch homing receptor. *Curr Top Microbiol Immun*; 184: 125–138.
- Ida-Hosonuma, M., Sasaki, Y., Toyoda, H., Nomoto, A., Gotoh, O., Yonekawa, H. and Koike, S.. (2003). Host range of poliovirus is restricted to simians because of a rapid sequence change of the poliovirus receptor gene during evolution. *Arch Virol*; 148: 29–44.
- Ikeda, W., Kakunaga, S., Itoh, S., Shingai, T., Takekuni, K., Satoh, K., Inoue, Y., Hamaguchi, A., Morimoto, K., Takeuchi, M., Imai, T., Takai, Y.. (2003). Tage4/nectin-like molecule-5 heterophilically trans-interacts with cell adhesion molecule nectin-3 and enhances cell migration. *J Biol Chem*; 278: 28167–28172.
- Ikeda, W., Kakunaga, S., Takekuni, K., Shingai, T., Satoh, K., Morimoto, K., Takeuchi, M., Imai, T., Takai, Y.. (2004). Nectin-like molecule-5/Tage4 enhances cell migration in an integrin-dependent, nectin-3-independent manner. *J Biol Chem*; 279: 18015–18025.
- Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T., Ikeda, W., Takai, Y.. (2004). Roles of nectins in cell adhesion, signaling and polarization. In: Behrens J, Nelson J, editors. *Handbook of experimental pharmacology on "cell adhesion."* Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag GmbH & Co KG.
- Iwasaki, A., Welker, R., Mueller, S., Linehan, M., Nomoto, A. and Wimmer, E.. (2002). Immunofluorescence analysis of poliovirus receptor expression in Payer's patches of humans, primates, and CD155 transgenic mice: Implications for poliovirus infection. *J Infect Dis*; 186: 585–592.
- Izawa, D., Tanaka, T., Saito, K., Ogihara, H., Usui, T., Kawamoto, S., Matsubara, K., Okubo, K. and Miyasaka, M.. (1999). Expression profile of active genes in mouse lymph node high endothelial cells. *Int Immun*; 11: 1989–1998.
- Jersmann, H.P., Hii, C.S., Ferrante, J.V. and Ferrante, A.. (2001). Bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- α synergistically increase expression of human endothelial adhesion molecules through activation of NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Infect Immun*; 69: 1273–1279.
- Jirik, F.R., Podor, T.J., Hirano, T., Kishimoto, T., Loskutoff, D.J., Carson, D.A. and Lotz, M.. (1989). Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immun*; 142: 144–147.
- Johnson, P., Maiti, A. and Ng, D.H.W.. (1997). CD45: A family of leukocyte-specific cell surface glycoproteins. In *Weir's Handbook of Experimental Immunology*, Vol. 2. L.A. Herzenberg, D.M. Weir, L.A. Herzenberg, and C. Blackwell, eds. Blackwell Science, Cambridge, MA, pp. 62.1–62.16.
- Johnson-Leger, C., Aurrand-Lions, M. and Imhof, B.A.. (2000). The parting of the endothelium: Miracle, or simply a junctional affair? *J Cell Sci*; 113: 921–933.
- Karnovsky, M.J.. (1967). The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J Cell Biol*; 35: 213–236.
- Katz, S.C., Pillarisetty, V.G., Bleier, J.I., Shah, A.B. and DeMatteo, R.P.. (2004). Liver sinusoidal endothelial cells are insufficient to activate T cells. *J Immun*; 173: 230–235.

Schriftenverzeichnis

- Kawakatsu, T., Shimizu, K., Honda, T., Fukuhara, T., Hoshino, T., Takai, Y.. (2002). Trans-Interactions of nectins induce formation of filopodia and lamellipodia through the respective activation of Cdc42 and Rac small G proteins. *J Biol Chem*; 277: 50749–50755.
- Kibria, G., Heath, D., Smith, P., et al.. (1980). Pulmonary endothelial pavement patterns. *Thorax*; 35: 186–191.
- King, S.M., Dillman 3rd, J.F., Benashski, S.E., Lye, R.J., Patelking, R.S. and Pfister, K.K.. (1996). The mouse t-complex-encoded protein Tctex-1 is a light chain of brain cytoplasmic dynein; *J Biol Chem*; 271: 32281–32287.
- Kobayashi, M., Inoue, K., Warabi, E., Minami, T., Kodama, T.. (2005). A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*; 12: 138–142.
- Koike, S., Horie, H., Ise, I., Okitsu, A., Yoshida, M., Iizuka, N., Takeuchi, K., Takegami, T., Nomoto, A.. (1990). The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO J*; 9: 3217–3224.
- Koike S., Ise I., Sato Y., Yonekawa H., Gotoh O., Nomoto A.. (1992). A second gene for the African green monkey poliovirus receptor that has no putative N-glycosylation site in the functional N-terminal immunoglobulin-like domain. *J Virol*; 66: 7059–7066.
- Kojima, H., Kanada, H., Shimizu, S., Kasama, E., Shibuya, K., Nakauchi, H., Nagasawa, T. and Shibuya, A.. (2003). CD226 mediates platelet and megakaryocytic cell adhesion to vascular endothelial cells. *J Biol Chem*; 278: 36748–36753.
- Kraal, G. and Mebius, R.E.. (1997). High endothelial venules: Lymphocyte traffic control and controlled traffic. *Advan Immun*; 65: 347–395.
- Kucik, D.F., Dustin, M.L., Miller, J.M. and Brown, E.J.. (1996). Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *J Clin Invest*; 97: 2139–2144.
- Kumar, S., West, D.C., Ager, A.. (1987). Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation*; 36: 57–70.
- Kunkel, E.J. and Butcher, E.C.. (2002). Chemokines and the tissuespecific migration of lymphocytes. *Immunity*; 16: 1–4.
- Kuramochi, M., Fukuhara, H., Nobukuni, T., Kanbe, T., Maruyama, T., Ghosh, H.P., Pletcher, M., Isomura, M., Onizuka, M., Kitamura, T., Sekiya, T., Reeves, R.H., Murakami Y.. (2001). TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nature Genet*; 27: 427–430.
- Kutcher, M.E., Klagsbrun, M. and Mamluk, R.. (2004). VEGF is required for the maintenance of dorsal root ganglia blood vessels but not neurons during development. *FASEB J*; 18: 1952–1954.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L. and Grompe, M.. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. ; *Nature Med*; 6: 1229–1234.
- Lampugnani, M.G., Corada, M., Caveda, L., Breviario, F., Ayalon, O., Geiger, B. and Dejana, E.. (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: Differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol*; 129: 203–217.
- Lampugnani, M.G. and Dejana, E.. (1997). Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol*; 9: 674–682.
- Lange, R., Peng X., Wimmer E., Lipp, M. and Bernhardt, G.. (2001). The poliovirus receptor CD155 mediates cell-to-matrix contacts by specifically binding to vitronectin. *Virology*; 285: 218–227.
- Larson, R.S. and Springer, T.A.. (1990). Structure and function of leukocyte integrins. *Immun Rev*; 114: 181–217.
- Lasky, L.A.. (1992). Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science*; 258: 964–969.
- Lasky, L.A., Singer, M.S., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, W. J., Grimley, C., Fannie, C., Gillett, N., Watson, S.R. and Rosen, S.D.. (1992). An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell*; 89: 927–938.
- Lasky, L.A.. (1995). Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem*; 64: 113–139.
- Ledbetter, J.A. and Herzenberg, L.A.. (1979). Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immun Rev*; 47: 63–90.
- Leeuwenberg, J.F., von Asmuth, E. J., Jeunhomme, T.M. and Buurman, W.A.. (1990). IFN gamma regulates the expression of the adhesion molecule ELAM-1 and IL-6 production by human endothelial cells in vitro. *J Immun*; 145: 2110–2114.
- Ley, K. and Tedder, T.F.. (1995). Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J Immun*; 155: 525–528.
- Li, X.C., Miyasaka, M. and Issekutz, T.B.. (1998). Blood monocyte migration to acute lung inflammation involves both CD11/CD18 and very late activation antigen-4-dependent and independent pathways. *J Immun*; 161: 6258–6264.
- Liao, F., Ali, J., Greene, T. and Muller, W.A.. (1997). Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Exp Med*; 185: 1349–1357.
- Libby, P., Ordovas, J.M., Auger, K.R., Robbins, A.H., Birinyi, L.K. and Dinarello, C.A.. (1986). Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am J Pathol*; 124: 179–185.
- Lim, Y.-C., Garcia-Cardena, G., Allport, J.R., Zervoglos, M., Connolly, A.J., Gimbrone, Jr., M.A. and Luscinskas, F.W.. (2003). Heterogeneity of endothelial cells from different organ sites in T-cell subset recruitment. *Am J Path*; 162: 1591–1601.
- Lobb, R.R. and Hemler, M.E.. (1994). The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J Clin Invest*; 94: 1722–1728.
- Lopez, M., Aoubala, M., Jordier, F., Isnardon, D., Gomez, S. and Dubreuil, P.. (1998).. The human poliovirus receptor related 2 protein is a new hematopoietic/endothelial homophilic adhesion molecule. *Blood*; 92: 4602–4611.
- Lopez, M., Cocchi, F., Menotti, L., Avitabile, E., Dubreuil, P. and Campadelli-Fiume.. (2000). Nectin2alpha (PRR2alpha or HveB) and nectin2delta are low-efficiency mediators for entry of herpes simplex virus mutants carrying the Leu25Pro substitution in glycoprotein D. *J Virol*; 74: 1267–1274.

- Luscinskas, F.W., Ma, S., Nusrat, A., Parkos, C.A. and Shaw, S.K.. (2002). Leukocyte transendothelial migration: A junctional affair. *Semin Immun*; 14: 105–113.
- Mackay, C.R., Marston, W.L. and Dudler, L.. (1990). Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med*; 171: 801-817.
- Mackay, C.R., Marston, W. and Dudler, L.. (1992). Altered patterns of T cell migration through lymph nodes and skin following antigen challenge. *Eur J Immun*; 22: 2205–2210.
- Majno, G.. (1965). Ultrastructure of the vascular membrane. *Handbook of Physiology 1965 III*: Ed., Hamilton, W. F.. Am Physiol Soc, Washington, D.C.: 2293-2375.
- Mamdouh, Z., Chen, X., Pierini, L.M., Maxfield, F.R. and Muller, W.A.. (2003). Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature*; 421: 748–753.
- Marchesi, V.T. and Gowans, J.L.. (1964). The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: An electron microscope study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*; 159: 283–290.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., et al.. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol*; 142: 117–127.
- Masson, D., Jarry, A., Baury, B., Blanchardie, P., Labois, C., Lustenberger, P., Denis, M.G.. (2001). Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. *Gut*; 49: 236–240.
- Masson, V., Devy, L., Grignet-Debrus, C., Bernt, S., Bajou, K., Blacher, S., Roland, G., Chang, Y., Fong, T., Carmeliet, P., Foidart J.-M. and Noël, A.. (2002). Mouse aortic ring assay: A new approach of the molecular genetics of angiogenesis. *Biol Proced Online*; 4: 24-31.
- Mebius, R.E., Breve, J., Kraal, C. and Streeter, P.R.. (1993). Developmental regulation of vascular addressin expression-a possible role for site-associated environments. *Int Immun*; 5: 443-449.
- Mendelsohn, C.L., Wimmer, E. and Racaniello, V.R.. (1989). Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*; 56: 855–865.
- Millan, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P. and Ridley, A. J.. (2005). Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nature Cell Biol*; 8: 113-123.
- Miossec, P., Cavender, D. and Ziff, M.. (1986). Production of interleukin-1 by human endothelial cells. *J Immun*; 136: 2486–2491.
- Miyasaka, M. and Tanaka, T.. (2004). Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: Dogmas and enigmas. *Nature Immun Rev*; 4: 360-370.
- Muczynski, K.A., Ekle, D.M., Coder, D.M. and Anderson, S.K.. (2003). Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial cells: Characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression. *J Am Soc Nephrol*; 14: 1336–1348.
- Mueller, S., Wimmer, E.. (2003). Recruitment of Nectin-3 to cell-cell junctions through trans-heterophilic interaction with CD155, a vitronectin and poliovirus receptor that localizes to alpha(v)beta3 integrin-containing membrane microdomains. *J Biol Chem*; 278: 31251-31260.
- Muller, W.A., Ratti, C.M., McDonnell, S.L., Cohn, Z.A.. (1989). A human endothelial cell-restricted externally disposed plasmalemmal protein enriched in the intercellular junctions. *J Exp Med*; 170: 399-414.
- Muller, W.A., Weigl S.A., Deng, X. and Phillips, D.M.. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*; 178: 449–460.
- Nagafuchi, A.. (2001). Molecular architecture of adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol*; 13: 600–603.
- Nagura, H., Koshikawa, T., Fukuda, Y. and Isai, J.. (1986). Hepatic vascular endothelial cells heterogeneously express surface antigens associated with monocytes, macrophages and T lymphocytes. *Virchows Arch*; 409: 407–416.
- Newman, P.J.. (1999). Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J Clin Invest*; 103: 5-9.
- Ohbayashi, A., Hiraga, T., Okubo, M., Murase, T., Matsushita, H. and Hara, M.. (1994). Characteristics of porcine coronary artery endothelial cells in culture: Comparison with aortic endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*; 202: 504–511.
- Onoe, T., Ohdan, H., Tokita, D., Hara, H., Tanaka, Y., Ishiyama, K. and Asahara, A.. (2004). Liver sinusoidal endothelial cells have a capacity for inducing nonresponsiveness of T cells across major histocompatibility complex barriers. *Transplant International*; 18: 206-214.
- Ostermann, G., Weber, K.S., Zernecke, A., Schroder, A. and Weber, C.. (2002). JAM-1 is a ligand of the beta(2) Integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nature Immun*; 3: 151–158.
- Ozaki, H., Ishii, K., Horiuchi, H., Arai, H., Kawamoto, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kita, T.. (1999). Cutting edge: Combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. *J Immun*; 163: 553–557.
- Pabst, R.. (1988). The spleen in lymphocyte migration. *Immun Today*; 9: 43-45.
- Pabst, R. and Binns, R.M.. (1989). Heterogeneity of lymphocyte homing physiology: Several mechanisms operate in the control of migration to lymphoid and non-lymphoid organs in vivo. *Immun Rev*; 108: 83–109.
- Palframan, R.T., et al.. (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: 1361–1374.
- Parums, D.V., Cordell, J.L., Micklem, K., Heryet, A.R., Gatter, K.C. and Mason, D.Y.. (1990). A new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol*; 43: 752–757.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C., Fuchs, E.. (2003). Sticky business: Orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*; 112: 535–548.
- Picker, L.J. and Butcher, E.C.. (1992). Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immun*; 10: 561-591.
- Pober, J.S. and Gimbrone, M.A.. (1982). Expression of Ia-like antigens by human vascular endothelial cells is inducible in vitro. Demonstration by monoclonal antibody

Schriftenverzeichnis

- binding and immunoprecipitation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 79: 6641–6645.
- Ponder, B.A., Wilkinson, M.M.. (1983). Organ-related differences in binding of Dolichos biflorus agglutinin to vascular endothelium. *Dev Biol*; 96: 535–541.
- Ponta, H., Sherman, L. and Herrlich, P.A.. (2003). CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Rev Mol Cell Biol*; 4: 33–45.
- Porter, G.A., Palade, G.E., Milici, A.J.. (1990). Differential binding of the lectins Griffonia simplicifolia I and Lycopersicon esculentum to microvascular endothelium: Organ-specific localization and partial glycoprotein characterization. *Eur J Cell Biol*; 51: 85–95.
- Rabiet, M.J., Plantier, J.L. and Dejana, E.. (1994). Thrombin-induced endothelial cell dysfunction. *Br Med Bull*; 50: 936–945.
- Rabiet, M.J., Plantier, J.L., Rival, Y., Genoux, Y., Lampugnani, M.G. and Dejana, E.. (1996). Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 16: 488–496.
- Rauscher, F.M., Goldschmidt-Clermont, P.J., Davis, B.H., Wang, T., Gregg, D., Ramaswami, P., Pippen, A.M., Annex, B.H., Dong, C., Taylor, D.A.. (2003). Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*; 108: 457–463.
- Ravens, I., Seth, S., Förster, R. and Bernhardt, G.. (2003). Characterization and identification of Tage4 as the murine orthologue of human poliovirusreceptor/CD155. *Biochem and Biophys Research Comm*; 312: 1364–1371.
- Reutershan, J., Morris, M.A., Burcin, T.L., Smith, D.F., Chang, D., Saprito, M.S. and Ley, K.. (2006). Critical role of endothelial CXCR2 in LPS induced neutrophil migration into the lung. *J Clin Invest*; 116: 695–702.
- Reymond, N., Fabre, S., Lecocq, E., Adelaide, J., Dubreuil P. and Lopez, M.. (2001). Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. *J Biol Chem*; 276: 43205–43215.
- Reymond, N., Imbert, A.-M., Devillard, E., Fabre, S., Chabannon, C., Xerri, L., Farnarier, C., Cantoni, C., Bottino, C., Moretta, A., Dubreuil, P. and Lopez, M.. (2004). DNAM-1 and PVR Regulate Monocyte Migration through Endothelial Junctions. *J Exp Med*; 199: 1331–1341.
- Risau, W. and Wolburg, H.. (1990). Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*; 13: 174–178.
- Risau, W.. (1995). Differentiation of endothelium. *FASEB J*; 9: 926–933.
- Rojas, M., Woods, C.R., Mora, A.L., Xu, J. and Brigham, K.L.. (2004). Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. *Am J Phys*; 288: 333–341.
- Rose, M.L., Page, C., Hengstenberg, C. and Yacoub, M. H.. (1990). Identification of antigen presenting cells in normal and transplanted human heart. *Hum Immun*; 28: 179–185.
- Rosen, S.D. and Bertozzi, C.R.. (1994). The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol*; 6: 663–673.
- Rosenberg, R.D., Aird, W.C.. (1999). Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states. *N Engl J Med*; 340: 1555–1564.
- Rubin, L.L.. (1992). Endothelial cells: Adhesion and tight junctions. *Curr Opin Cell Biol*; 4: 830–833.
- Schenkel, A.R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R.M. and Muller, W.A.. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nature Immun*; 3: 143–150.
- Schleiffenbaum, B., Fehr, J., Odermatt, B. and Sperb, R.. (1998). Inhibition of leukocyte emigration induced during the systemic inflammatory reaction in vivo is not due to IL-8. *J Immun*; 161: 3631–3638.
- Schmelz, M. and Franke, W.W.. (1993). Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: The syndesmos connecting retothelial cells of lymph nodes. *Eur J Cell Biol*; 61: 274–289.
- Schnitzer, J.E., Shen, C.P., Palade, G.E.. (1990). Lectin analysis of common glycoproteins detected on the surface of continuous microvascular endothelium in situ and in culture: Identification of sialoglycoproteins. *Eur J Cell Biol*; 52: 241–251.
- Scholz, D., Schaper, J.. (1997). Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is localized over the entire plasma membrane of endothelial cells. *Cell Tissue Res*; 290: 623–631.
- Shi, W., Haberland, M.E., Jien, M.-L., Shih, D.M., Lusi, A.J.. (2000). Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice. *Circulation*; 102: 75–81.
- Shibuya, A., Campbell, D., Hannum, C., Yssel, H., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Kitamura, T., Nicholl, J., Sutherland, G.R., Lanier, L.L. and Phillips, J.H.. (1996). DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity*; 4: 573–581.
- Shibuya, A., Lanier, L.L. and Phillips, J.H.. (1998). Protein kinase C is involved in the regulation of both signaling and adhesion mediated by DNAX accessory molecule-1 receptor. *J Immun*; 161: 1671–1676.
- Shibuya, K., Lanier, L.L., Phillips, J.H., Ochs, H.D., Shimizu, K., Nakayama, E., Nakauchi, H. and Shibuya, A.. (1999). Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity*; 11: 615–623.
- Shimizu, Y., Rose, D.M. and Ginsberg, M.H.. (1999). Integrins in the immune system. *Advan Immun*; 72: 325–380.
- Silkworth, J.B., Stehbens, W.E.. (1975). The shape of endothelial cells in en face preparations of rabbit blood vessels. *Angiology*; 26: 474–487.
- Simionescu, M., Simionescu, N., Palade, G.E.. (1975). Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium: The microvasculature. *J Cell Biol*; 67: 863–885.
- Simionescu, M., Simionescu, N. and Palade, G.E.. (1976). Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins. *J Cell Biol*; 68: 705–723.
- Simionescu, M. and Simionescu, N.. (1991). Endothelial transport of macromolecules: Transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev*; 25: 5–78.
- Simionescu M.. (2000). Structural biochemical and functional differentiation of the vascular endothelium. In: *Morphogenesis of Endothelium*, edited by W. Risau and G. M. Rubanyi. Amsterdam: Harwood Academic Pub: 1–23.

- Sironi, M., Breviario, F., Proserpio, P., Biondi, A., Vecchi, A., Van Damme, J., Dejana, E. and Mantovani, A.. (1989). IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol*; 142: 549–553.
- Spangrude, G.J., Baaten, B.A. and Daynes, R.A.. (1984). Molecular mechanisms of lymphocyte extravasation. I. studies of two selective inhibitors of lymphocyte recirculation. *J Immunol*; 132: 354–362.
- Springer, T.A.. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*; 76: 301–314.
- Stadtfeld, M. and Graf, T.. (2005). Assessing the role of hematopoietic plasticity for endothelial and hepatocyte development by non-invasive lineage tracing. *Development*; 132: 203–213.
- Stewart, M., Thiel, M. and Hogg, N.. (1995). Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol*; 7: 690–696.
- Stoolman, L.M.. (1989). Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell*; 56: 907–910.
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonnier, P.C., Davis, S., Sato, T.N. and Yancopoulos, G.D.. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*; 87: 1171–1180.
- Takahashi, K., Nakanishi, H., Miyahara, M., Mandai, Satoh, K., Satoh, A., Nishioka, H., Aoki, J., Nomoto, A., Mizoguchi, A. and Takai, Y.. (1999). Nectin/PRR: An immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *J Cell Biol*; 145: 539–549.
- Takai, Y., Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T. and Ikeda, W.. (2003). Nectins and nectin-like molecules: Roles in cell adhesion, and polarization. *Cancer Sci*; 94: 655–667. (In dieser Arbeit als - Takai, 2003 - zitiert)
- Takai, Y., Nakanishi, H.. (2003). Nectin and afadin: Novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci*; 116: 17–27. (In dieser Arbeit als - Takei und Nakanishi, 2003 - zitiert)
- Takeichi, M.. (1991). Cadherin cell adhesion receptor as a morphogenetic regulator. *Science*; 251: 1451–1455.
- Takeichi, M.. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol*; 7: 619–627.
- Takekuni, K., Ikeda, W., Fujito, T., Morimoto, K., Takeuchi, M., Monden, M., Takai, Y.. (2003). Direct binding of cell polarity protein PAR-3 to cell-cell adhesion molecule nectin at neuroepithelial cells of developing mouse. *J Biol Chem*; 278: 5497–500.
- Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U. and Shaw, S.. (1993). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature*; 361: 79–82.
- Tanaka, Y., Nakanishi, H., Kakunaga, S., Okabe, N., Kawakatsu, T., Shimizu, K., Takai, Y.. (2003). Role of nectin in formation of E-cadherin-based adherens junctions in keratinocytes: Analysis with the N-cadherin dominant negative mutant. *Mol Biol Cell*; 14: 1597–609.
- Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M., Peifer, M.. (2000). Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nature Rev Mol Cell Biol*; 1: 91–100.
- Thiery, J.P.. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev Cancer*; 2: 442–454.
- Thomas, M.. (1989). The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol*; 7: 339–369.
- Thorin, E., Shatos, M.A., Shreeve, M., Walters, C.L., Bevan, J.A.. (1997). Human vascular endothelium heterogeneity: a comparative study of cerebral and peripheral cultured vascular endothelial cells. *Stroke*; 28: 375–381.
- Thum, T., Haverich, A., Borlak, J.. (2000). Cellular dedifferentiation of endothelium is linked to activation and silencing of certain nuclear transcription factors: Implications for endothelial dysfunction and vascular biology. *FASEB J*; 14: 740–751.
- Tsukita, S., Tsukita, S., Nagafuchi, A., Tonemura, S.. (1992). Molecular linkages between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol*; 4: 834–839.
- Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M.. (1999). Structural and signalling molecules come to-gether at tight junctions. *Curr Opin Cell Biol*; 11: 628–633.
- Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M.. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Rev Mol Cell Biol*; 2: 285–293.
- Tsutomu, K., Takashi, M., Miyake, K. and Nagura, H.. (1989). Phenotypic heterogeneity of vascular endothelial cells in the human kidney. *Cell Tissue Res*; 256: 27–34.
- Urase, K., Soyama, A., Fujita, E., Momoi, T.. (2001). Expression of RA175 mRNA, a new member of the immunoglobulin superfamily, in developing mouse brain. *Neuroreport*; 12: 3217–3221.
- Urbich, C., Dimmeler, S.. (2004). Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circ Res*; 95: 343–353.
- Van Aelst, L., Symons, M.. (2002). Role of Rho family GTPases in epithelial morphogenesis. *Genes Dev*; 16: 1032–1054.
- Van Furth, R.. (1982). Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiol*; 161: 178–185.
- Van Kooyk, Y., Weder, P., Heije, K. and Figdor, C.G.. (1994). Extracellular Ca²⁺ modulates leukocyte function-associated antigen-1 cell surface distribution on T lymphocytes and consequently affects cell adhesion. *J Cell Biol*; 124: 1061–1070.
- Vanzulli, S., Gazzaniga, S., Braidot, M.F., Vecchi, A., Mantovani, A. and de Calmanovici, R.W.. (1997). Detection of endothelial cells by MEC 13.3 monoclonal antibody in mice mammary tumors. *Biocell*; 21: 39–46.
- Vecchi, A., Garlanda, C., Lampugnani, M.G., Resnati, M., Matteucci, C., Stoppacciaro, A., Schnurch, H., Risau, W., Ruco, L., Mantovani, A. and Dejana, E.. (1994). Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol*; 63: 247–254.
- Vestweber, D.. (1993). The selectins and their ligands. *Curr Top Microbiol Immun*; 184: 65–75.
- Vestweber, D.. (2000). Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol*; 190: 281–291.
- Vestweber, D.. (2002). Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Curr Opin Cell Biol*; 14: 587–593.

Schriftenverzeichnis

- Von Andrian, U.H.. (1996). Intravital microscopy of the peripheral lymph node microcirculation in mice. *Microcirc*; 3: 287–300.
- Von Andrian, U.H. and M'Rini, C.. (1998). In situ analysis of lymphocyte migration to lymph nodes. *Cell Adhes Commun*; 6: 85–96.
- Von Andrian, U.H. and Mempel, T.R.. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature Rev Immun*; 3: 867–878.
- Wagner, C.R., Vetto, M.R. and Burger, D.R.. (1985). Subcultured human endothelial cells can function independently as fully competent antigen presenting cells. *Hum Immun*; 13: 33–47.
- Wakayama, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Iseki, S.. (2001). Cloning and characterization of a novel mouse immunoglobulin superfamily gene expressed in early spermatogenic cells. *Mol Reprod Dev*; 60: 158–164.
- Walker, D.C., MacKenzie, A. and Hosford, S.. (1994). The structure of the tricellular region of endothelial tight junctions of pulmonary capillaries analyzed by freeze-fracture. *Microvasc Res*; 48: 259–281.
- Wang, P.L., O'Farrell, S., Clayberger, C. and Krensky, A.M.. (1992). Identification and molecular cloning of tactile: a novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J Immun*; 148: 2600–2608.
- Warnock, R.A., Askari, S., Butcher, E.C. and von Andrian, U.H.. (1998). Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med*; 187: 205–216.
- Watt, S.M., Gschmeissner, S.E. and Bates, P.A.. (1995). PECAM-1: Its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma*; 17: 229–244.
- Weber, C.. (2003). Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: Specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J Mol Med*; 81: 4–19.
- Wellicome, S.M., Thornhill, M.H., Pitzalis, C., Thomas, D.S., Lanchbury, J.S., Panayi, G.S. and Haskard, D.O.. (1990). A monoclonal antibody that detects a novel antigen on endothelial cells that is induced by tumor necrosis factor, IL-1, or lipopolysaccharide. *J Immun*; 144: 2558–2565.
- Worthylake, R.A. and Burridge, K.. (2001). Leukocyte transendothelial migration: Orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Opin Cell Biol*; 13: 569–577.
- Yamamoto, M., Shimokata, K. and Nagura, H.. (1988). Immunohistochemical study on phenotypic heterogeneity of human pulmonary vascular endothelial cells. *Virchows Arch*; 412: 479–486.
- Yap, A.S., Brieher, W.M., Gumbiner, B.M.. (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 13: 119–146.
- Yee, A.G. and Revel, J.P.. (1975). Endothelial cell junctions. *J Cell Biol*; 66: 200–204.
- Zetter, B.R.. (1988). Endothelial heterogeneity: Influence of vessel size, organ localization, and species specificity on the properties of cultured endothelial cells. In: *Endothelial Cell II*. Ryan, U. S. (ed.) CRC Press, Boca Raton: 63–79.
- Zhao, B., Bowden, R.A., Stavchansky, S.A. and Bowman, P.D.. (2001). Human endothelial cell response to gram-negative lipopolysaccharide assessed with cDNA microarrays. *Am J Physiol Cell Physiol*; 281: 1587–1595.

CURRICULUM VITAE

SÖREN LAURISCH

geboren am 15. Mai 1981 in Hannover,
ledig und kinderlos

Anschrift: Calenberger Esplanade 7,
30169 Hannover
Tel.: 0511 488 933 23
soelau@hotmail.de

Bildung

Dez 2008	Approbation	
Okt 2003 – Mär 2008	Medizinische Hochschule Hannover	
	Klinischer Abschnitt: 2. Ärztliche Prüfung:	2,0 (Dez 2008)
Okt 2001 – Jul 2003	Medizinische Hochschule Hannover	
	Vorklinischer Abschnitt: Physikum:	1,66 (Aug 2003)
Aug 1993 – Jul 2000	Gymnasium Sarstedt: Abitur:	1,8 (Jul 2000)

Arbeitserfahrung

Praktisches Jahr

Okt - Jan 2008	Chirurgie	Medizinische Hochschule Hannover
Jun - Okt 2007	Anästhesie	Medizinische Hochschule Hannover
Mär - Jun 2007	Innere Medizin	Agnes-Karll-Krankenhaus, Laatzen

Famulaturen, Sonstige

Jan 2007	Allgemeinmedizin	Praxis Dr. Oppermann, Pattensen
Sep - Okt 2006	Orthopädie	Singapore General Hospital, National University of Singapore
Aug - Sep 2006	Chirurgie	Singapore General Hospital, National University of Singapore
Jul 2006	Innere Medizin	Friederikenstift, Hannover
Sep - Okt 2004	Innere Medizin	Friederikenstift, Hannover

Lehrerfahrungen

Jun - Jul 2008	Tutortätigkeit im Rahmen des Physiologie-Praktikums
Mai - Jul 2008	Haupttutor, Kursus der Makroskopischen Anatomie, Prof. Tschernig
Okt - Mär 2005	Ehrenamtlicher Haupttutor, Kursus der Makroskopischen Anatomie, Prof. v. Rautenfeld

Forschungserfahrung

Mär - Nov 2005	Institut für Immunologie (Prof. Förster, Dr. Bernhardt, MHH, TPFZ): Experimenteller Teil einer medizinischen Dissertation: "Rolle des murinen Poliovirus-Rezeptor-Orthologs (mCD155/ Tage4) in transendothelialen Migrationsprozessen von Lymphozyten"
----------------	---

Soziale Tätigkeit

Aug - Jul 2001	Deutsches Rotes Kreuz: Sozialstation Pattensen / Springe: Zivildienst mit Tätigkeiten in der Behinderten- und Altenpflege
----------------	--

Anhang

Auszeichnungen	2006 Dr. Carl Duisberg Stipendium, Stethosglobe Reisestipendium 2000 Buchpreis der Deutschen Physikalischen Gesellschaft („Als Anerkennung für hervorragende Leistungen im Fach Physik")
Gesellschaftspolitik	2006 Kandidat der FDP bei den Kommunalwahlen der Stadt Pattensen
Sport	2001 Mountainbike (U23): Niedersachsenmeister sowie Kreis- und Bezirksmeister von Hannover
Sprachkenntnisse	Deutsch (Muttersprache), English (fließend), Großes Latein

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel - ***Rolle des murinen Poliovirusrezeptor-Orthologs (mCD155/Tage4) bei transendothelialen Migrationsprozessen von Lymphozyten*** - im Institut für Immunologie unter Betreuung von Dr. Bernhardt mit der Unterstützung durch Professor Dr. Förster durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Hannover, den 15.01.2009

.....

(Unterschrift)

Mein besonderer Dank gilt Dr. Günter Bernhardt, der mir einen vertieften Einblick in die wissenschaftliche Arbeitswelt ermöglichte und mir so dazu verhalf mich selbst dahingehend zu testen. Ich bedanke mich besonders für das Vertrauen, das er mir schenkte, für den grossen Freiraum, sowie natürlich für Hilfen jeglicher Art (inklusive der moralischen Unterstützung).

Herrn Professor Förster möchte ich dafür danken, dass ich die Gelegenheit erhalten habe in seinem Institut eine medizinische Dissertation anfertigen zu dürfen.

Mein Dank gilt darüber hinaus Inga Ravens, Niklas Czeloth, Michael Klaus Maier und Sebastian Seth, die ich eine zeitlang beim Anarbeiten gegen die Naturgeheimnisse begleiten durfte. Danken möchte ich auch Dr. Gabriele Hintzen, Dr. Ana Misslitz, Dr. Oliver Pabst, sowie Tim Worbs für ihre stete Hilfsbereitschaft bei Fragen jeglicher Art.

Oh - und nicht zu vergessen ist natürlich das Gros der Personen, die hier zwar nicht namentlich erwähnt sind, denen ich selbstverständlich aber ebenfalls zu grösstem Dank verpflichtet bin.