

Aus der
Universitätsklinik für Anästhesie und Intensivmedizin

**Der Einfluss des CX3CR1-Rezeptors auf die
Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen
im Rahmen der Peritonitis und der
Peritonitis-bedingten Sepsis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der
Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Böhne, Jan Hendrik

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatterin: Privatdozentin Dr. F. Konrad

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. V. Steger

Tag der Disputation: 07.12.2022

Verzeichnisse

I. Inhaltsverzeichnis

Verzeichnisse	4
I. Inhaltsverzeichnis	4
II. Abbildungsverzeichnis	8
III. Tabellenverzeichnis	9
IV. Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung	14
1.1 Peritonitis – das Krankheitsbild.....	14
1.2 Die Sepsis.....	15
1.2.1 Definition	15
1.2.2 Pathogenese	16
1.2.3 Erregerspektrum und antiinfektive Therapie.....	18
1.2.4 Adjuvante Therapie	19
1.3 Epidemiologie	20
1.4 Vermittlung der Immunreaktion - Zytokine	21
1.5 Chemotaxis.....	21
1.6 Leukozytenmigration – Selektine und Integrine	22
1.7 Plättchen-Neutrophilen-Komplexe	24
1.8 CX3CR1 und Fraktalkin	26
2 Methoden	29
2.1 Überblick.....	29
2.2 Peritonitis in-vivo Versuch.....	30
2.2.1 Stimulation und Behandlung	31
2.2.2 Operation	31
2.2.3 Peritoneallavage und Blut	31
2.2.4 Vorbereitung der Proben für die FACS-Analyse.....	32
2.3 Durchflusszytometrie	32
2.3.1 Prinzip	32

2.3.2	Material	34
2.3.3	Auswertung	35
2.3.4	Mittlere Fluoreszenz-Intensität	37
2.4	Histologie	37
2.4.1	Operatives Vorgehen	37
2.4.2	Erstellung des histologischen Präparats	37
2.4.3	Immunhistochemische Färbung der PMN	38
2.4.4	Immunhistochemische Färbung der PNC.....	39
2.5	Bestimmung der Genexpression.....	41
2.5.1	RNA-Extraktion	41
2.5.2	Bestimmung der RNA Konzentration.....	42
2.5.3	Umschrieb der RNA in cDNA	42
2.5.4	Polymerase Kettenreaktion	44
2.6	ELISA.....	46
2.7	MPO.....	48
2.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
2.9	Western Blots	49
2.9.1	Proteinisolation.....	49
2.9.2	Gelelektrophoretische Auftrennung.....	49
2.9.3	Blotting	50
2.9.4	Proteindetektion	51
2.10	Statistik und Software	52
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Zellzahlen	53
3.1.1	Gesamtzellzahlen.....	53
3.1.2	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten Zahlen	55
3.1.3	Plättchen-Neutrophilen-Komplexe.....	57
3.2	Selektine	60
3.2.1	P-Selektin und L-Selektin	60
3.2.2	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1	62
3.3	Integrine.....	64
3.3.1	Integrin β_3 (CD61) und Integrin α_5 (CD49e).....	64
3.4	Zytokine und Chemokine	65

3.4.1	Tumornekrose-Faktor α und Interleukin 6	65
3.4.2	ADAM10 und ADAM17.....	67
3.4.3	Fraktalkin.....	69
3.4.4	C-X-C-Motiv Chemokin Ligand 1 und 2 (CXCL1 und CXCL2)	71
3.4.5	C-C Chemokin Rezeptor Typ 2 (CCR2)	72
3.5	Myeloperoxidase.....	74
3.6	Proteinbestimmung	75
3.6.1	Proteinbestimmung in der Peritoneallavage.....	75
3.6.2	Zelluläre Signalkaskaden	76
3.7	Genexpression.....	79
3.7.1	TNF α und IL6	80
3.7.2	CXCL1 und CXCL2	81
3.7.3	Fraktalkin und CX3CR1	82
3.7.4	CCR2 und CCL2	83
4	Diskussion	84
4.1	PMN Zahlen.....	84
4.2	PNC Bildung	85
4.3	Inflammation	87
4.4	Chemotaxis.....	88
4.5	Dysregulierte Immunantwort	89
4.6	ADAM10 und ADAM17	90
4.7	CX3CR1 und CCR2.....	92
4.8	Ausblick	94
5	Zusammenfassung	96
6	Anhang.....	98
6.1	Literaturverzeichnis.....	98
6.2	Material	118
6.2.1	Geräte	118
6.2.2	Materialien.....	119
6.2.3	Chemikalien	121
6.2.4	Lösungen	122
6.2.5	Medikamente.....	122
6.2.6	PCR-Primer.....	123

6.2.7	FACS-Antikörper	124
6.2.8	Immunhistochemische Färbung	124
6.2.9	ELISA	124
6.2.10	Western Blots	125
6.2.11	Enzyme	125
6.2.12	Proteinbestimmung	126
6.2.13	Software	126
7	Eigenständigkeitserklärung	127
8	Veröffentlichung.....	128
9	Danksagung.....	129

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bildung von NETs.....	18
Abbildung 2: Leukozytenmigration	23
Abbildung 3: Plättchen-Neutrophilen-Komplex.....	24
Abbildung 4: Übersicht Methodik.....	30
Abbildung 5: Prinzip der Durchflusszytometrie	33
Abbildung 6: Gating-Prinzip der FACS-Analyse	36
Abbildung 7: Prinzip der immunhistochemischen Färbung.....	39
Abbildung 8: cDNA-Synthese	42
Abbildung 9: Temperaturverlauf bei der Polymerase-Kettenreaktion	44
Abbildung 10: Sandwich-ELISA.....	46
Abbildung 11: Gesamtzellzahl in der Peritoneallavage und im Blut.....	53
Abbildung 12: PMN Zahlen in PL und Blut	55
Abbildung 13: Immunhistochemische PMN-Färbung des Peritoneums.....	56
Abbildung 14: Plättchen-Neutrophilen-Komplexe in der PL und Blut.....	58
Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung der PNCs im Peritoneum	59
Abbildung 16: P-Selektin und L-Selektin auf PNCs in der PL.....	60
Abbildung 17: P-Selektin und L-Selektin auf PNCs im Blut.....	61
Abbildung 18: Expression von PSGL1 auf PMNs und PLTs	62
Abbildung 19: Expression von L-Selektin auf PMNs	63
Abbildung 20: Integrin β_3 (CD61) auf PLTs	64
Abbildung 21: TNF α in PL und Plasma	65
Abbildung 22: IL6 in der Peritoneallavage	66
Abbildung 23: ADAM10 und ADAM17 auf PMNs	68
Abbildung 24: Fraktalkin in der PL und Plasma (Verlauf)	69
Abbildung 25: Fraktalkin in PL und Plasma	70
Abbildung 26: CXCL1 und CXCL2 in der PL	71
Abbildung 27: CCR2 auf den PNCs und CCL2 in der PL	72
Abbildung 28: Myeloperoxidase Aktivität in der PL.....	74
Abbildung 29: Proteinbestimmung in der Peritoneallavage	75
Abbildung 30: zelluläre Signalkaskaden Akt1 und Erk1	76
Abbildung 31: Western Blots	77
Abbildung 32: MAP-Kinase und Proteinkinase B Signalweg	78

Abbildung 33: Heatmap zur Übersicht der Genexpression im Peritoneum.....	79
Abbildung 34: Genexpression TNF α und IL6	80
Abbildung 35: Genexpression von CXCL1 und CXCL2 im Peritoneum.....	81
Abbildung 36: Genexpression von Fraktalkin und CX3CR1 im Peritoneum.....	82
Abbildung 37: Genexpression von CCR2 und CCL2 im Peritoneum.....	83

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursachen der primären und sekundären Peritonitis.....	15
Tabelle 2: Laser des FACS Canto II.....	34
Tabelle 3: Antikörper für die FACS-Analyse.....	34
Tabelle 4: Primer für die RT-qPCR mit Hybridisierungstemperatur	45
Tabelle 5: Antikörper ELISA	47
Tabelle 6: Primärantikörper Western Blot.....	51
Tabelle 7: Legende der Signifikanzen	52

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ADAM10/17	A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10/17 (dt.: Eine Disintegrin und Metalloproteinase Domäne-enthaltendes Protein 10/17)
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome (dt.: erworbenes Immunschwächesyndrom)
AK	Antikörper
AKT1	AKT Serin/Threonin Kinase 1
ANOVA	Analysis of variance (dt.: Varianzanalyse)
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL2	C-C Chemokin Ligand 2
CCR2	C-C Chemokin Rezeptor 2
cDNA	Complementary DNA (dt.: Komplementäre DNA)
CX3CL1	CX3C Chemokin Ligand 1/Fraktalkin
CX3CR1	CX3C Chemokin Rezeptor 1
CXCL1	C-X-C-Motiv Chemokin Ligand 1
CXCL2	C-X-C-Motiv Chemokin Ligand 2
CXCR2	C-X-C Motiv Chemokinrezeptor 2
DIC	Disseminated intravascular coagulation (dt.: Disseminierte intravasale Koagulopathie)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (dt.: extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1/2)
FACS	Fluorescence-activated cell sorter (dt.: Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat

Abkürzung	Erklärung
FKN	Fraktalkin
FSC	Forward scatter (dt.: Vorwärtsstreuung)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3 Phosphat Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor (dt.: Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor)
h	Hour (dt.: Stunde)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Horseradish Peroxidase (dt.: Meerrettich Peroxidase)
HSV1	Herpes-simplex-Virus 1
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1/2	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1/2
IgG	Immunglobulin G
IL6	Interleukin 6
IL8	Interleukin 8
kDa	Kilodalton
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1 (dt.: Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen 1)
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6G	Lymphozyten Antigen 6 Komplex, Lokus G
Mac-1	Makrophage 1-Antigen
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase (dt.: Mitogen-aktivierte Protein-Kinase)
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MPO	Myeloperoxidase
NETs	Neutrophil extracellular traps (dt.: Neutrophile extrazelluläre Fallen)

Abkürzung	Erklärung
NFW	Nuklease freies Wasser
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NTC	Non template control/negative Kontrolle
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS ⁻	Phosphat- gepufferte Salzlösung (ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	PE-Cyanin 7
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pg	Pikogramm
PKB	Protein Kinase B
PL	Peritoneallavage
PLT	Plättchen/Thrombozyt
PMN	Polymorphonuclear neutrophil (dt.: Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt)
PNC	Platelet-neutrophil complex (dt.: Plättchen-Neutrophilen-Komplex)
PSGL1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species (dt.: reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Revolutions per minute (dt.: Umdrehung pro Minute)
RT-qPCR	Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion
SD	Standard deviation (dt.: Standardabweichung)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SEM	Standard error of the mean (dt.: Standardfehler des Mittelwerts)

Abkürzung	Erklärung
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome (dt.: system-inflammatorisches Antwortsyndrom)
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
spp.	Spezies
SSC	Side scatter (dt.: Seitwärtsstreuung)
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrose-Faktor α
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Peritonitis – das Krankheitsbild

Die Peritonitis stellt eine Entzündung des Peritoneums (*deutsch: Bauchfell*) dar, welche mit einer Hyperämie, interstitiellem Ödem und Infiltration von Leukozyten einhergeht. Sie kann akut oder chronisch verlaufen. Meistens ist die Peritonitis durch eine bakterielle Mischinfektion bedingt, die oft auf Grund einer Perforation im Bereich des Gastrointestinaltrakts in die Bauchhöhle gelangen [1]. Diese, mit 80 % häufigste auftretende Form, wird als sekundäre Peritonitis bezeichnet [2]. Im Gegensatz zur sekundären Peritonitis ist die seltenere primäre Peritonitis durch eine hämatogene, lymphogene oder transmurale Keiminvasion ohne direkt auslösende abdominelle Begleiterkrankung bedingt [2] (siehe Tabelle 1). Die spontane bakterielle Peritonitis als Beispiel einer primären Peritonitis bei Patienten mit Zirrhose-bedingter Aszites ist meistens durch *Escherichia coli*, seltener durch Streptokokken oder Staphylokokken, hervorgerufen [3]. Weiterhin kann zwischen einer lokalisierten Peritonitis wie z.B. eine durch das Omentum majus abgegrenzte akute Appendizitis, und einer generalisierten Peritonitis, beispielsweise im Rahmen einer Darmperforation, unterschieden werden [4].

Die primäre Peritonitis ist meistens eine monobakterielle Infektion und kann antibiotisch therapiert werden [1]. Die Therapie der sekundären Peritonitis besteht aus der chirurgischen Sanierung des Infektionsherdes sowie Spülung der Bauchhöhle mit antiseptischen Lösungen, einer antimikrobiellen Therapie und einer adäquaten intensivmedizinischen Intervention [5]. Kommt es trotz eingeleiteter Therapie zum Progress der Peritonitis, kann dies zu einer Sepsis führen.

Tabelle 1: Ursachen der primären und sekundären Peritonitis

(nach Lippert, H., Peritonitis, 2013) [2]

Primäre Peritonitis	
Ursache	Beispiel
Hämatogen	Streptokokkenperitonitis bei Kindern
Lymphogen	Bakterielle Peritonitis (Escherichia coli)
Aszension	Tuberkulose, Chlamydien
Ohne Keimnachweis	Peritonealkarzinose

Sekundäre Peritonitis	
Ursache	Beispiel
Perforation eines Hohlorgans	Appendizitis, Divertikulitis
Durchwanderung	Ileus, Mesenterialinfarkt
Postoperativ	Anastomoseninsuffizienz
Postinterventionell	Nach Endoskopie
Posttraumatisch	Nach Bauchtrauma
Retroperitonitis	Nekrotisierende Pankreatitis

1.2 Die Sepsis

1.2.1 Definition

Die Sepsis wird definiert als „akut lebensbedrohliche Organdysfunktion hervorgerufen durch eine inadäquate Wirtsantwort auf Infektionen“ [6]. Hierbei handelt es sich um eine systemische Entzündungsreaktion, die als SIRS (*engl.: systemic inflammatory response syndrome*) bezeichnet wird [7]. Diese geht einher mit einer Hyper- bzw. Hypothermie, einer Tachykardie und einer Tachypnoe [8]. Des Weiteren manifestiert sich im Blut eine Leukozytose bzw. im Verlauf auch eine Leukopenie, oder es lassen sich vermehrt unreife Granulozyten nachweisen [8]. Zunehmend steht bei der Diagnostik die Organdysfunktion im Vordergrund [9], welche durch den Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)-Score erfasst werden kann [10]. Hierbei werden die Nieren- und Leberfunktion, die Atmung, der Blutdruck, die Gerinnung und das

Zentrale Nervensystem nach einem Punkteschema bewertet [11]. Bei einer Änderung des SOFA-Scores von ≥ 2 Punkten wird von einer Sepsis-assoziierten Organdysfunktion ausgegangen [6]. Die Änderung des SOFA-Scores hat die höchste prognostische Genauigkeit in Bezug auf die Krankenhausmortalität im Vergleich mit dem quick SOFA-Score (qSOFA) und den SIRS-Kriterien [12]. Die SIRS-Kriterien sollen nicht mehr zur Definition der Sepsis herangezogen werden [6], da die Sensitivität und Spezifität inadäquat sind [13, 14]. Des Weiteren musste kein Erreger für die Definition des SIRS nachgewiesen werden [7]. Der qSOFA-Score erfasst die Atemfrequenz, das Bewusstsein sowie den systolischen Blutdruck und soll bei nicht-intensivmedizinisch betreuten Patienten mit Verdacht auf einer Infektion regelmäßig erhoben werden, um eine vitale Bedrohung frühzeitig zu detektieren [6].

1.2.2 Pathogenese

Bakterielle Bestandteile, wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) der Zellwand, aktivieren als sogenannte PAMPs (*engl.: pathogen-associated molecular patterns*) über Toll-like Rezeptoren (TLR) die Zellen der angeborenen Immunabwehr, woraus eine Zytokinfreisetzung resultiert, die die Immunantwort vermittelt [15, 16]. Aber auch Pilzbestandteile wie zum Beispiel Zymosan, ein Zellwandprotein von Hefepilzen, werden über den TLR2 erkannt und führen zu einer Aktivierung [17, 18]. Zytokine, wie zum Beispiel Interleukin 6 und Tumornekrose-Faktor α sind Peptide, die von Zellen der Immunabwehr sezerniert werden. Außerdem kann eine Aktivierung der TLR über endogene DAMPs (*engl.: damage-associated molecular patterns*) zum Beispiel durch Bestandteile nekrotischer Zellen zu einer sterilen Entzündung führen und die Zytokin- und Chemokinfreisetzung triggern [19]. Bei der Sepsis kommt es zur Dysregulation dieser Zytokinfreisetzung, sodass übermäßig Zytokine sezerniert werden, was zur Bezeichnung „Zytokinsturm“ in der Literatur geführt hat [20]. In der Sepsis-Definition wird es als „inadäquate Wirtsantwort“ betitelt [21]. Die Expression des Gewebefaktors (*engl.: tissue factor*) auf Endothelzellen und Leukozyten wird durch die Zytokine verstärkt, woraus eine gesteigerte Thrombin-Bildung resultiert [22]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die physiologische

Antikoagulation unter anderem durch Antithrombin III im Rahmen der Infektion beeinträchtigt ist [23] und die Fibrinolyse gehemmt wird [24]. Letztlich führt die gesteigerte Gerinnung zu einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (*engl.: disseminated intravascular coagulation; DIC*), wobei die Fibrinablagerungen zu einer Ischämie in den Organen führen. Die Minderperfusion der Organe bedingt schließlich das Multiorganversagen.

Ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr ist das Komplementsystem, welches Pathogene erkennt und zu einer Aktivierungskaskade der Komplementfaktoren führt. Letztlich bewirken die Komplementfaktoren eine Opsonierung der Pathogene zur Phagozytose und triggern die lokale Entzündungsreaktion [25] unter anderem durch Stimulation von Mastzellen zur Histaminfreisetzung [26]. Diese lokale Entzündungsreaktion führt zur Endothelschädigung, was ein kapilläres Leck mit Austritt von Plasma aus den Gefäßen in das umliegende Gewebe sowie Kardiomyopathien bedingt [27].

Des Weiteren bewirkt die Aktivierung und die gesteigerte Migration der neutrophilen Granulozyten auf Grund einer erhöhten Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen eine Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (*engl.: reactive oxygen species, ROS*), die ebenfalls die Endothelschädigung und Gewebsschädigung in den Organen triggern [28]. Hierdurch wird eine Kreislaufdysregulation gefördert, die sich in einem Kreislaufchock manifestieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass in den ersten 6 Stunden bei einem septischen Schock nach Manifestation einer Hypotonie jede Stunde der Therapieverzögerung mit einer Abnahme des Überlebens um 7,6 % einhergeht [29].

Neben der Synthese von ROS bilden neutrophile Granulozyten sogenannte neutrophile extrazelluläre Fallen (*engl.: neutrophil extracellular traps, kurz: NETs; siehe Abbildung 1*). Diese bestehen überwiegend aus DNA und können ihre antimikrobielle, extrazelluläre Wirkung gegen Pathogene unter anderem über Granulae entfalten [30-32]. Über verschiedene Mechanismen wie zum Beispiel

direkte Zellschädigung und Gefäßverschlüssen können NETs Organe schädigen [33]. Bei septischen Patienten konnte gezeigt werden, dass die NETs-Konzentration quantifiziert durch die freie zirkulierende DNA (*engl.: circulating free DNA*, cf-DNA) im Blutserum mit dem Organversagen korreliert, welches durch den SOFA-Score gemessen wurde [34].

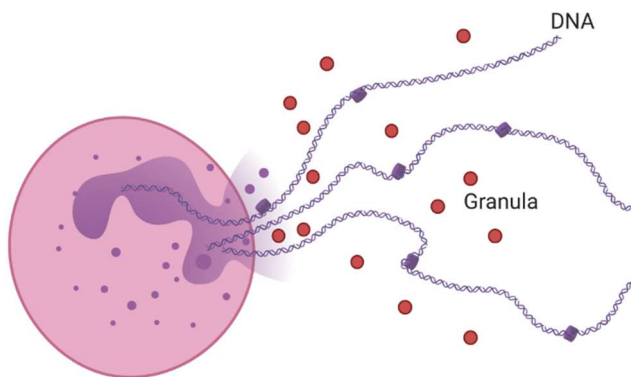


Abbildung 1: Bildung von NETs

Aktivierter Neutrophiler Granulozyt der Neutrophil Extracellular Traps (NETs) aus DNA ausbildet und Granulae freisetzt.

(Eigene Abbildung erstellt mit BioRender.com)

Die oben beschriebenen Pathomechanismen bedingen multiple Organschädigungen bei septischen Patienten, insbesondere von Lunge [35], Niere [36], Herz [37] und Leber [38]. Diese werden durch eine Sepsis-induzierte mitochondriale Dysfunktion, einhergehend mit verminderter Adenosin-triphosphat (ATP)-Synthese, verstärkt [39]. Es konnte gezeigt werden, dass die ATP-Konzentration im Muskelgewebe mit der Mortalität korreliert [40]. Letztlich konnte eine Korrelation zwischen der Organdysfunktion, angezeigt durch den SOFA-Score, und der Mortalität nachgewiesen werden [41].

1.2.3 Erregerspektrum und antiinfektive Therapie

Das Erregerspektrum der nosokomialen Sepsis umfasst gram-negative Bakterien (57,6 %), insbesondere *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp. und *Pseudomonas* spp., sowie gram-positive Bakterien (33,4 %) und Pilze (7,4 %) [42]. Bei der neonatalen early-onset Sepsis sind *Escherichia coli* (23 %) und Streptokokken der Gruppe B (38 %) von wesentlicher Bedeutung [43]. Es konnte gezeigt werden, dass die Mortalität abhängig vom Erreger ist, sodass beispielsweise eine Infektion mit *Pseudomonas* spp. oder *Candida albicans* mit einer erhöhten

Mortalität assoziiert ist [44]. Die intravenöse antiinfektive Therapie sollte möglichst zeitnah nach der Diagnosestellung erfolgen, da eine Therapieverzögerung mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist [45]. Diese sollte initial empirisch mit Breitspektrum-Antibiotika erfolgen. Adaptiert an das individuelle Risikoprofil des Patienten, sollte eine antimykotische sowie antivirale Therapie ergänzt werden und bei Erregernachweis in eine kalkulierte Therapie übergegangen werden [6]. Bei unbekanntem Erreger und unbekanntem Infektionsherd wird bei der nosokomialen Sepsis eine Kombination aus Piperacillin/Tazobactam mit Ciprofloxacin, Levofloxacin oder Fosfomycin empfohlen [1]. Die ambulant erworbene Sepsis bei unbekanntem Infektionsherd sollte mit Cephalosporinen in Kombination mit Ciprofloxacin oder Levofloxacin therapiert werden [1].

1.2.4 Adjuvante Therapie

Die Therapie der Sepsis umfasst neben der Sanierung des Infektfokus, supportive Maßnahmen wie die hämodynamische Stabilisierung des Kreislaufs und einer adäquaten Sauerstoffgabe bei respiratorischer Insuffizienz [6]. Die initiale Flüssigkeitstherapie mit balancierten kristalloiden Lösungen erfolgt zum Ausgleich der Hypoperfusion bis zum Erreichen einer Euvolämie [6]. Im weiteren Verlauf sollte eine restriktive Flüssigkeitssubstitution angestrebt werden, da eine positive Flüssigkeitsbilanz mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist [46]. Viele weitere adjuvante Therapien, z.B. eine Gabe von Hydrokortison [47], Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (*engl.: granulocyte-colony stimulating factor, kurz: G-CSF*) [48] oder eine intensivierete Insulintherapie [49], wurden in klinischen Studien evaluiert und zeigten keine Reduktion der Mortalität. Ein wichtiger Faktor der initialen Therapie ist der zeitnahe Beginn einer zielgerichteten Therapie mit erweitertem hämodynamischen Monitoring, da hierdurch die Mortalität signifikant gesenkt werden kann [50]. Bis heute gibt es keine kausale Therapie der dysregulierten Zytokinfreisetzung.

1.3 Epidemiologie

Aus der Gesundheitsberichtserstattung des Statistischen Bundesamtes geht hervor, dass im Jahr 2017 in Deutschland in ca. 280.000 Fällen eine Sepsis diagnostiziert wurde [51]. Die Inzidenz ist in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegen, was auf den demographischen Wandel und die zunehmende Versorgung von Risikopatienten mit Hochleistungsmedizin zu erklären ist [52]. Die Letalität der Sepsis wird mit ca. 20-30 % beziffert [53], wohingegen die Letalität beim septischen Schock bei fast 50 % liegt [54]. Die 30-Tage-Sterblichkeit bei einer Sepsis wurde in einer Metaanalyse von Bauer et al. in Deutschland mit 26,50% beziffert, wobei jedoch eine große Heterogenität vorlag [55]. In einer retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass ca. 11 % der Patienten mit einer Peritonitis eine schwere Sepsis entwickelt haben, die zu 20 % mit Multiorganversagen einherging [56]. Weltweit wird die Zahl der Sepsisfälle auf insgesamt über 30 Millionen pro Jahr geschätzt und es wird mit 5,3 Millionen letalen Sepsisverläufen jährlich gerechnet [53].

Ebenfalls im Jahr 2017 wurden ca. 77.500 Peritonitisfälle in der deutschen Krankenhausstatistik registriert, wobei jedoch 72 % der Fälle eine akute Appendizitis mit lokalisierter Peritonitis darstellten [51]. Zuverlässige Daten für die globale Peritonitis-Inzidenz lassen sich nicht finden. Die Mortalität der akuten bakteriellen Peritonitis ist stark von der Verfügbarkeit medizinischer Ressourcen abhängig, sodass beispielsweise die Mortalitätsrate der Appendizitis bei Kindern in reichen Ländern bei 0,04 % liegt und diese vergleichend dazu in Nigeria auf 0,9 % beziffert wird [57]. In einer deutschen retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass das 120-Tage-Überleben bei der sekundären Peritonitis im Beobachtungszeitraum 2002 bis 2005 höher war als in den Jahren 1993 bis 2002 [58].

Die aufgezeigten epidemiologischen Daten zeigen die Relevanz, sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität von Sepsis und Peritonitis zu senken. Daher ist es von großer Notwendigkeit, mit weitergehenden Forschungen in diesem Bereich das Verständnis über den Pathomechanismus zu vertiefen. Die

Forschung gestaltet sich auf Grund der oben aufgezeigten multifaktoriellen Genese und Heterogenität des Krankheitsbildes als langwierig und komplex.

1.4 Vermittlung der Immunreaktion - Zytokine

Entzündungsreaktionen werden durch Zytokine vermittelt. Wie bereits zuvor erwähnt, kommt es bei der Sepsis zur Dysregulation der Zytokinfreisetzung. Beispiele für wichtige Zytokine der Akuten Phase Reaktion der Entzündung sind der Tumornekrose Faktor α (TNF α) und das Interleukin 6 (IL6) [59].

TNF α wird überwiegend von Monozyten, residenten Makrophagen sowie T- und B-Lymphozyten gebildet [60]. Bei Entzündungsreaktionen fördert TNF α unter anderem die Chemotaxis, Proliferation und Migration von neutrophilen Granulozyten [61].

IL6 wird sowohl von Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen als auch von vielen weiteren Zellen synthetisiert [62]. Die Funktion des IL6 ist sehr vielfältig und reicht von der Aktivierung von B-Zellen bis hin zur Induktion der Akuten Phase Reaktion [63]. Es trägt dazu bei, dass aus einer lokalen Reaktion eine systemische Reaktion resultiert [62].

1.5 Chemotaxis

Die Leukozyten werden im Knochenmark gebildet und müssen zum Ort des Infektfokusses dirigiert werden. Dieser Vorgang wird als Chemotaxis bezeichnet und von Chemokinen vermittelt. Chemokine sind Proteine, die im Rahmen der Immunabwehr verschiedene Aufgaben übernehmen: Sie aktivieren Leukozyten, modulieren die Expression von Oberflächenproteinen, leiten Zellen zum Ort der Inflammation und haben noch viele weitere Aufgabe [64].

Zwei relevante Chemokine der murinen Chemotaxis sind der C-X-C Motiv Chemokin Ligand 1 (CXCL1) und der C-X-C Motiv Chemokin Ligand 2 (CXCL2), welche beide über den C-X-C Motiv Chemokinrezeptor 2 (CXCR2) auf die PMNs wirken [65]. Der humane Ligand des CXCR2 ist das Interleukin 8 (IL8) [66]. In verschiedenen Versuchsreihen im Lungenmodell konnte der Effekt des CXCR2

Rezeptors auf die Migration der PMNs belegt werden: Ein Fehlen oder eine Blockade des Rezeptors führte zu einer reduzierten Migration und zu einer geringeren Gewebsschädigung [67]. IL8, CXCL1 und CXCL2 haben großen Einfluss auf die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten [68]. TNF α und IL6 stimulieren die Freisetzung von IL8 beim Menschen [69]. Weiterhin wird die Bildung von CXCL1 [70] und CXCL2 [71] durch TNF α induziert.

1.6 Leukozytenmigration – Selektine und Integrine

Im Rahmen einer Entzündung kommt es zur Vasodilatation der Gefäße [72]. Diese bedingt eine Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes, sodass Leukozyten mit dem Gefäßendothel interagieren können. Durch Migration gelangen die Leukozyten aus dem Gefäß zum Ort der Infektion [73].

Die Leukozytenmigration lässt sich in verschiedene Phasen unterteilen: Zuerst kommt es zur Selektin-vermittelten Adhäsion zwischen neutrophilen Granulozyten und dem Endothel (Abbildung 2: A) [74]. Diese Interaktion wird im englischen als „tethering“ (*deutsch: anbinden*) bezeichnet. E-Selektin (CD62E) befindet sich auf den Endothelzellen, P-Selektin (CD62P) lässt sich auf den Thrombozyten und Endothelzellen nachweisen und das L-Selektin (CD62L) wird auf der Zelloberfläche von Leukozyten exprimiert [75]. Das P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL1; CD162) befindet sich auf Leukozyten und interagiert mit dem P-Selektin der Endothelzellen, was einen wichtigen Faktor für die Leukozytenmigration darstellt [76]. Hieraus resultiert ein Rollen (*engl.: Rolling*) der Zellen entlang des Endothels (Abbildung 2: B) [74]. Die Bindung wird durch Integrine verstärkt (Abbildung 2: C) [77], sodass letztlich der Leukozyt durch das Endothel und zwischen den Perizyten nach extravasal treten kann [78]. Dieser Durchtritt wird als Diapedese bezeichnet (Abbildung 2: D).

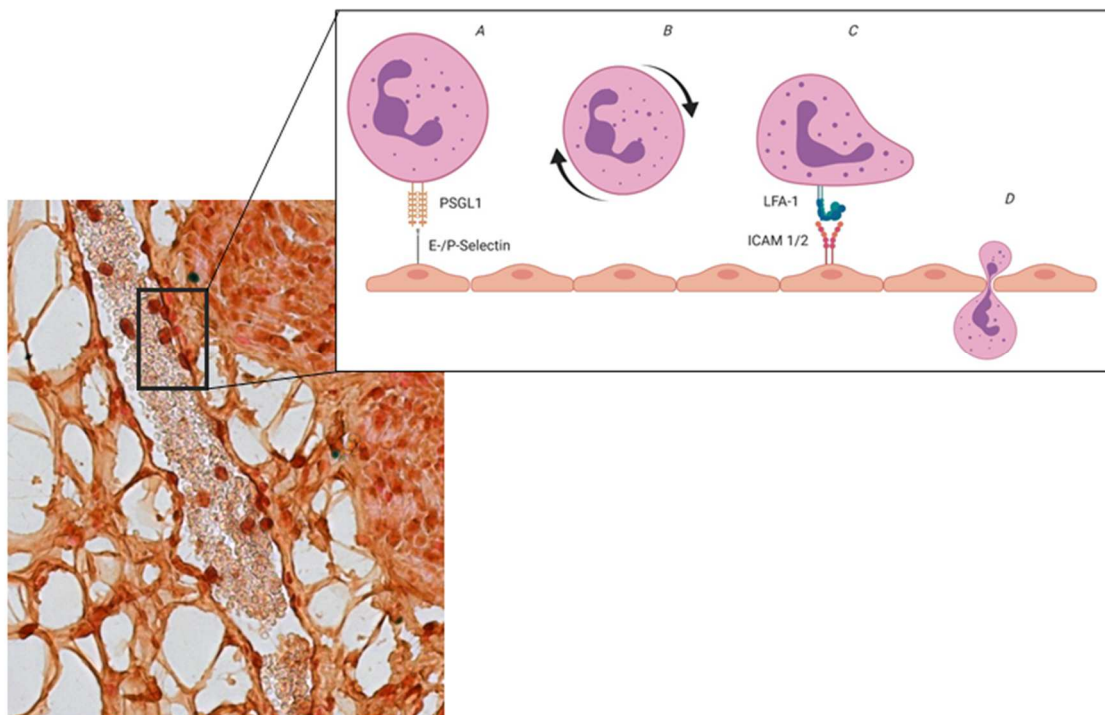


Abbildung 2: Leukozytenmigration

Mikroskopische Aufnahme eines murinen, inflammatorisch veränderten Peritoneums mit Gefäßanschnitt und migrierenden Leukozyten. Vereinfachte Darstellung der Leukozytenmigration: Die Selektin-vermittelte Adhäsion der Leukozyten an das Endothel vermittelt durch Interaktion von P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL1) und E-/P-Selektin (A) führt zum Rollen der Zellen entlang des Endothels (B). Das Integrin Leukozytenfunktions-assoziierte Antigen (LFA-1) interagiert mit den Integrinen interzellulären Adhäsionsmolekülen 1 und 2 (ICAM1/2) des Endothels und verstärkt die Bindung des Leukozyten an das Endothel (C). Es kommt zur Diapedese (D) aus dem Gefäß zum Ort der Inflammation. (Eigene Aufnahme, schematische Abbildung erstellt mit BioRender.com)

Das Lymphozytenfunktion-assoziierte Antigen (*engl.: lymphocyte function-associated antigen; LFA-1*), ein Integrin ($\alpha_L\beta_2$; CD11a/CD18) auf den PMNs, hat durch seine Interaktion mit den interzellulären Adhäsionsmolekülen 1 und 2 (ICAM-1/2) des Endothels einen wesentlichen Einfluss auf die Adhäsion (Abbildung 2: C) [79]. Im Rahmen von Entzündungsprozessen kommt es zur Hochregulation von L-Selektin und β_2 -Integrin auf den PMNs, wodurch eine verstärkte Migration ermöglicht wird [80].

Chemokine haben neben der Chemotaxis weiterhin einen modulatorischen Einfluss auf die Expression von Integrinen und Selektinen, sodass die

leukozytäre Migration beeinflusst wird [81]. Zum Beispiel wird die Expression von P-Selektin auf der Zelloberfläche der Thrombozyten durch Fraktalkin gesteigert und die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen und Kollagen verstärkt [82].

1.7 Plättchen-Neutrophilen-Komplexe

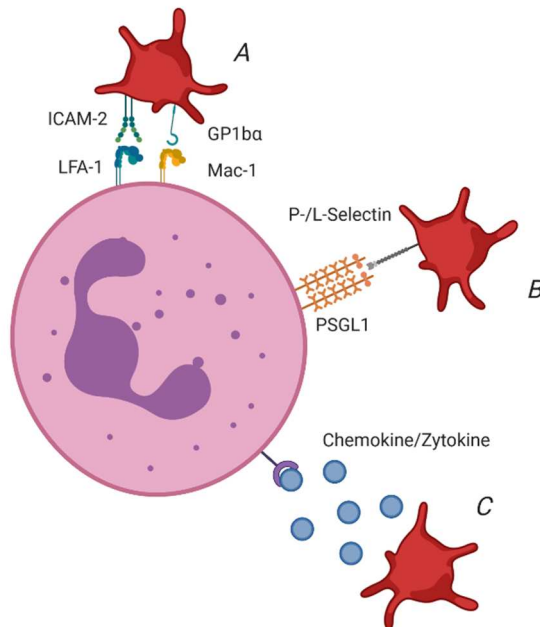


Abbildung 3: Plättchen-Neutrophilen-Komplex

Interaktion zwischen PMN und Thrombozyt direkt über Oberflächenproteine und indirekt über Zytokine

- A. PNC Bildung über Integrine: Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen 1 (LFA-1) mit interzellulärem Adhäsionsmolekül 2 (ICAM-2) und Makrophagen 1-Antigen (Mac-1) mit Glykoprotein 1bα (GP1bα)
- B. PNC Bildung über Selektine: Interaktion zwischen P-/L-Selektin und dem P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL1)
- C. Aktivierung des PMN über Zytokine und Chemokine des Thrombozyten

(Eigene Abbildung erstellt mit BioRender.com)

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Leukozytenmigration ist die Interaktion von Thrombozyten und PMNs. Durch diese Interaktion bilden sich Plättchen-Neutrophilen-Komplexe (*engl.: platelet-neutrophil-complex; PNC*). Das P-Selektin der Thrombozyten interagiert hierbei mit dem PSGL1 der PMNs (Abbildung 3: B) [83]. Weiterhin konnte eine Interaktion zwischen L-Selektin und PSGL1 nachgewiesen werden [84]. Die Rekrutierung von PMNs in Abhängigkeit zur P-Selektin Expression konnte bei verschiedenen Entzündungsentitäten wie z.B. der akuten Pankreatitis [85], der Glomerulonephritis [86] und bei weiteren Erkrankungen [87] beobachtet werden. Im murinen Zymosan-induzierten Peritonitis Modell sowie im murinen Lipopolysaccharid (LPS)-Lungen Modell konnte gezeigt werden, dass besonders die Blockade von PSGL1 und L-Selektin eine signifikante Abnahme der migrierten PMNs bedingt, wohingegen die Blockade von P-Selektin keinen Effekt hatte und die Gabe von Antikörpern gegen

E-Selektin nur im pulmonalem Inflammationsmodell einen signifikanten Unterschied zeigte [88].

Weiterhin wird die Interaktion zwischen Thrombozyten und PMNs über Integrine vermittelt. Die Heterodimere LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18), die beide das β_2 -Integrine (CD18) enthalten, konnten auf PMNs nachgewiesen und eine vermehrte Expression von Mac-1 bei Stimulation detektiert werden [89]. Das Integrin ICAM-2 wird auf Thrombozyten exprimiert und interagiert mit dem LFA-1 [90]. Des Weiteren konnte eine Interaktion zwischen Glykoprotein Iba (GP Iba) und Mac-1 gezeigt werden (Abbildung 3: A), was eine zweite Integrinbestimmte Interaktion zwischen Thrombozyten und PMNs darstellt [91].

Ein weiterer, wichtiger Punkt der Leukozytenmigration ist die Interaktion des PNC mit dem Endothel. Einerseits interagieren Thrombozyten mit dem Endothel über PSGL1 mit P-Selektin, GP Iba mit dem von-Willebrand-Faktor (vWF) bzw. P-Selektin oder Glykoprotein IIa/IIIb mit ICAM-1-Fibrin. Andererseits können PMNs über LFA-1 und Mac-1 mit ICAM-1 und ICAM-2 auf den Endothelzellen interagieren [87]. Weiterhin konnte im Lungenentzündungsmodell und im Peritonitismodell gezeigt werden, dass thrombozytopenische Mäuse eine signifikant reduzierte PMN Rekrutierung aufweisen [88], was die Bedeutung der PNC Bildung hinsichtlich der PMN Migration unterstreicht.

Neben der Migration konnten in in-vitro-Versuchen gezeigt werden, dass PNCs die Fähigkeit der Phagozytose aufweisen [92]. Ferner konnte die Thrombozytenabhängige Aktivierung der PMNs bewiesen werden [88]. Der Thrombozyt als Teil des PNC setzt im aktivierten Zustand weitere Chemokine und proinflammatorische Zytokine wie zum Beispiel IL8 frei, die regulierend auf die PMN Aktivität sowie die Leukozytenadhäsion wirken (Abbildung 2: C) [93]. Letztlich interagieren Thrombozyten und PMNs direkt über Oberflächenproteine als auch indirekt über Zytokine.

1.8 CX3CR1 und Fraktalkin

Im Jahr 1997 stellte eine Arbeitsgruppe im Journal „Nature“ eine neu entdeckte Chemokinklasse vor, welche durch ihre CX3C Aminosäuresequenz charakterisiert wird [94]. CX3C bedeutet, dass sich zwischen den charakteristischen Cysteinen drei andere Aminosäuren befinden. Fraktalkin (CX3CL1) gehört zu dieser Chemokinklasse und ist der einzige bekannte Ligand des CX3CR1-Rezeptors, der einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembran-Domänen darstellt [95]. Die Expression des Rezeptors ist sehr vielfältig, man findet ihn auf Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen [96], NK-Zellen und CD8⁺-T-Zellen [97] sowie auf Mikroglia [98]. Des Weiteren wurde CX3CR1 auf Thrombozyten nachgewiesen [82]. Es konnte bei Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose eine erhöhte CX3CR1-Expression auf Thrombozyten detektiert werden, die mit gleichzeitiger Erhöhung der Fraktalkin Plasmakonzentration einherging [99].

Eine Hochregulation des CX3CR1 Rezeptors konnte unter anderem bei Patienten mit metabolischem Syndrom [100], Hyperlipidämie [101] und Herzinsuffizienz [102] gezeigt werden. Im Mausmodell konnte bei Angiotensin II-induzierter Hypertonie bei CX3CR1^{-/-} Mäusen eine erhöhte Zahl an interstitiellen neutrophilen Granulozyten in der Niere detektiert, sowie eine signifikant gesteigerte Albuminurie als Zeichen der Nierenschädigung nachgewiesen werden [103]. Weiterhin wurden signifikant erhöhte Mortalitätsraten bei CX3CR1^{-/-} Mäusen im Rahmen einer Herpes-simplex-Virus 1 (HSV1) Enzephalitis beschrieben [104]. Bei Patienten, die eine Sepsis überlebten, konnten im Vergleich zu Patienten, die an der Sepsis verstorben sind, signifikant höhere CX3CR1 Expressionen nachgewiesen werden [105]. Im Gegensatz hierzu konnten bei septischen Mäusen eine reduzierte CX3CR1 Genexpression bei gleichzeitiger gesteigerter Fraktalkin Genexpression in verschiedenen Organen gefunden werden [106]. Des Weiteren konnte bei CX3CR1^{-/-} Mäusen mit akuter Colitis eine reduzierte Neutrophilen Migration und eine verminderte Entzündungsreaktion gezeigt werden [107]. Zusammenfassend kann man

sagen, dass der inflammatorische Einfluss des CX3CR1 Rezeptors kontrovers diskutiert wird.

Bei Menschen wurden zwei relevante Polymorphismen, T280M und V249I, im CX3CR1 Rezeptor nachgewiesen, die unter anderem Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen und die Progression des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) bzw. des erworbenen Immunschwächesyndroms (*engl.: acquired immune deficiency syndrome, kurz: AIDS*) haben [108, 109].

Fraktalkin (CX3CL1) ist der Ligand des CX3CR1 Rezeptors. Es lässt sich auf Neuronen und Astrozyten nachweisen [98]. Darüber hinaus konnte Fraktalkin auf intestinalem Epithel und Endothel [110] sowie auf glatten Muskelzellen [111] gezeigt werden. Fraktalkin kommt neben der Membran-gebundenen Form auch in freier, gelöster Form vor [94]. Das Disintegrin- und Metalloproteinase-Domäne enthaltende Protein 10 (*engl.: a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10; ADAM10*) ist für die konstitutive Spaltung des gebundenen Fraktalkins in die freie Form verantwortlich [112]. Unter stimulierten Bedingungen wird die Spaltung durch ADAM17 (*syn.: tumor necrosis factor α converting enzyme; TACE*) vermittelt [113].

Die Leukozytenadhäsion wird durch die Interaktion von CX3CR1 und membrangebundenem Fraktalkin verstärkt [114, 115], wobei der CX3CR1 Rezeptor als Adhäsionsmolekül für das Fraktalkin fungiert und nicht der Signaltransduktion dient [116]. Längere Zeit galt die Annahme, dass Fraktalkin nur mit dem CX3CR1 Rezeptor interagiert. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass Fraktalkin direkt mit Integrinen, wie z.B. dem Integrin $\alpha_v\beta_3$, interagiert und so die Adhäsion gefördert wird [117]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Fraktalkin-CX3CR1 Interaktion einen positiven Effekt auf die Efferozytose, dem nicht-entzündlichem Abbau von apoptotischen Zellen durch Makrophagen, in der T-Zell Zone des Lymphknotens hat [118]. Bei der Ethanol-induzierten Hirnschädigung konnte eine verstärkte Freisetzung von Fraktalkin bei der Apoptose gemessen und gezeigt werden, dass Fraktalkin als „Find-me“-Signal an der Rekrutierung der Mikroglia beteiligt ist [119].

In weiteren Arbeiten konnten synergistische Effekte des C-C Chemokinligandes 2 (CCL2) bzw. C-C Chemokinrezeptors 2 (CCR2) und dem CX3CR1 aufgezeigt werden. Hierzu zählen beispielsweise inflammatorische Effekte bei fettreicher Ernährung [120] und eine additive Wirkung auf die Atherogenese bei Hypercholesterinämie [121].

Im Rahmen des T_{H2}-Zellen-dominierten allergischen Asthmas konnte im Mausmodell durch die Behandlung mit Anti-Fraktalkin- als auch mit Anti-CX3CR1-Antikörpern protektive Effekte gezeigt werden [122]. Auch bei der systemischen Sklerose konnten Erfolge einer Antikörper-Behandlung nachgewiesen werden [123].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Bedeutung der PNC Bildung für die Immunantwort durch diverse Vorarbeiten gezeigt wurde. Des Weiteren konnte der CX3CR1 Rezeptor sowie sein Ligand, das Fraktalkin, als wichtiger Bestandteil in Entzündungsprozessen und mögliche Zielstruktur für eine pharmakologische Behandlung identifiziert werden. Es stellt sich hier die Frage, inwieweit der CX3CR1 Rezeptor die PNC Bildung beeinflusst und welche Auswirkung das auf die PMN Migration hat. Weiterhin zeigen die epidemiologischen Daten, die fehlende kausale Therapie der Peritonitis und der Peritonitis-bedingten Sepsis die Relevanz der Thematik. Hieraus lässt sich folgende Themenstellung der Dissertation ableiten:

*„Der Einfluss des CX3CR1-Rezeptors auf die
Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen im Rahmen der Peritonitis
und Peritonitis-bedingten Sepsis“.*

2 Methoden

2.1 Überblick

Der Einfluss des CX3CR1 Rezeptors auf die PNC Bildung im Rahmen der akuten Peritonitis sowie der Peritonitis-bedingten Sepsis wurde mittels eines murinen Peritonitis-induzierten Inflammationsansatzes auf unterschiedlichen Ebenen beleuchtet. Einerseits wurden neutrophile Granulozyten, Thrombozyten und Plättchen-Neutrophilen-Komplexe aus Peritoneallavage und Blut mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Andererseits wurde die Genexpression im Peritoneum durch die quantitative real-time Polymerasekettenreaktion untersucht. Eine stattgefundene Chemokinfreisetzung im Rahmen der Entzündung wurde mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) in der Peritoneallavage und im Plasma detektiert. Relevante intrazelluläre Signalkaskaden wurden durch Protein-Detektion im Western Blot nachgewiesen. Immunhistochemische Färbungen visualisierten die Zellverteilung im Peritoneum (Abbildung 4).

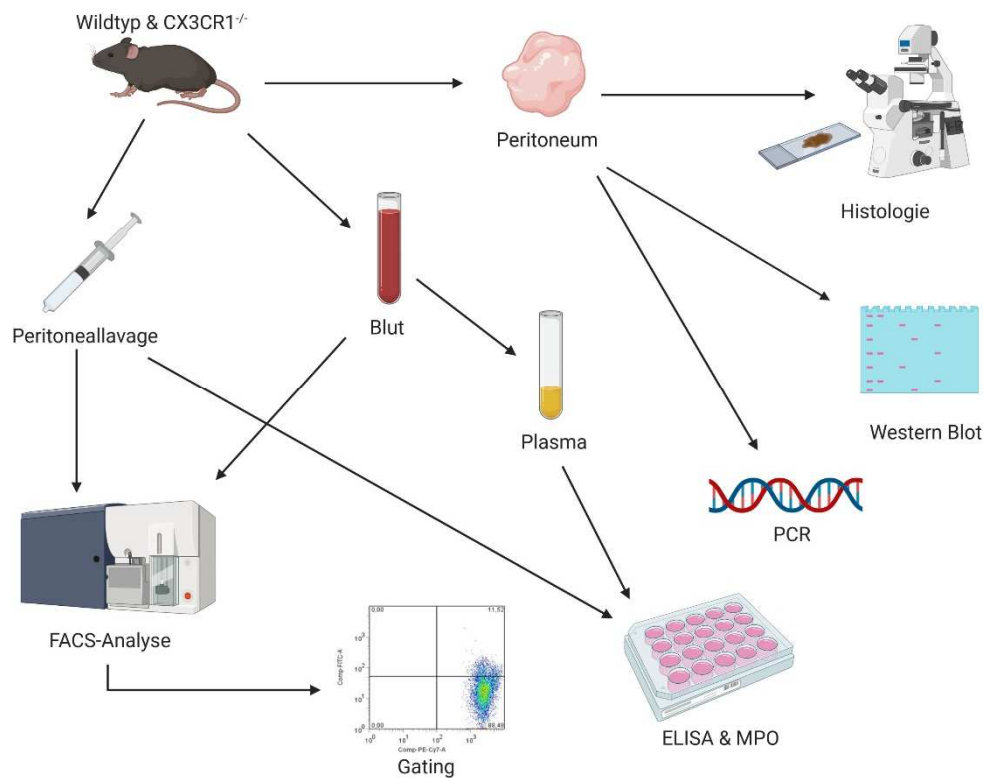


Abbildung 4: Übersicht Methodik

Verwendung des entnommenen Peritoneums für histologische Färbungen, Proteindetektion mittels Western Blots und Detektion der Genexpression mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR). Das Blut und die Peritoneallavage wurden für die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) sowie den Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) und die Myeloperoxidase (MPO) Aktivitätsbestimmungen verwendet. (Eigene Darstellung erstellt mit BioRender.com)

2.2 Peritonitis in-vivo Versuch

Für den Peritonitisversuch wurden Wildtyp Mäuse (WT Mäuse) und Mäuse mit einem homozygotem GFP (green fluorescent protein)-Genknockout des CX3CR1 Gens (CX3CR1^{GFP}) von Jackson Laboratories (B6 129P-CX3CR1tm1Litt/J) verwendet. Als WT Mäuse wurden C57BL/6J von Charles River Laboratories genutzt. Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte beim Regierungspräsidium Tübingen unter dem Aktenzeichen A07/18G.

2.2.1 Stimulation und Behandlung

Die Stimulation der Peritonitis erfolgte durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 1 mg Zymosan A von *Saccharomyces cerevisiae* (Z4250, Sigma) gelöst in 1 ml NaCl-Lösung (0,9%). Die Inkubation erfolgte über 4 und 8 Stunden. Es erfolgten Kontrollen ohne Stimulation.

2.2.2 Operation

Für die Operation wurden die Mäuse durch eine gewichtsadaptierte i.p. Injektion mit Ketaminhydrochlorid (Ketamin-hameln 50 mg/ml) und Xylazin (Sedaxylan 20 mg/ml) narkotisiert. Über einen kleinen, medianen Hautschnitt wurden i.p. 5 ml Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (PBS⁻) für die Peritoneallavage injiziert. Im Anschluss wurde das Peritoneum präpariert und die Lavage im rechten lateralen Abdomen entnommen. Für die Gewebeanalysen wurde ein Stück des rechten Peritoneums asserviert. Nach erfolgter Thorakotomie wurden aus dem rechten Herzventrikel ca. 500 µl Blut entnommen und der Kreislauf nach Durchtrennung der Aorta abdominalis und der Vena cava inferior durch die Injektion von 3 ml PBS⁻ in den rechten Ventrikel gespült.

2.2.3 Peritoneallavage und Blut

Die entnommene Peritoneallavage (PL) wurde bei 1300 rpm für 10 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert und zwei 1,5 ml Überstände für ELISA und Proteinassays aliquotiert. Das Zellpellet wurde mit 1,0 ml Färbepuffer resuspendiert und die Leukozytenzahl lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

Bei der Blutprobe wurde die Zellzahl lichtmikroskopisch bestimmt. Das Plasma wurde, nach Abnahme von zweimal 25 µl für die durchflusszytometrische Analyse, abzentrifugiert und abpipettiert.

Die peritonealen Gewebeproben wurden in Kryoröhrchen für die quantitative real-time Polymerasekettenreaktion und die Proteinbestimmung bei -80 °C asserviert.

2.2.4 Vorbereitung der Proben für die FACS-Analyse

Die Zellen aus der Peritoneallavage und dem Blut wurden mit der Durchflusszytometrie (siehe Absatz 2.3) analysiert. Hierzu wurden aus den verwendeten Antikörpern (siehe Tabelle 3) Kombinationen zur Zellidentifizierung und zur Messung der Oberflächenproteinexpression zusammengestellt. In jedes FACS-Röhrchen werden 50 µl des Antikörper-Mixes und 100 µl der Zellsuspension für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert und im Anschluss zweimal mit Färbepuffer gewaschen. Bei den Blutproben wurden 25 µl Blut mit 50 µl Antikörpermix für 15 Minuten inkubiert und darauffolgend mit einem Milliliter Erythrozytenlyse für weitere 15 Minuten inkubiert und abschließend ebenfalls mit Färbepuffer gewaschen. Die Zellen wurden mit 400 µl Zell-Fixierlösung fixiert und lichtgeschützt bei 4 °C bis zur Analyse gelagert. Diese erfolgte innerhalb von 24 Stunden.

2.3 Durchflusszytometrie

2.3.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine Identifikation von Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und Zelloberflächenbeschaffenheit und wird mit einem FACS Gerät (*engl.: fluorescence-activated cell sorter*) durchgeführt. Die Zellen in der Probe liegen als Gemisch vor und werden in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl durch eine Mikrokanalküvette und eine Düse geleitet, wobei kleine Tröpfchen mit den Zellen entstehen, welche dann durch einen Laserstrahl geleitet werden [vgl. 79]. Ein wesentlicher Vorteil der Durchflusszytometrie besteht in der Möglichkeit, innerhalb von kurzer Zeit eine große Zahl von Zellen nacheinander untersuchen zu können.

Bei der Durchflusszytometrie werden 2 Signale gemessen: Zum einen wird die Intensität des unter kleinen Winkeln gestreuten Lichtes (Vorwärtsstreuung, *engl.: forward scattering*; FSC) detektiert. Außerdem wird gleichzeitig die Intensität des unter großen Winkeln gestreuten Lichtes (seitliche Streuung, *engl.: side scattering*; SSC) erfasst. Die FSC spiegelt die Größe der Zelle wider, wohingegen die SSC durch die Granularität einer Zelle geprägt wird (Abbildung 5: A). Bei der

Auftragung der FSC gegen die SSC im Dot-Plot-Diagramm lassen sich hier bereits Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten als Zellpopulation voneinander abgrenzen (Abbildung 5: B).

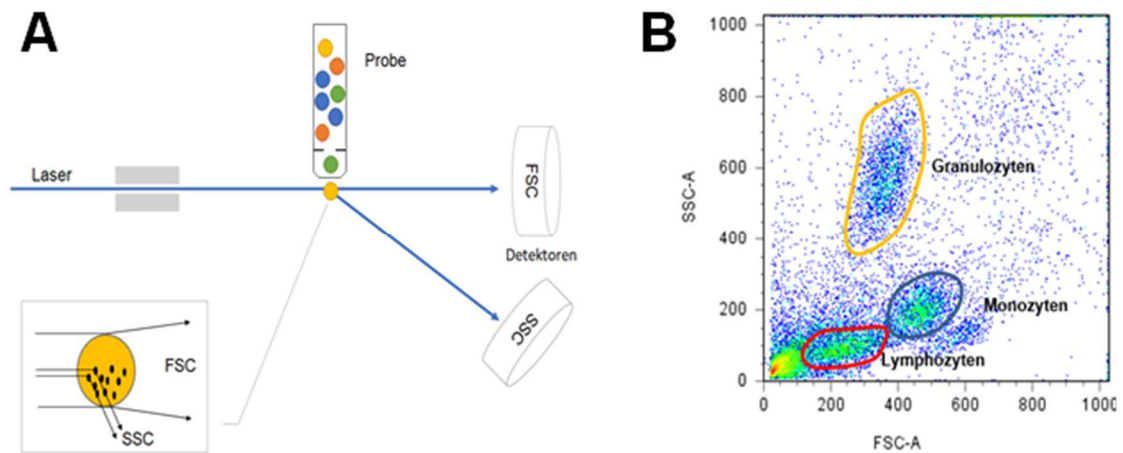


Abbildung 5: Prinzip der Durchflusszytometrie

Darstellung des Prinzips der Durchflusszytometrie. **A** Seitliche Streuung (SSC) und Vorwärtstreuung (FSC) bedingt durch Größe und Granularität der Zelle. **B** Identifikation der Zellpopulationen im SSC-FSC-Dot Plot. Markierung der Granulozyten (gelb), Lymphozyten (rot) und Monozyten (blau). (Eigene Darstellung)

Um eine weitere Differenzierung der Zellen zu ermöglichen, wurden Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte monoklonale Antikörper (Tabelle 3) zur Probe gegeben. Diese binden spezifisch an Proteine auf der Zelloberfläche und markieren so verschiedene Zellarten unterschiedlich. Zum Beispiel wurden Antikörper gegen CD42b, welche mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) konjugiert sind, als spezifischer Marker für Thrombozyten verwendet.

2.3.2 Material

Als FACS Gerät wurde das FACS CANTO II von BD Bioscience verwendet, welches mit 3 Lasern (Tabelle 2) ausgestattet ist:

Tabelle 2: Laser des FACS Canto II

Laser	Wellenlänge	Leistung
<i>Violet</i>	405 nm	30 mW solid state
<i>Blue</i>	488 nm	20 mW solid state
<i>Red</i>	633 nm	17 mW HeNe

[BD Bioscience 124, Brochure BD FACS CANTO II]

Die FACS Aufnahmen wurden mit der Software BD FACSDiva, das Gating (Absatz 2.3.3) und die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (Absatz 2.3.4) mit der Software Flow Jo durchgeführt. Die statistische Auswertung der Messdaten erfolgte mit GraphPad Prism 9.

Für die Fluoreszenzmarkierung wurden folgende konjugierte monoklonale Antikörper verwendet:

Tabelle 3: Antikörper für die FACS-Analyse

Antikörper	Fluoreszenz	Klon	Firma
CD42b	FITC	Xia.G5	Emfret
CD45	PerCP/Cy5.5	RA3-6B2	BioLegend
Ly6G	PE-Cy7	1A8	BioLegend
ADAM10	APC	# 139712	R&D Systems
ADAM17	PE	KLH	BioSS
CD62P	APC	RMP-1	BioLegend
CD62L	PB	MEL-14	BioLegend
CD162	PE	2PH1	BD Bioscience
CD192	BV421	SA203G11	BioLegend
CD61	APC	2C9.G2	BioLegend
CD49e	PE	5H10-27	BioLegend

CD42b wird auf den Thrombozyten exprimiert und interagiert mit dem Glykoprotein Ib α . CD45 ist allgemein auf Leukozyten zu finden. Die Detektion von neutrophilen Granulozyten erfolgte durch einen Antikörper gegen Ly6G (*engl.: lymphocyte antigen 6 complex, locus G*).

Die weiteren Fluoreszenzfarbstoffe wurden für die Bestimmung der Expression von relevanten Zellstrukturen durch Messung der mittleren Fluoreszenz-Intensität verwendet (Absatz 2.3.4).

2.3.3 Auswertung

Zu Beginn einer FACS-Analyse wurde am Gerät immer ein "Cytometer Setup and Tracking" durchgeführt, um eine Baseline-Kalibrierung der Laser zu erzielen. Hierzu wurden die Cytometer Setup Tracking Beads von BD Bioscience verwendet.

Bei Zugabe von mehreren Fluoreszenzfarbstoffen kann es vorkommen, dass sich die Farbspektren zweier Farbstoffe überschneiden, sodass hier keine eindeutige Zuordnung der Zellen erfolgen kann. Um dieses zu vermeiden, wird von der Fluoreszenz-Emission ein relativer Betrag subtrahiert. Dieser Vorgang nennt sich Kompensation. Der relative Betrag wird zuvor durch Definition von positiven und negativen Bereichen in den Einzelfärbungen (*engl.: single staining*) errechnet und dann auf die Multicolor-Analysen übertragen. Für die unterschiedlichen Konditionen wurden entsprechende Einzelfärbungen vorgenommen und die Kompensation durchgeführt.

Zur Bestimmung der anteiligen Zellpopulationen wird das Prinzip des Gating angewendet, d.h. dass eine Zellpopulation immer weiter in ihre Subpopulationen anhand der Zelloberflächenbestandteile differenziert wird. Das Gating soll nachfolgend am Beispiel einer FACS-Analyse einer Blutprobe verdeutlicht werden:

Aus der Gesamtzellpopulation werden im SSC-FSC Dot-Plot-Diagramm zuerst die Leukozyten ausgewählt, die sich durch die höhere Granularität und Zellgröße abgrenzen lassen (Abbildung 6: A). Aus der Leukozytenpopulation wird im

nächsten Schritt die mit Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) markierten CD45 positiven Zellen selektiert (Abbildung 6: B). Aus dieser Population wird der Anteil der Ly6G-positiven PMNs bestimmt (Abbildung 6: C), um im letzten Schritt den Anteil der PNCs zu berechnen (Abbildung 6: D). Hierbei gilt, dass PNCs sowohl CD42b-positiv als auch Ly6G-positiv sind. PMNs sind CD42b-negativ, da sie nicht direkt mit den Thrombozyten verbunden sind, jedoch Ly6G-positiv. Thrombozyten sind CD45-negativ und CD42b-positiv.

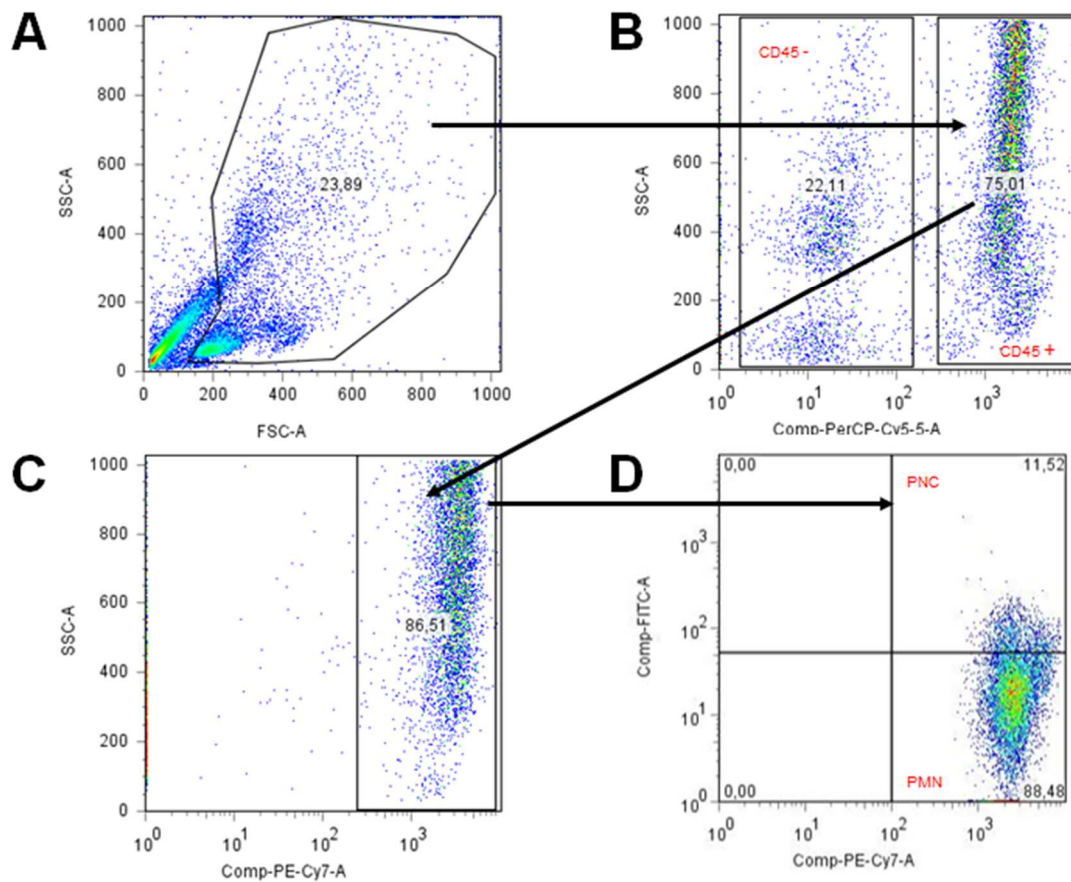


Abbildung 6: Gating-Prinzip der FACS-Analyse

A Gating der Leukozytenpopulation aus allen detektierten Ereignissen im FSC-SSC-Diagramm. **B** Gating der CD45-positiven und CD45-negativen Zellen aus der Leukozyten-Population im Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)-SSC-Diagramm. **C** Gating der Lymphozyten Antigen 6 Komplex Lokus G (Ly6G)-positiven Zellen im PE-Cyanin 7 (PE-Cy7)-SSC-Diagramm. **D** Gating der Plättchen-Neutrophilen-Komplexe (PNC) und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) aus den Ly6G-positiven Zellen im PE-Cy7-FITC-Diagramm. FITC markiert die CD42b-positiven Thrombozyten. PMNs sind FITC negativ und PE-Cy7 positiv. PNC sind PE-Cy7 und FITC positiv. (Eigene Darstellung einer Flow Jo Auswertung)

Aus der Differenzierung der Subpopulation durch das Gating ergeben sich die prozentualen Anteile an der Gesamtzellpopulation, welche in den Gates angegeben werden. Um absolute Zellzahlen zu erhalten, wurden die Granulozyten vor der FACS-Analyse mit Hilfe eines Lichtmikroskops und einer Neubauer-Zählkammer gezählt und dann entsprechend mit den Prozentzahlen der FACS-Analyse verrechnet.

Um entsprechende Gates korrekt festzulegen, wurden Einzelfärbungen (*engl.: single staining*) und FMO-Färbungen (*engl.: fluorescence minus one; FMO*) durchgeführt.

2.3.4 Mittlere Fluoreszenz-Intensität

Neben der Bestimmung der Differenzierung der Zellpopulationen wurde die Expression von P-Selektin, L-Selektin, PSGL1, Integrin β_3 , ADAM10, ADAM17 und CCR2 durch die Bestimmung der mittleren Fluoreszenz-Intensitäten (*engl.: mean fluorescence intensity; MFI*) gemessen. Die Messung wurde jeweils für Thrombozyten, PNCs und PMNs durchgeführt. Die MFI wurde mit der Software Flow Jo errechnet, wobei jeweils der arithmetische Mittelwert bestimmt wurde.

2.4 Histologie

2.4.1 Operatives Vorgehen

Für die histologischen Gewebeproben wurde das gleiche operative Vorgehen wie bei der Durchflusszytometrie gewählt (siehe Absatz 2.2.2).

Das entnommene Peritoneum wurde in Einbettkassetten gelegt und über Nacht in 4%iges Formalin gegeben. Das Formalin bewirkt eine Fixierung des Gewebes durch eine Vernetzung sowie eine leichte Denaturierung der Proteine [125].

2.4.2 Erstellung des histologischen Präparats

Im Anschluss an die Fixierung mit Formalin erfolgte die Entwässerung der Präparate, indem diese in eine Ethanolreihe mit zunehmend höheren Konzentrationen (50 bis 100 %) gegeben wurden, um das Wasser zu verdrängen.

Die Entwässerung ist notwendig, da Paraffin nicht in Wasser löslich ist. Nach der Entwässerung durch das Ethanol wurde dieses durch Xylol ersetzt und abschließend das Organ in flüssiges Paraffin getaucht [125]. Für diese Schrittabfolge wurde das Einbettkarussell (TP1020) der Firma Leica genutzt.

Die Paraffin-durchtränkten Organe wurden in Paraffinblöcke eingebettet, um sie im Anschluss mit einem Mikrotom (Leica RM2235) zu schneiden. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 3 µm und 5 µm erstellt und auf Objektträger gegeben.

2.4.3 Immunhistochemische Färbung der PMN

Für die Immunhistochemische Färbung der PMNs wurden die Präparate auf den Objektträgern zunächst entparaffiniert und rehydriert. Mit einem Methanol-Wasserstoffperoxid-Gemisch wurde im Anschluss die endogene Peroxidase blockiert. Für die Bindung der Antikörper müssen die Antigene zunächst demaskiert werden, hierzu wurden die Präparate in einem Citratpuffer für 20 Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Präparate für 60 Minuten mit einer Avidin-Blocking Solution inkubiert, um endogenes Avidin zu blockieren und eine unspezifische Färbung zu unterbinden. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit dem primären Antikörper, welcher in einer Biotin-Blocking Solution gelöst wurde. Als primärer Antikörper wurde ein rat anti-mouse neutrophil (Ly6B.2, MCA771GA) Antikörper von Bio Rad verwendet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Neben dem primären Antikörper wurde zudem ein normal rat IgG Antikörper (sc-2026) von Santa Cruz als IgG-Kontrolle verwendet und eine Negativ-Kontrolle ohne primären Antikörper durchgeführt.

Der sekundäre Antikörper, ein biotinylierter rabbit anti-rat IgG (BA-4000), wurde dem ABC-Kit (PK-4000) von Vectastain entnommen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mit den Reagenzien aus dem Kit wurde eine Lösung hergestellt, die einen Avidin-Biotin-Komplex enthält, welcher mit einer Meerrettich-Peroxidase (*engl.: horseradish-peroxidase*; HRP) konjugiert ist [126]. Die Lösung wurde auf die Präparate gegeben und für 30 Minuten inkubiert,

sodass der Avidin-Biotin-Komplex eine Bindung zum sekundären Antikörper eingeht (Abbildung 7).

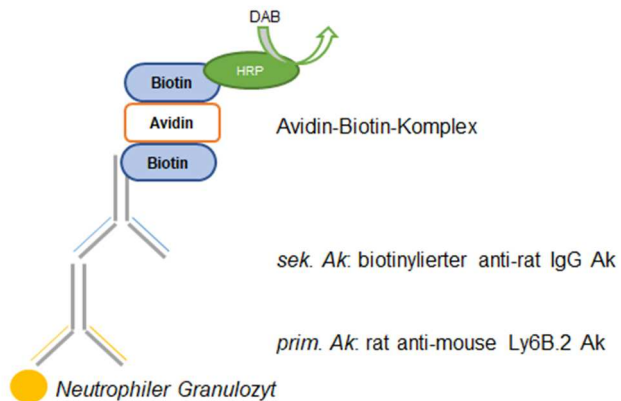


Abbildung 7: Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Enzym-Antikörper-Komplex der immunhistochemischen Färbung zur Detektion von polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (PMN). (Eigene Darstellung)

Als Substrat der HRP wurde das DAB (3,3'-Diaminobenzidin) Peroxidase Substrat Kit (SK-4100) von Vector Laboratories verwendet und für 3 Minuten inkubiert. Durch die Oxidation des DAB entsteht ein wasserunlöslicher, bräunlicher Farbstoff, sodass die neutrophilen Granulozyten bräunlich gefärbt wurden.

Im letzten Schritt erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin mit einer Inkubation von 15 Sekunden. Nach erfolgter Dehydrierung der Präparate wurde diese mit Eukitt eingedeckt.

2.4.4 Immunhistochemische Färbung der PNC

Das Vorgehen der Färbung der PNC erfolgte im ersten Teil analog der PMN Färbungen (Absatz 2.4.3). Als ersten primären Antikörper wurde ein rabbit anti-mouse CD41 Antikörper (ab63983) von Abcam verwendet, der an die Thrombozyten bindet. Die IgG-Kontrolle erfolgte mit einem normal rabbit IgG Antikörper, wobei beide Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden. Als ersten sekundären Antikörper wurde ein goat anti-rabbit IgG (BA-1000) von Vector Laboratories gewählt. Die Färbung der Thrombozyten erfolgte ebenfalls mit dem DAB Peroxidase Kit von Vector Laboratories mit einer Inkubationszeit von 3 Minuten. Nach der ersten Färbung erfolgte ein weiteres Blocken mit der Avidin-Blocking Solution.

Um die PNC darzustellen, wurden in den nächsten Schritten mit einem weiteren primären und sekundären Antikörper die neutrophilen Granulozyten angefärbt. Diese wurden dabei mit einem rat anti-mouse Ly6G Antikörper (ab25377) von Abcam als primären Antikörper markiert, welcher für zwei Stunden inkubiert wurde. Die IgG-Kontrolle erfolgte mit einem normal rat IgG Antikörper. Als zweiten sekundären Antikörper wurde ein rabbit anti-rat IgG (BA-400) von Vector Laboratories verwendet. Dieser wurde für eine Stunde inkubiert. Nach der Bindung der zweiten Antikörper erfolgte ein erneutes Auftragen der ABC-Solution. Für die Farbreaktion wurde das Histogreen-Kit (E109) von Linaris verwendet. Die Inkubationszeit betrug 3 Minuten. Abschließend wurden die Zellkerne für 5 Minuten mit Nuclear Fast Red (H-3403-500, Vector Laboratories) angefärbt.

Die Bilder der immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem Lichtmikroskop DM IRB von Leitz und der Kamera AxioCam MRc von Zeiss aufgenommen. Die Kamera wurde mit der Software AxioVision (Version 4.9) von Zeiss gesteuert.

2.5 Bestimmung der Genexpression

2.5.1 RNA-Extraktion

Zur Quantifizierung der Genexpression durch die quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) musste die RNA aus dem Peritoneum isoliert werden, wo sie in den Zellen mit Proteinen komplexiert vorliegt.

Die RNA-Extraktion aus dem Peritoneum erfolgte mit Hilfe des peqGold TriFast™, welches Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält. Beide Substanzen dienen der Denaturierung von Proteinen. Für die Homogenisierung der Proben wurden Reaktionsgefäße mit Keramik-Kugeln vorbereitet und mit je 1 ml peqGold TriFast™ befüllt. Die aufgetauten Gewebeproben wurden in die vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben und im Homogenisator (Precellys 24 von Bertin Technologies) bei 6000 rpm für 15 bis 20 Sekunden homogenisiert. Zur Dissoziation der Nukleotidkomplexe standen die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und dann für 10 Minuten stehen gelassen.

Um eine Phasentrennung zu erreichen, wurde die Probe bei 12000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, wurde in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Die untere Phenolphase und die weiße Interphase enthalten DNA und Proteine.

Durch die Zugabe von 500 µl gekühltem Isopropanol erfolgte die Präzipitation der RNA. Nach dem Mischen der Proben wurden diese für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Bei 12000 g für 10 Minuten bei 4 °C wurde das Genmaterial abzentrifugiert und war als kleines Pellet sichtbar. Das Isopropanol wurde vorsichtig abpipettiert und die Probe zweimal mit gekühltem Ethanol (75%ig) gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurde der Überstand sorgfältig abpipettiert und das Pellet kurz an der Raumluft angetrocknet.

Das Lösen der RNA erfolgte mit 40 µl RNase-freiem Wasser (NFW) durch schwaches Schütteln auf dem Thermoblock bei 58 °C für 10 Minuten. Im Anschluss wurden die Proben mindestens über eine Nacht bei -20 °C gelagert. [vgl. Datenblatt TriFast; 127]

2.5.2 Bestimmung der RNA Konzentration

Zur Bestimmung der RNA Konzentration wurde der Nanodrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer von Thermo Scientific) verwendet. Als Leerwert wurde 2 μ l NFW verwendet. Von den Proben wurden ebenfalls 2 μ l auf den Messsensor pipettiert und die RNA Konzentration photometrisch bestimmt.

Für den Umschrieb der RNA in komplementäre DNA wurden die Proben mit NFW soweit verdünnt, dass die Konzentration zwischen 300 und 600 ng/ μ l lag. Des Weiteren wurde die Reinheit der Probe durch den 260/280 Quotient aus der Absorption bei 260 nm bzw. 280 nm Wellenlänge bestimmt. Dieser Quotient beträgt bei einer reinen RNA-Probe 2,0.

2.5.3 Umschrieb der RNA in cDNA

Der Umschrieb der RNA in die komplementäre DNA (*engl.: complementary DNA; cDNA*) erfolgte für die anschließende quantitative real-time PCR. Für die Synthese der cDNA wurde eine RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt, welche zusätzlich über eine Ribonuklease Aktivität verfügt, um den RNA-Strang abzubauen. Abschließend synthetisiert eine DNA-abhängige DNA-Polymerase den komplementären DNA-Strang, sodass eine doppelsträngige cDNA vorliegt (Abbildung 8). (Absatz nach [128])

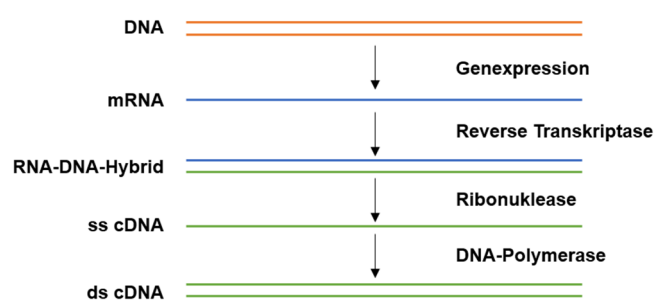


Abbildung 8: cDNA-Synthese

Abfolge der enzymatischen Transformation der DNA in eine doppelsträngige komplementäre DNA (ds cDNA) über den Zwischenschritt der einzelsträngigen DNA (ss cDNA). (Eigene Darstellung)

Im Gegensatz zur DNA ist die cDNA komplementär zur RNA und spiegelt die Genexpression einer Zelle wider, welche man dann mit Hilfe der RT-qPCR quantifizieren kann.

Für die Synthese der cDNA wurde das iScript™ cDNA Synthese Kit von BioRad verwendet, bestehend aus 5x iScript Reaction Mix und iScript Reverse Transcriptase. Für jede Probe wurde 5 µl iScript Mix vorbereitet. Dieser bestand aus 4 µl 5x iScript Reaction Mix und 1 µl iScript Reverse Transcriptase. In einem Reaktionsgefäß wurden ein Mikrogramm RNA aus der Probe pipettiert und das Volumen mit NFW auf 15 µl ergänzt. Anschließend wurde zu jeder Probe 5 µl des vorbereiteten iScript Mixes pipettiert.

Im Thermocycler (T100 Thermal Cycler von Bio-Rad) erfolgte das Priming über 5 Minuten bei 25 °C, gefolgt von der reversen Transkription in 20 Minuten bei 46 °C. Die reverse Transkriptase wurde bei 95 °C eine Minute lang inaktiviert und die Proben abschließend auf 4 °C abgekühlt. Die cDNA stand jetzt für die RT-qPCR zur Verfügung.

2.5.4 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (*engl.: polymerase chain reaction; PCR*) ist eine 1984 von Kary Mullis veröffentlichte Methode zur Amplifikation von Nucleinsäuren. Der Vorgang läuft in drei Schritten ab (Abbildung 9): Zuerst wird die DNA-Sequenz bei etwa 95 °C denaturiert. Bei 60-67 °C, abhängig vom jeweiligen Primer (siehe Tabelle 4), kommt es zur Anlagerung des Primers an die einzelsträngige DNA. Eine hitzebeständige Polymerase synthetisiert -beginnend am 5'-Ende des DNA-Strangs des Primers- bei 72 °C den komplementären DNA-Strang. Für dessen Synthese müssen Desoxyribonucleosidtriphosphate im Reaktionsgemisch vorliegen. Der nächste Amplifikations-Zyklus beginnt erneut mit der Denaturierung des Doppelstrangs zu zwei Einzelsträngen. Durch die Wiederholungen ergibt sich eine exponentielle Zunahme der DNA-Konzentration. (Absatz nach [128])

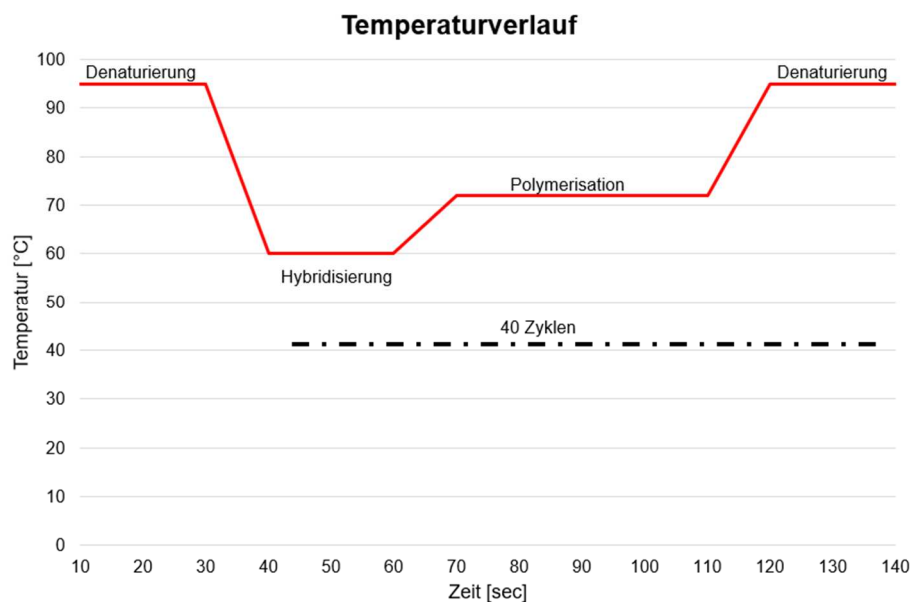


Abbildung 9: Temperaturverlauf bei der Polymerase-Kettenreaktion

Temperaturverlauf der PCR-Zyklen: Denaturierung der DNA bei 95 °C, Anlagerung der Primer an die DNA-Stränge (Hybridisierung bei 60-67 °C, abhängig vom Primer) mit abschließender Polymerisation bei 72 °C. Wiederholung der Vorgänge in 40 Zyklen. (Eigene Darstellung)

Die PCR wurde als *RT-qPCR* angewandt, um die gesuchte RNA zu quantifizieren. Hierzu wurde -wie zuvor beschrieben- die RNA aus den murinen Peritoneen isoliert und in cDNA überführt, welche als Ausgangsmaterial für die PCR fungierte. Durch die gezielte Auswahl von Primern (Tabelle 4) konnte die Genexpression im Gewebe detektiert werden.

Folgende Primer wurden verwendet:

Tabelle 4: Primer für die RT-qPCR mit Hybridisierungstemperatur

Primer	Temperatur	Primer	Temperatur
TNF α	65,5 °C	CCR2	66,0 °C
IL6	65,5 °C	IL1 β	65,5 °C
CXCL1	65,0 °C	ADAM10	62,8 °C
CXCL2	63,8 °C	ADAM17	66,0 °C
CX3CL1	67,0 °C	TSPAN24	63,4 °C
CX3CR1	66,0 °C	TSPAN28	61,0 °C
CCL2	67,0 °C	TSPAN29	63,4 °C

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde der iTaq Universal SYBR Green Supermix von Bio Rad verwendet, welcher neben den notwendigen Desoxyribonucleosidtriphosphaten, der Polymerase, auch einen Fluoreszenzfarbstoff enthält. Dieser interkaliert mit der DNA, sodass die Amplifikation über die Zunahme der Fluoreszenz quantifiziert werden kann.

Für die RT-qPCR wurden in jedes Well 4 μ l der cDNA Probe pipettiert und mit 5 μ l NFW, 10 μ l SybrGreen und 1 μ l des Primermixes ergänzt. Bei den Negativkontrollen (*engl.: non template control*; NTC) wurde anstatt der 4 μ l Probe weitere 4 μ l NFW verwendet. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen: 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 genutzt. Als Referenz wurde ein Primer gewählt, der an die ribosomale 18s RNA bindet.

Zur Amplifikation wurde ein Thermocycler (C1000 Thermal Cycler CFX96 Real-Time System von Bio Rad) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit CFX Manager von Bio Rad und GraphPad Prism 9 der Firma GraphPad Software. Für die statistische Auswertung wurde die normalisierte Genexpression ($\Delta\Delta C_q$) genutzt,

die anhand der effektunabhängigen ribosomalen 18s RNA durch die CFX Manager Software berechnet wurde.

2.6 ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) dient dem Nachweis von Zytokinen, welche durch Enzym-gekoppelte Antikörper detektiert werden. Das Enzym katalysiert eine Farbreaktion, wobei die Zytokinkonzentration mit der Reaktionsgeschwindigkeit positiv korreliert.

Zur Detektion von Zytokinen in abzentrifugierten Überständen der Peritoneallavage und des Plasmas wurde die modifizierte Form des ELISA, der sogenannte Sandwich-ELISA verwendet. Für die Analysen wurden die ELISA Kits von R&D Systems verwendet.

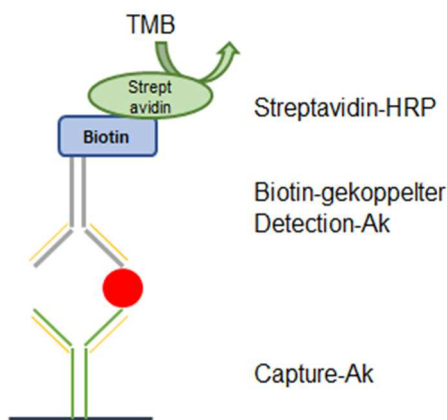


Abbildung 10: Sandwich-ELISA

Aufbau des Antikörper-Enzym-Komplexes des Sandwich-ELISA zur Detektion von Zytokinen. An den Capture-Antikörper wird das Zytokin gebunden und mit Hilfe eines Biotin-gekoppelten Detektions-Antikörper markiert. Die Farbreaktion mit TMB wird durch die Streptavidin-HRP katalysiert. (Eigene Darstellung)

Hierzu wurde der Antikörper entsprechend den Herstellerangaben in PBS gelöst und jeweils 100 µl pro Well pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, sodass der Antikörper mit seinem Fc-Teil an die Oberfläche des Reaktionsgefäßes gebunden wurde. Dieser Vorgang wird als Coating (*deutsch: Beschichtung*) bezeichnet. Die Oberflächen-gebundenen Antikörper (Tabelle 5) dienen der Erfassung der Zytokine aus der Probe, sodass diese als Capture-Antikörper bezeichnet werden. Im nächsten Schritt erfolgte das Blocken freier unspezifischer Proteinbindungsstellen mit 200 µl Reagent Diluent (1%iges

bovines Serumalbumin, BSA) für eine Stunde. Jeweils 100 µl Standard bzw. Probe wurden in jedes Well pipettiert und für 2 Stunden inkubiert. Das gesuchte Zytokin wird spezifisch an den Fab-Teil des Capture-Antikörpers gebunden. Im Anschluss wurden 100 µl des Biotin-gekoppelten Antikörpers (Detection-Antikörper) hinzugegeben und ebenfalls für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Farbreaktion wurde als katalytische Enzym die Meerrettich-Peroxidase (*englisch: horseradish-peroxidase*; HRP) genutzt. Das Enzym ist Streptavidin konjugiert, welches eine hohe Affinität zum Biotin des Detection-Antikörpers aufweist (Abbildung 10). Zwischen allen Schritten erfolgt dreimaliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer (PBS mit 0,05% Tween). Im letzten Schritt wurden 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat der HRP hinzugegeben. Nach Oxidation des TMB durch die Peroxidase färbt sich das TMB türkisblau. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure nach 20 Minuten gestoppt und die Lösung färbte sich gelb.

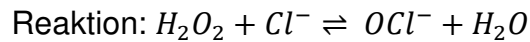
Mit Hilfe des TECAN Microplate Readers (Infinite M200 Pro) wurde die Farbintensität bei den Wellenlängen 450 nm und 540 nm gemessen und mit dem Standard anhand einer Regressionsanalyse verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 9.

Tabelle 5: Antikörper ELISA

Antikörper	Firma	
Mouse TNF α	DY410	R&D Systems
Mouse IL6	DY406	R&D Systems
Mouse CXCL1	DY453	R&D Systems
Mouse CXCL2	DY452	R&D Systems
Mouse CX3CL1	DY472	R&D Systems
Mouse CCL2	DY479	R&D Systems

2.7 MPO

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, welches charakteristisch im Lumen des Phagosoms von neutrophilen Granulozyten vorkommt und die Bildung von Hypochlorit-Ionen aus Wasserstoffperoxid katalysiert [129].



Für den Nachweis der MPO-Aktivität in den Überständen der Peritoneallavage wurde ABTS [2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)] verwendet, welches in Citratpuffer (pH 4,2) und Aqua dest. gelöst wurde. ABTS ist ein Substrat der MPO, wobei das grünliche ABTS-Kation entsteht. Zum gelösten ABTS wurde zusätzlich Wasserstoffperoxid gegeben.

Für die Messung wurden 50 µl Probe mit 50 µl Citratpuffer und 100 µl ABTS-Lösung in jedes Well pipettiert und die Well-Platte bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Es erfolgte die Farbreaktion und nachfolgend die photometrische Messung der Farbintensität mit dem TECAN Microplate Reader (Infinite M200 Pro) bei 405 nm.

2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der gesamten Proteinkonzentration wurde das Pierce Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit von Thermo Scientific verwendet. Diese Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine im alkalischen Medium. Die Kupferkationen bilden mit dem BCA einen Komplex, der eine violette Farbe hat und photometrisch bei 562 nm nachgewiesen werden kann [130].

Hierzu wurden 25 µl Peritoneallavage-Überstand mit 200 µl BCA-Lösung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Als Referenz wurde der Albumin Standard (2 mg/ml) aus dem Kit verwendet. Die photometrische Messung erfolgte mit dem TECAN Microplate Reader (Infinite M200 Pro).

2.9 Western Blots

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen, welche nach erfolgter Isolation aus dem Gewebe im elektrischen Feld in einem Polyacrylamid-Gel wandern. Diese Auftrennung der Proteine nach der Größe im elektrischen Feld wird im Englischen als SDS-PAGE (*engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) bezeichnet. Die aufgetrennten Proteine werden auf eine Membran übertragen, dem sogenannten Blotting, und mit Hilfe von Antikörpern detektiert.

In dem Projekt wurden mit Hilfe des Western Blots Proteine des Mitogen-aktivierte-Protein (MAP)-Kinase Signalwegs und des Proteinkinase B Signalwegs nachgewiesen.

2.9.1 Proteinisolation

Die Isolation der Proteine erfolgte aus murinem Peritoneum. Zur Homogenisierung des Gewebes wurde ein Stück des Peritoneums in 1 ml RIPA-Puffer (*engl.: radioimmunoprecipitation assay buffer*) zusammen mit Protease- und Phosphataseinhibitor sowie Keramik-Kugeln gegeben. Bei zweimal 6200 rpm für 20 Sekunden erfolgte die Homogenisierung des Gewebes im Homogenisator. Zur Dissoziation der Proteine wurden die Proben 2 Stunden über Kopf bei 4 °C gelagert und im Anschluss für 20 Minuten bei 4 °C mit 12000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt.

Die Proteinkonzentration wurde durch ein BCA-Assay (siehe Absatz 2.8) bestimmt. Durch Verdünnung der Proben wurde exakt 50 µg Protein pro Geltasche verwendet.

2.9.2 Gelelektrophoretische Auftrennung

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine SDS-PAGE. Das Gel besteht aus einem Sammelgel mit den Probenfächerchen und einem Trenngel. Es wurde ein 10%iges Trenngel für Proteingrößen zwischen 50 bis 120 kDa verwendet.

Um die sekundär und tertiär Struktur der Proteine aufzulösen, wurden die Disulfidbrücken der Proteine vor der Elektrophorese mit einem Probenpuffer (4x Laemmli) versetzt. Dieser enthält neben Mercaptoethanol als Reduktionsmittel, Natriumdodecylsulfat (*engl. sodium dodecyl sulfate*; SDS), Glycerol und Bromphenol-Blau. Das SDS lagert sich an die Proteine an und führt so zu einer negativen Ladung der Proteine, was eine Auftrennung im elektrischen Feld ermöglicht. Das Bromphenol-Blau visualisiert den Wanderungsfortschritt im Gel. Die Denaturierung erfolgte durch Erhitzen der Proben für 5 Minuten auf 95 °C und anschließendem Abkühlen auf Eis.

In jede Geltasche wurden 20 µl der Probe pipettiert. Als Referenz-Marker wurde in die erste Tasche 4 µl Prestained Protein Ladder (Bio Foxx) und 2 µl MagicMark XP Western Protein Standard (LC5602, Invitrogen) gegeben.

Die Gele wurden in eine Kammer mit Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer gestellt. Zur Linearisierung der Proben im Sammelgel wurde eine Spannung von 80 V angelegt, bis das Trenngel erreicht wurde. Bei 120 Volt für ca. 2 Stunden wanderten die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode. Hierbei laufen kleine Moleküle schneller und es erfolgt die Auftrennung nach der Proteingröße.

2.9.3 Blotting

Für die Detektion der Proteine mit Antikörpern müssen die Proteine auf eine Blotting-Membran transferiert werden. Es wurde eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid; BioRad, 0,2 µm Porengröße) verwendet. Für den Transfer wurde diese für 4 Minuten in Methanol aktiviert und auf das von der Kassette befreite Gel direkt aufgelegt. Beide wurden zwischen Filterpapier sowie Schwämmen gelegt und in die Transferkammer gegeben, sodass die Membran auf der Anodenseite der Kammer zu liegen kam. Die Kammer war mit gekühltem Transferpuffer bestehend aus Tris-Glycin-Puffer (BioRad), Methanol und Aqua dest. gefüllt. Der eigentliche Transfer erfolgte bei 110 Volt für 90 Minuten unter Kühlung der Kammer mit Eis.

2.9.4 Proteindetektion

Nach dem Transfer wurde das angelagerte SDS mit TBS-T-Puffer (*engl.: Tris-buffered saline with Tween 20*) mit 0,1% Tween abgewaschen und anschließend unspezifische Antikörperbindungsstellen mit 5%iger Magermilch in TBS-T 0,05%ig für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T (0,1%) wurde ein Primärantikörper (Tabelle 6) verdünnt in 5%igem BSA hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert.

Folgende Primärantikörper wurden verwendet:

Tabelle 6: Primärantikörper Western Blot

Antikörper		Größe	Verdünnung
Akt 1/2	sc-1619	60/56 kDa	1:200
Phospho-Akt	CST 4060	60 kDa	1:1000
MAPK (ERK 1/2)	sc-93	44 kDa	1:100
Phospho-MAPK (ERK 1/2)	CST 4370	44/42 kDa	1:1000

Als Sekundärantikörper wurde nach erneutem Waschen ein goat anti-rabbit IgG Antikörper mit konjugierter Meerrettichperoxidase (7074, Cell Signaling Technology) in 5%iger Magermilch 1:1000 verdünnt verwendet und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Proteindetektion erfolgte durch Zugabe von Luminol, einem Chemilumineszenz-Substrat, das für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Das Luminol wird durch die HRP umgesetzt. Für die Aufnahme der Chemilumineszenz-Bilder wurde der Fusion SL von Vilber Lourmat verwendet.

Die Ladekontrolle wurde mit einem Anti-GAPDH Antikörper (G9545, Sigma) nach erneutem Waschen durchgeführt. Dieser Antikörper wurde 1:10.000 verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ebenfalls der

goat anti-rabbit IgG (7074, Cell Signaling Technology) verwendet und mit Luminol detektiert.

2.10 Statistik und Software

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Version 9). Die Daten wurde mittels Shapiro-Wilk Test und Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung überprüft. Zum Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen mit Normalverteilung wurde der *t*-Test für unabhängige Gruppen (*engl.: unpaired t-test*) verwendet. Bei nicht-normalverteilten Werten wurde der Mann-Whitney Test verwendet. Die Mehrgruppenvergleiche wurden mit einer Varianzanalyse (*engl.: analysis of variance, kurz: ANOVA*) mit einer Bonferroni Korrektur berechnet. Die p-Werte wurden mit der Software berechnet und ein Signifikanzniveau α von 5 % zu Grunde gelegt.

Die Signifikanz in den Grafiken der Vergleiche mit zwei Gruppen wurde durch Asteriske gekennzeichnet (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Legende der Signifikanzen

Symbol	p-Wert
*	P < 0,05
**	P < 0,01
***	P < 0,001
****	P < 0,0001

Die graphische Darstellung der Messwerte in den Punktdiagrammen des zeitlichen Verlaufs erfolgte unter Angabe des Mittelwerts und des Standardfehler des Mittelwerts (*engl.: standard error of the mean; SEM*) als Maß für die Streuung des Mittelwerts der Stichprobe im Verhältnis zum theoretischen Mittelwert der Gesamtpopulation. Beim Zweigruppenvergleich wurde bei den Punktdiagrammen die Standardabweichung des Mittelwerts (*engl.: standard deviation; SD*) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Zellzahlen

Die intraperitoneale Injektion des Zymosans induziert bei den Mäusen eine Peritonitis. Um den Verlauf der Inflammation zu erfassen, werden im Folgenden die Gesamtzellzahl, die Anzahl der PMNs sowie der prozentuale Anteil der PNCs im Blut und in der Peritoneallavage dargestellt.

3.1.1 Gesamtzellzahlen

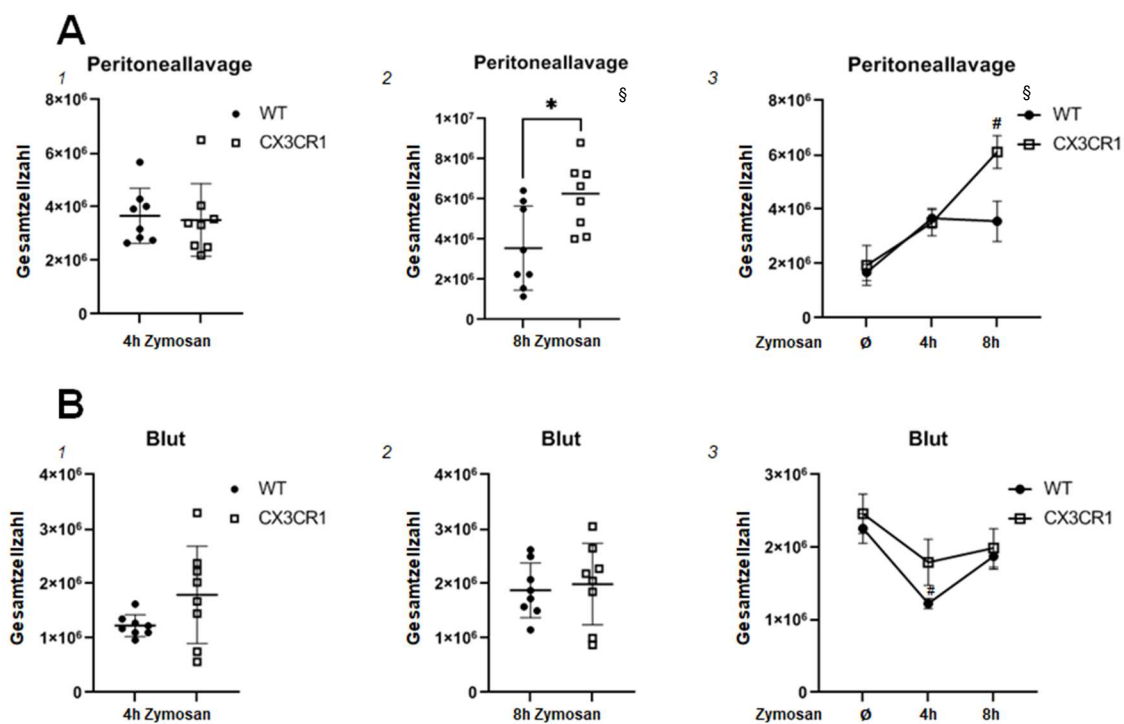


Abbildung 11: Gesamtzellzahl in der Peritoneallavage und im Blut

Lichtmikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl in der Peritoneallavage (**A**) und im Blut (**B**) vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD (1, 2) sowie im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SEM (3). Statistischer Vergleich von zwei Gruppen mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte und Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (* $P < 0,05$). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni Korrektur (# $P < 0,05$; # stimuliert vs. nicht-stimuliert).

A1: PL 4h Zymosan, $n = 8/8$ (WT/CX3CR1^{-/-}). A2: PL 8h Zymosan, $p = 0,0183$, $n = 8/8$. A3: PL zeitlicher Verlauf. B1: Blut 4h Zymosan, $n = 8/8$. B2: Blut 8h Zymosan, $n = 8/8$. B3: Blut zeitlicher Verlauf

§ Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

Im Rahmen des Entzündungsgeschehen sind die Leukozyten ein wichtiger Teil der zellulären Immunantwort auf die Infektion. Die Gesamtzellzahlen zeigten bei 4 Stunden keine signifikanten Unterschiede in den Kompartimenten bei Vergleich der WT Mäuse mit den CX3CR1^{-/-} Tieren (Abbildung 11: A1 und B1). In der Peritoneallavage (PL) konnte bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen eine signifikant höhere Zellzahl zum Zeitpunkt 8 Stunden nach der Inflammationsinduktion detektiert werden (Abbildung 11: A2). In den Verläufen, wo es in der PL zu einer Zunahme der Gesamtzellzahl kam und im Blut eine Abnahme der Zellen zu sehen war, lässt sich die zeitabhängige Migration der Zellen aus dem Blut in die PL erkennen (Abbildung 11: A3 und B3).

3.1.2 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten Zahlen

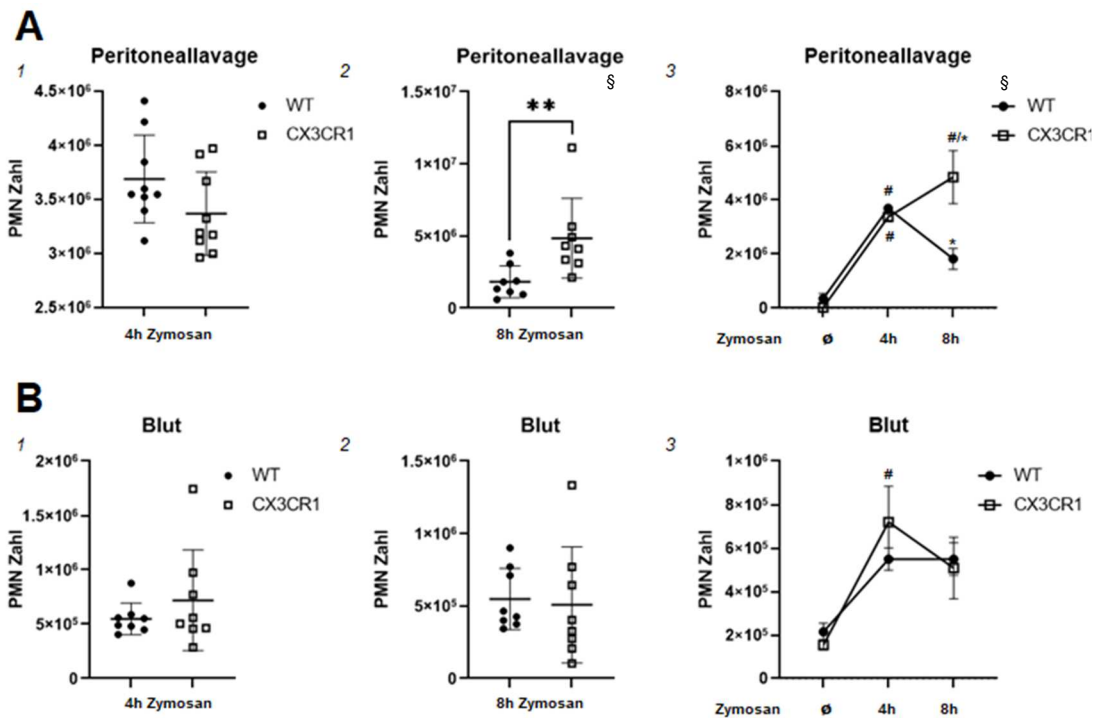


Abbildung 12: PMN Zahlen in PL und Blut

Bestimmung der polymorphkernigen neutrophile Granulozyten (PMN) Zahlen in der Peritoneallavage (**A**) und im Blut (**B**) vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD (1, 2) sowie im Punktdiagramm (3) mit Mittelwert \pm SEM. Statistischer Vergleich von zwei Gruppen mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte und Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (***P* < 0,01). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni Korrektur (#*P* < 0,05: # stimuliert vs. nicht-stimuliert, * WT vs. CX3CR1^{-/-}).

A1: PL 4h Zymosan, *n* = 9/9 (WT/CX3CR1^{-/-}). A2: PL 8h Zymosan, *p* = 0,0019, *n* = 8/8. A3: PL zeitlicher Verlauf. B1: Blut 4h Zymosan, *n* = 8/8. B2: Blut 8h Zymosan, *n* = 8/8. B3: zeitlicher Verlauf

§ Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

Mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Untersuchung wurden die PMNs identifiziert und die Anzahl bestimmt. Es ließ sich ein starker Anstieg der PMN Zahl durch die Zymosan Stimulation der Tiere verzeichnen, was die immunologische Antwort des Organismus im Rahmen der Immunabwehr bestätigt. In der PL konnte 8 Stunden nach der Zymosan Injektion bei den WT Tieren signifikant mehr PMNs registriert werden (Abbildung 12: A2). Der Verlauf in der PL (Abbildung 12: A3) zeigte, dass bei den WT Tieren ein Abfall der

Zellzahl von 4 Stunden auf 8 Stunden zu sehen war, wohingegen bei den CX3CR1^{-/-} Tiere einen weiteren Anstieg zu verzeichnen war. Im Blut ließen sich keine signifikanten Gruppenunterschiede detektieren (Abbildung 12: B).

Die immunhistochemischen Färbungen des Peritoneums zeigten die migrierten PMNs (siehe Abbildung 13). Durch die Entzündung ist das peritoneale Gewebe aufgelockert.

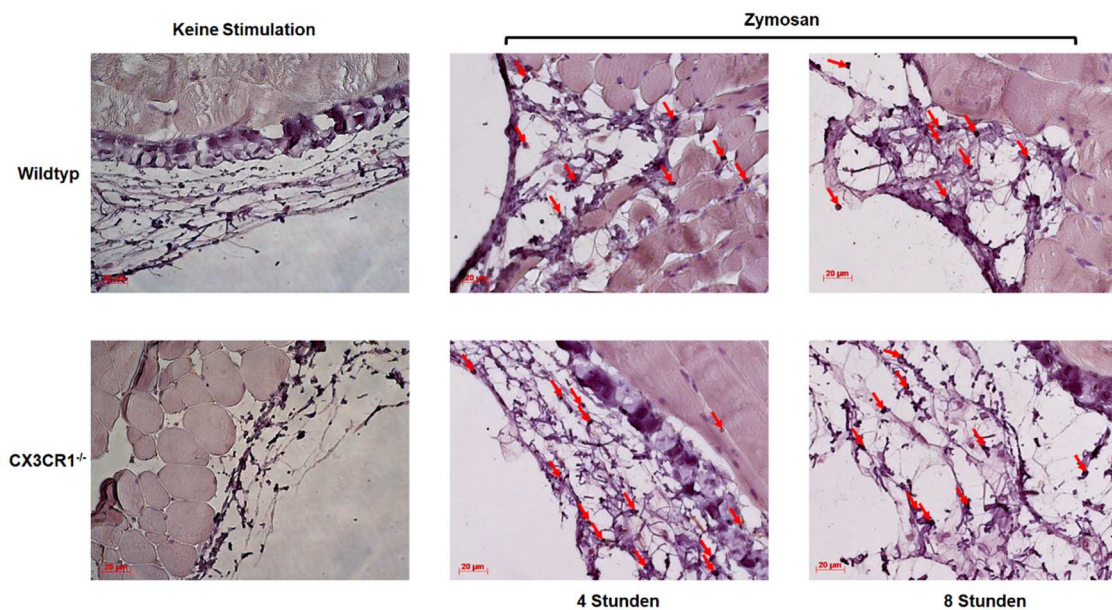


Abbildung 13: Immunhistochemische PMN-Färbung des Peritoneums

Immunhistochemische Färbung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) im Peritoneum mit Diaminobenzidin (braun). Anfärbung des Gewebes mit Hämatoxylin. Markierung der PMNs mit roten Pfeilen. Aufnahmen in 40x Vergrößerung, n = 4/4 (WT/CX3CR1^{-/-}).

3.1.3 Plättchen-Neutrophilen-Komplexe

In der Dissertation sollte der Einfluss des CX3CR1 Rezeptors auf die PNC Bildung untersucht werden, daher wurde neben den Leukozytenzahlen und den PMN Zahlen die prozentualen Anteile der PNCs an den Ly6G-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Allgemein konnte nach Auslösen der Inflammation in CX3CR1^{-/-} Mäusen ein signifikant höherer Anteil an PNCs detektiert werden. Zum Zeitpunkt 4 Stunden ergaben sich sowohl im Blut (Abbildung 14: B1) als auch in der PL (Abbildung 14: A1) signifikante Unterschiede. Bei Betrachtung des Bluts konnte ein Peak 4 Stunden nach der Induktion der Inflammation bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen festgestellt werden (Abbildung 14: C2).

Zum Zeitpunkt 8 Stunden nach Zymosan Injektion konnten in der PL (Abbildung 14: A2) eine signifikant gesteigerte PNC Bildung bei den CX3CR1^{-/-} Tieren beobachtet werden. Dieser Unterschied konnte im Blut zum gleichen Zeitpunkt ebenfalls gesehen werden (Abbildung 14: B2), wobei hier in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg durch die Stimulation zu verzeichnen war (Abbildung 14: C2).

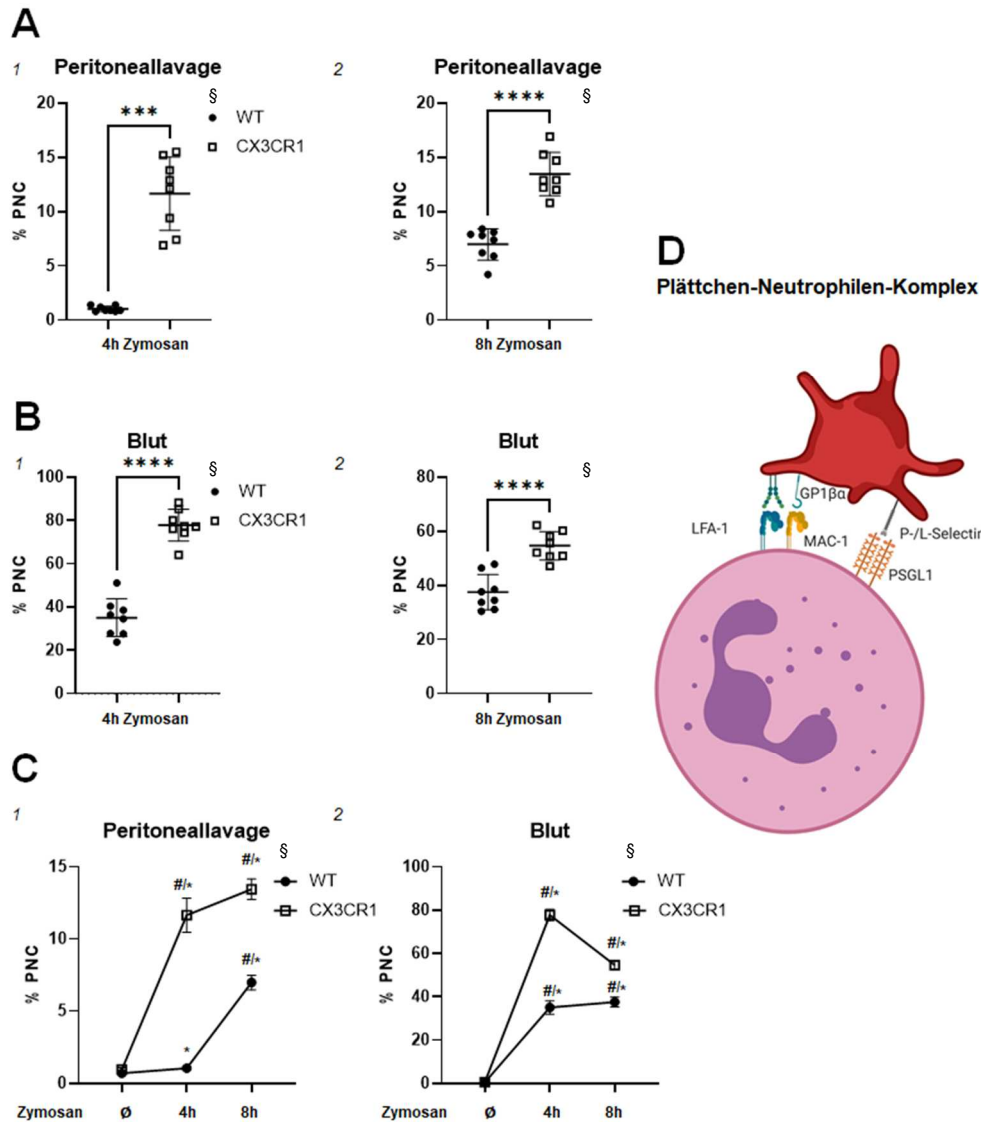


Abbildung 14: Plättchen-Neutrophilen-Komplexe in der PL und Blut

Bestimmung des prozentualen Anteils der Plättchen-Neutrophilen-Komplexe (PNC) von den Ly6G-positiven Zellen in der FACS Analyse vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen in der Peritoneallavage (**A**) und im Blut (**B**). Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert ± SD (A, B) sowie der zeitlichen Verläufe im Punktdiagramm mit Mittelwert ± SEM (**C**). Statistischer Vergleich von zwei Gruppen mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte und Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (****P* < 0,001, *****P* < 0,0001). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni Korrektur (#/**P* < 0,05; # stimuliert vs. nicht-stimuliert, * WT vs. CX3CR1^{-/-}). **D** Vereinfachte Darstellung der Integrin- und Selektin-vermittelten Interaktion zwischen Plättchen und PMNs im Rahmen der Plättchen-Neutrophilen-Komplex Formation. (Eigene Darstellung erstellt mit BioRender.com)

A1: PL 4h Zymosan, *p* = 0,0002, *n* = 8/8 (WT/CX3CR1^{-/-}). A2: PL 8h Zymosan, *p* < 0,0001, *n* = 8/8.

B1: Blut 4h Zymosan, *p* < 0,0001; *n* = 8/8. B2: Blut 8h Zymosan, *p* = 0,003, *n* = 8/8

C1: PL zeitlicher Verlauf; C2: Blut zeitlicher Verlauf

§ Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

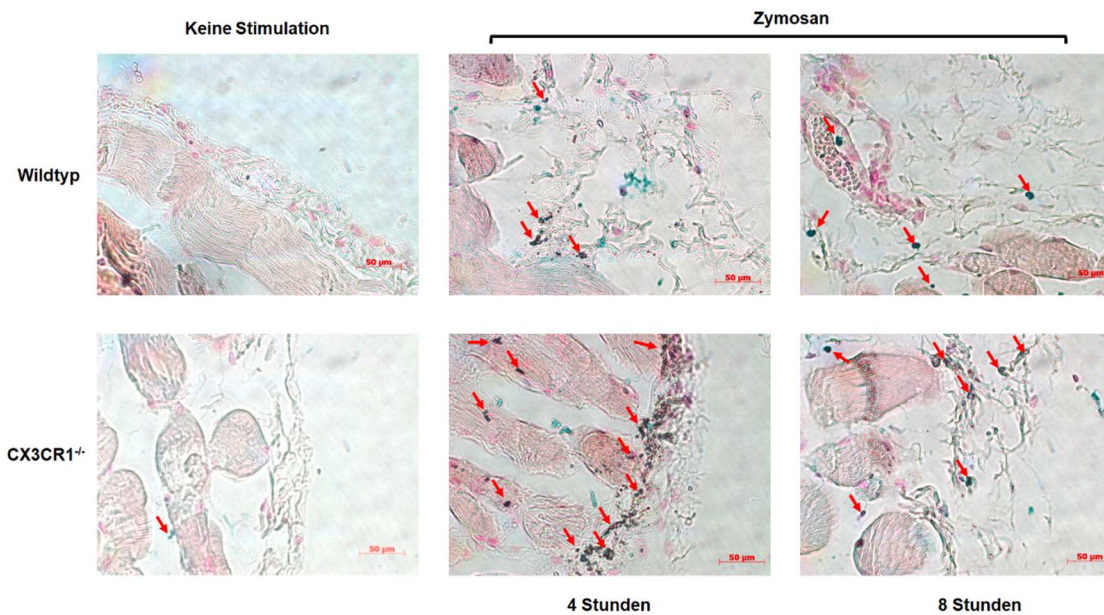


Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung der PNCs im Peritoneum

Immunhistochemische Färbung der Plättchen-Neutrophilen-Komplexe (PNC) im Peritoneum. Anfärbung der PMNs mit Histogreen und der Plättchen mit Diaminobenzidin (braun). Färbung des Gewebes mit NuclearFastRed. Aufnahmen in 63x Vergrößerung, n = 4/4 (WT/CX3CR1^{-/-}). Markierung der PNCs mit roten Pfeilen. Die Bilder sind der aus der Arbeit entstandenen Publikation entnommen [131].

Die gesteigerte PNC Bildung bei den CX3CR1^{-/-} Tieren in der PL (vgl. Abbildung 14) konnte durch immunhistochemische Färbungen des Peritoneums belegt werden. Die Aufnahmen zum Zeitpunkt 4h und 8h Zymosan bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen zeigten vermehrt PNCs (Abbildung 15).

Um die PNC Bildung und die Leukozytenmigration weiter zu beleuchten, wurden verschiedene Selektine und Integrine, welche an der Formation der PNCs beteiligt sind, betrachtet.

3.2 Selektine

3.2.1 P-Selektin und L-Selektin

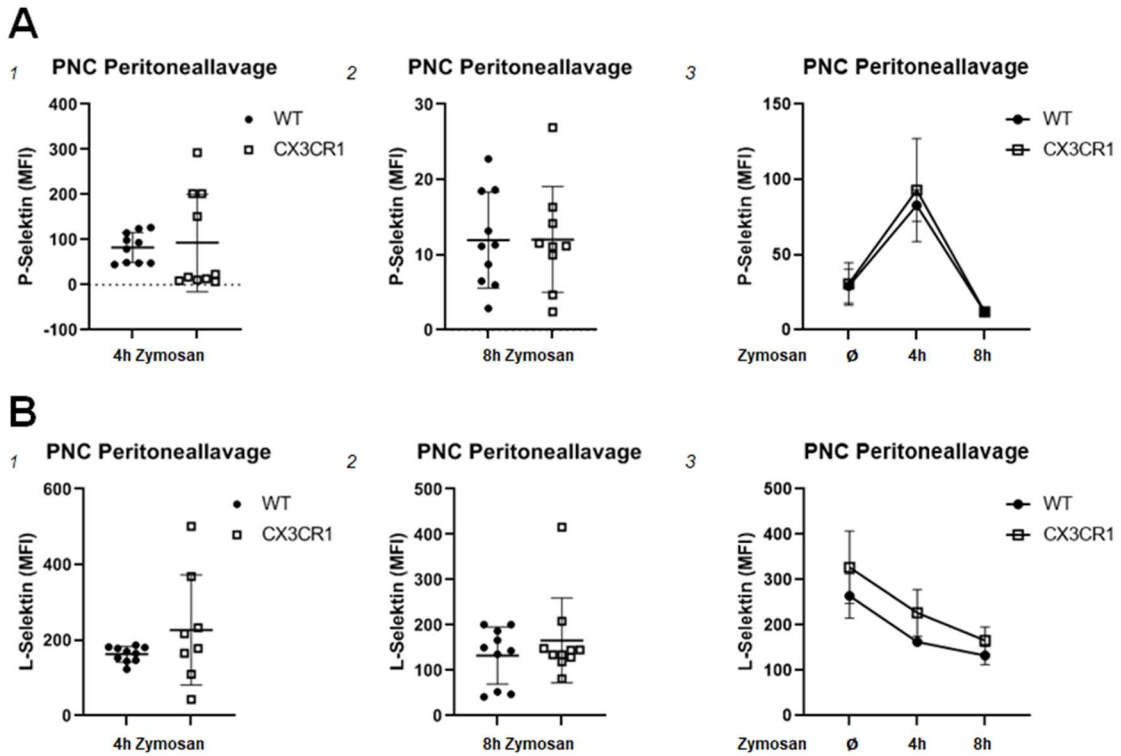


Abbildung 16: P-Selektin und L-Selektin auf PNCs in der PL

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von P-Selektin (**A**) und L-Selektin (**B**) auf Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNC) in der Peritoneallavage (PL) durch Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-}-Mäusen. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD (1, 2) sowie der zeitlichen Verläufe im Punktdiagramm \pm SEM (3). Statistischer Vergleich von zwei Gruppen mittels Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten. Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni Korrektur.

A1: 4h Zymosan, $n = 10/10$ (WT/CX3CR1^{-/-}). A2: 8h Zymosan, $n = 10/8$. A3: zeitlicher Verlauf
 B1: 4h Zymosan, $n = 10/8$. B2: 8h Zymosan, $n = 10/10$. B3: zeitlicher Verlauf

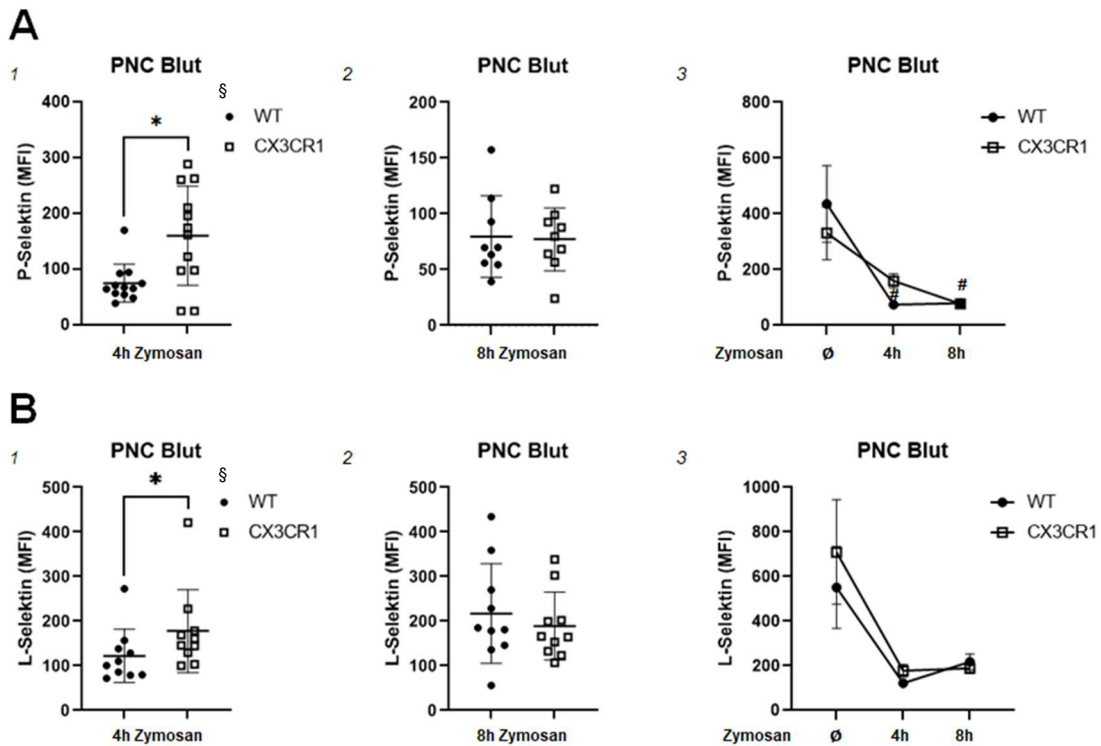


Abbildung 17: P-Selektin und L-Selektin auf PNCs im Blut

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von P-Selektin (**A**) und L-Selektin (**B**) auf Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNC) im Blut durch Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD (1, 2) sowie der zeitlichen Verläufe im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SEM (3). Statistischer Vergleich von zwei Gruppen mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte und Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (**P* < 0,05). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni Korrektur (#*P* < 0,05; # stimuliert vs. nicht-stimuliert).

A1: 4h Zymosan, *p* = 0,0100, *n* = 12/12 (WT/CX3CR1^{-/-}). A2: 8h Zymosan, *n* = 9/9. A3: zeitlicher Verlauf
 B1: 4h Zymosan, *p* = 0,0355, *n* = 10/10. B2: 8h Zymosan, *n* = 10/10. B3: zeitlicher Verlauf

§ Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

Die Expression des P-Selektins auf den PNCs wurde in der PL zum Zeitpunkt 4 Stunden sowohl bei WT Mäuse als auch bei CX3CR1^{-/-} Mäusen hochreguliert (Abbildung 16: A3), ein signifikanter Unterschied bestand nicht (Abbildung 16: A1). Vergleichend zur PL, ließ sich dieses Phänomen im Blut nicht nachweisen (Abbildung 17: A3). Signifikante Unterschiede in der P-Selektin und L-Selektin Expression 4 Stunden nach der Zymosan Injektion konnten im Blut (Abbildung 17: A1 + B1), jedoch nicht in der PL (Abbildung 16: A1 + B1) zwischen

den WT- und den CX3CR1^{-/-} Mäusen gezeigt werden. Bei Betrachtung der P- und L-Selektin Expression auf den PNCs 8 Stunden nach der Stimulation konnten keine signifikanten Unterschiede in den beiden Kompartimenten detektiert werden.

3.2.2 P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1

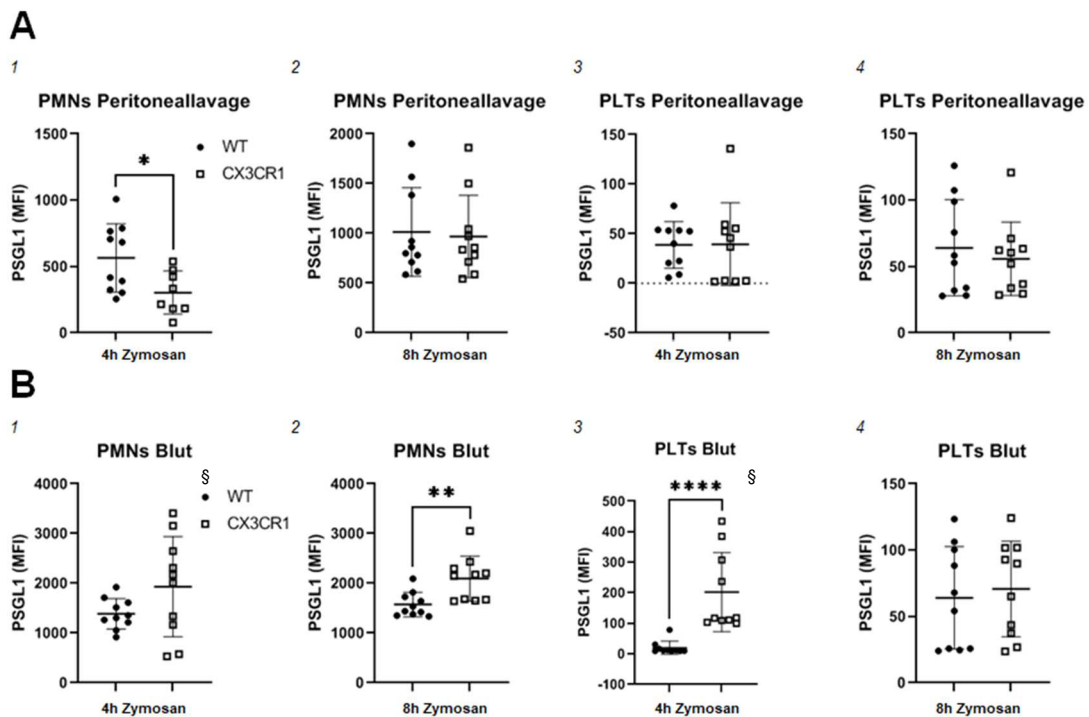


Abbildung 18: Expression von PSGL1 auf PMNs und PLTs

Durchflusszytometrische Bestimmung der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL1) Expression auf polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) und Thrombozyten (PLTs) in der Peritoneallave (**A**) und im Blut (**B**) vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen gemessen durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD. Statistischer Vergleich mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte und Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$).

A1: PMN 4h Zymosan, $p = 0,0245$, $n = 10/8$ (WT/CX3CR1^{-/-}). A2: PMN 8h Zymosan, $n = 10/10$.

A3: PLT 4h Zymosan, $n = 10/10$. A4: PLT 8h Zymosan, $n = 10/10$

B1: PMN 4h Zymosan, $n = 10/10$. B2: PMN 8h Zymosan, $p = 0,0049$, $n = 10/10$.

B3: PLT 4h Zymosan, $p < 0,0001$, $n = 10/10$. B4: PLT 8h Zymosan, $n = 10/10$

§ Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

Der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL1) konnte auf PMNs und PLTs mittels Durchflusszytometrie detektiert werden. Hierbei fiel auf, dass die PLTs der

CX3CR1^{-/-} Mäuse im Blut 4 Stunden nach der Zymosan Stimulation signifikant mehr PSGL1 exprimierten (Abbildung 18: B3). In der PL konnte zu diesem Zeitpunkt auf den PLTs kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abbildung 18: A3). Des Weiteren konnte ein signifikanter Unterschied in der PSGL1 Expression auf den PMNs im Blut zum Zeitpunkt 8 Stunden gezeigt werden (Abbildung 18: B2). Auf den PMNs in der PL der WT Mäuse konnte 4 Stunden nach der Stimulation eine signifikant gesteigerte PSGL1 Expression detektiert werden (Abbildung 18: A1). Die anderen Zeitpunkte wiesen keine signifikanten Unterschiede in der PSGL1 Expression auf.

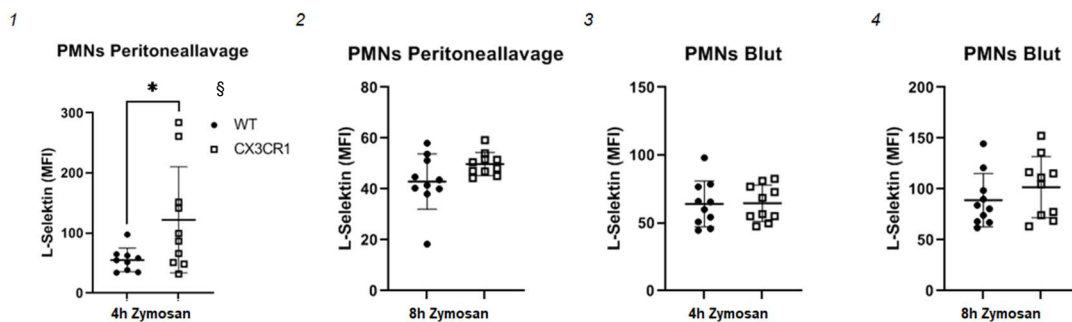


Abbildung 19: Expression von L-Selektin auf PMNs

Durchflusszytometrische Bestimmung der L-Selektin Expression auf polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) in der Peritoneallavage (1+2) und im Blut (3+4) gemessen durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert ± SD. Statistischer Vergleich mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte (**P* < 0,05).

1: 4h Zymosan, *p* = 0,0406, *n* = 9/10 (WT/CX3CR1^{-/-}). 2: 8h Zymosan, *n* = 10/10.

3: 4h Zymosan, *n* = 10/10. 4: 8h Zymosan, *n* = 10/10

§ Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

Weiterhin kann die erhöhte PNC Bildung bei CX3CR1^{-/-} Mäusen auf die vermehrte PSGL1 Expression auf den PLTs und der Interaktion mit L-Selektin der PMNs zurückgeführt werden. Die signifikant gesteigerte Expression von L-Selektin auf den PMNs in der PL bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen (Abbildung 19: 1) wirkt synergistisch und trägt zum Effekt der PNC Bildung bei.

3.3 Integrine

3.3.1 Integrin β_3 (CD61) und Integrin α_5 (CD49e)

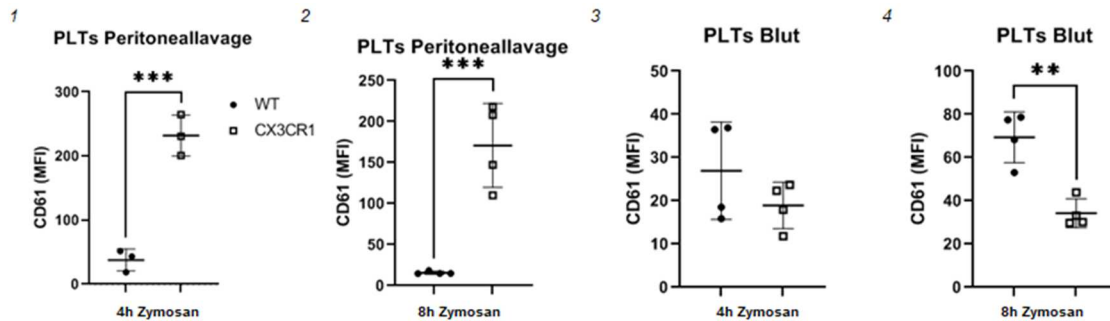


Abbildung 20: Integrin β_3 (CD61) auf PLTs

Durchflusszytometrische Bestimmung der Integrin β_3 (CD61) Expression auf Thrombozyten (PLTs) in der Peritoneallavage (1+2) und im Blut (3+4) gemessen durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD. Statistischer Vergleich mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte und Mann-Whitney Test für nicht-normalverteilte Werte (***P* < 0,01; ****P* < 0,001).

1: 4h Zymosan, *p* = 0,0007, *n* = 3/3 (WT/CX3CR1^{-/-}). 2: 8h Zymosan, *p* = 0,0009, *n* = 4/4.

3: 4h Zymosan, *n* = 4/4. 4: 8h Zymosan, *p* = 0,0020, *n* = 4/4

Um den Effekt der Leukozytenmigration tiefergehend zu erfassen, wurden die Expression von Integrinen auf den PLTs als wichtiger Bestandteil der Zell-Endothel-Interaktion untersucht. Das Integrin β_3 (CD61) auf den PLTs wurde bei den WT Mäusen 8 Stunden nach der Zymosan Stimulation im Vergleich zu den CX3CR1^{-/-} Mäusen im Blut vermehrt exprimiert (Abbildung 20: 4). Zum Zeitpunkt 4 Stunden konnte kein signifikanter Unterschied im Blut detektiert werden (Abbildung 20: 3). Bei den PLTs in der PL wurde zu beiden Zeitpunkten eine signifikant höhere Integrin β_3 Expression bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen nachgewiesen (Abbildung 20: 1+2). Das Integrin β_3 bildet mit dem Integrin α_5 (CD49e) ein Heterodimer und fungiert als Zelladhäsionsmolekül. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression des Integrin α_5 gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Die erhöhte Expression des Integrins β_3 auf den PLTs bei CX3CR1^{-/-} Mäusen in der PL deutet darauf hin, dass verstärkt PLTs mit dem Endothel interagieren können. Durch die Interaktion der PLTs mit den PMNs, kann hierdurch eine verstärkte Migration der PNCs erklärt werden.

3.4 Zytokine und Chemokine

Neben den Oberflächenproteinen wie den Selektinen und Integrinen wurden auch gelöste Proteine wie die Zytokine erfasst.

3.4.1 Tumornekrose-Faktor α und Interleukin 6

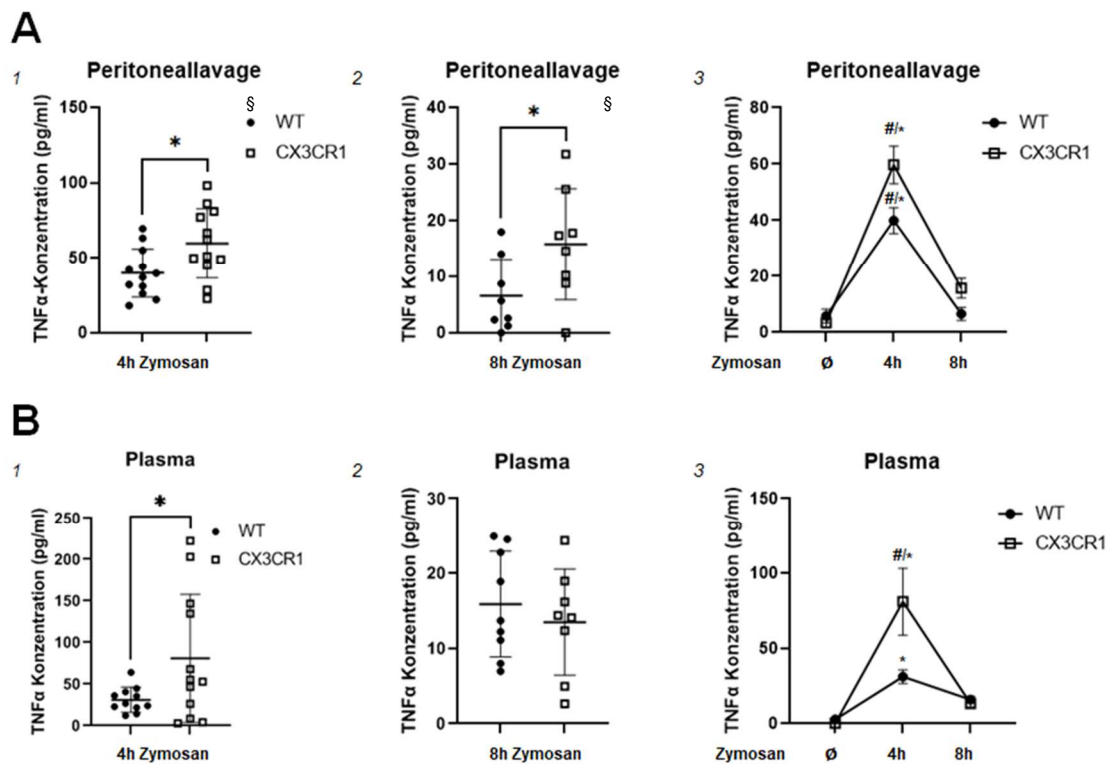


Abbildung 21: TNF α in PL und Plasma

Bestimmung der Tumornekrose-Faktor α (TNF α) Konzentration in der Peritoneallavage (**A**) und im Blutplasma (**B**) vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen mittels ELISA. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD (1, 2) sowie die zeitlichen Verläufe im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SEM (3). Statistischer Vergleich von zwei Gruppen mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte und Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (**P* < 0,05). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni Korrektur (#*P* < 0,05; # stimuliert vs. nicht-stimuliert, * WT vs. CX3CR1^{-/-}).

A1: 4h Zymosan, *p* = 0,0232, *n* = 12/12 (WT/CX3CR1^{-/-}). A2: 8h Zymosan, *p* = 0,0458, *n* = 8/8.

A3: zeitlicher Verlauf. B1: 4h Zymosan, *p* = 0,0473, *n* = 11/12. B2: 8h Zymosan, *n* = 9/8.

B3: zeitlicher Verlauf.

§ Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

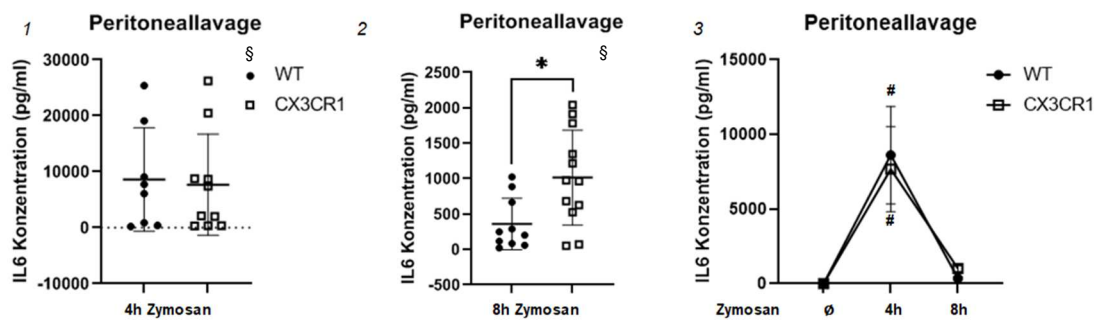


Abbildung 22: IL6 in der Peritoneallavage

Bestimmung der Interleukin 6 (IL6) Konzentration in der Peritoneallavage (PL) vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen mittels ELISA. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD (1, 2) sowie der zeitliche Verlauf im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SEM (3). Statistischer Vergleich von zwei Gruppen mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte (* $P < 0,05$). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni Korrektur (# $P < 0,05$: # stimuliert vs. nicht-stimuliert).

1: 4h Zymosan, $n = 8/10$ (WT/CX3CR1^{-/-}). 2: 8h Zymosan, $p = 0,0117$, $n = 10/12$. 3: zeitlicher Verlauf
 § Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

Der Tumornekrose-Faktor α (TNF α) und das Interleukin 6 (IL6) sind Zytokine und wichtige Mediatoren bei Inflammationsprozessen. Zum Zeitpunkt 4 Stunden zeigten sich im Plasma und in der PL signifikant höhere TNF α Konzentrationen bei CX3CR1^{-/-} Mäusen (Abbildung 21: A1 + B1). Acht Stunden nach der Stimulation ließ sich auch eine signifikant höhere TNF α Konzentration in der PL bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen messen (Abbildung 21: A2). Analog zur TNF α Konzentration, konnte zum Zeitpunkt 8 Stunden ebenfalls eine signifikant erhöhte IL6 Konzentration in der PL bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen registriert werden (Abbildung 22: 2).

3.4.2 ADAM10 und ADAM17

An dieser Stelle sollen die beiden Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 betrachtet werden, die neben der Freisetzung des Chemokins Fraktalkin, auch an der Freisetzung von TNF α und IL6 beteiligt sind (Abbildung 23: C).

Einhergehend mit den Ergebnissen der TNF α und IL6 Konzentrationen, konnte im Blut (Abbildung 23: B1) 4 Stunden nach der Stimulation bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen eine signifikant erhöhte Expression von ADAM10 auf den PMNs gezeigt werden. Des Weiteren konnte im Blut zum gleichen Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied der ADAM17 Expression gemessen werden (Abbildung 23: B3). Dieser war in der PL nicht vorhanden (Abbildung 23: A3). Zum Zeitpunkt 8 Stunden konnten keine Unterschiede in der Expression von ADAM10 und ADAM17 gezeigt werden. Die gesteigerten Expressionen von ADAM10 und ADAM17 bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen erklären die signifikanten Unterschiede der IL6 und TNF α Konzentrationen zum Zeitpunkt 8 Stunden in der PL (Abbildung 21: A2 und Abbildung 22: 2).

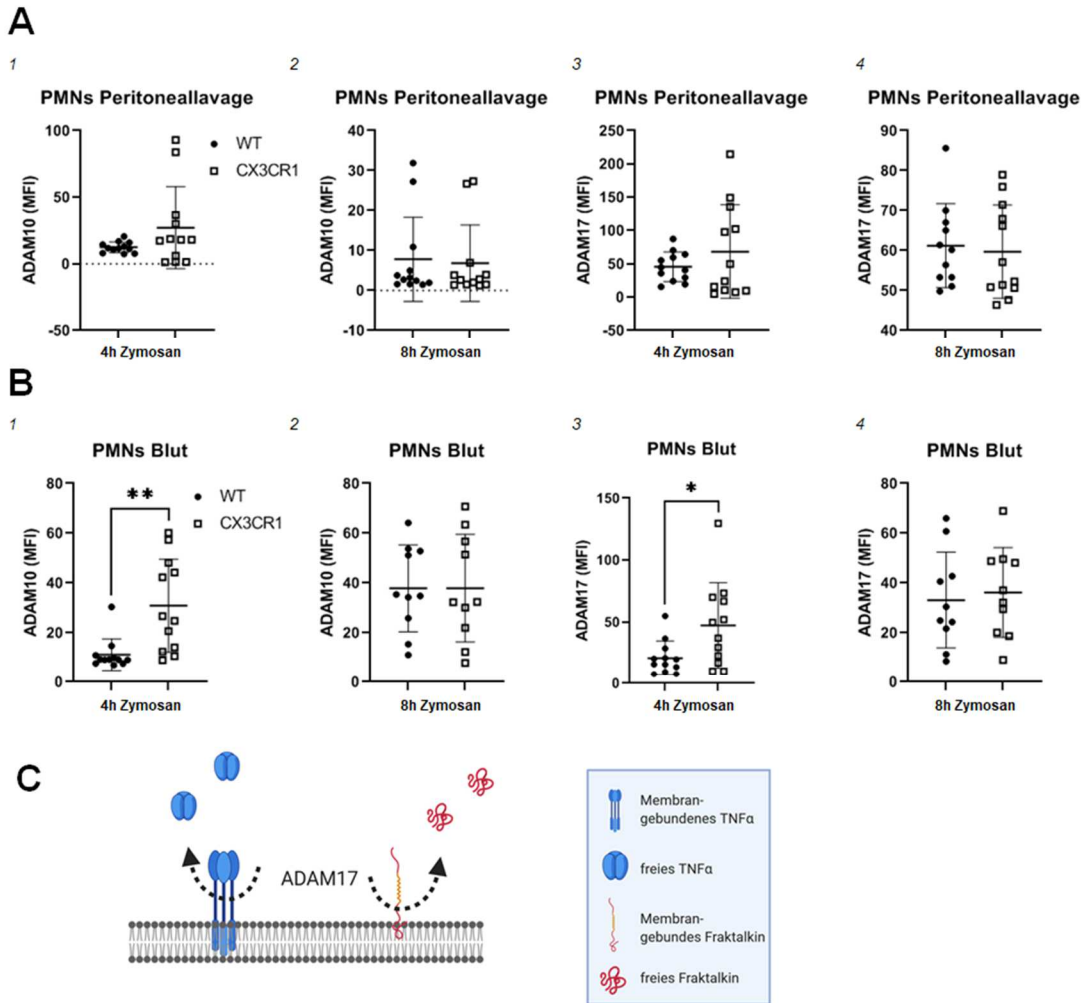


Abbildung 23: ADAM10 und ADAM17 auf PMNs

Durchflusszytometrische Bestimmung der Metalloproteasen ADAM10 (1+2) und ADAM17 (3+4) Expression auf polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) in der Peritoneallavage (**A**) und im Blut (**B**) vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert ± SD. Statistischer Vergleich mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte und Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (**P* < 0,05; ***P* < 0,01). **C** Schematische Darstellung der ADAM17 vermittelten Spaltung von TNFα und Fraktalkin von der Membran-gebundenen Form in die frei gelöste Form (Eigene Darstellung erstellt mit BioRender.com).

A1: 4h Zymosan, *n* = 12/12 (WT/CX3CR1^{-/-}). A2: 8h Zymosan, *n* = 12/12.

A3: 4h Zymosan, *n* = 12/12. A4: 8h Zymosan, *n* = 11/12

B1: 4h Zymosan, *p* = 0,0014, *n* = 12/12. B2: 8h Zymosan, *n* = 10/10.

B3: 4h Zymosan, *p* = 0,0205, *n* = 12/12. B4: 8h Zymosan, *n* = 10/10

3.4.3 Fraktalkin

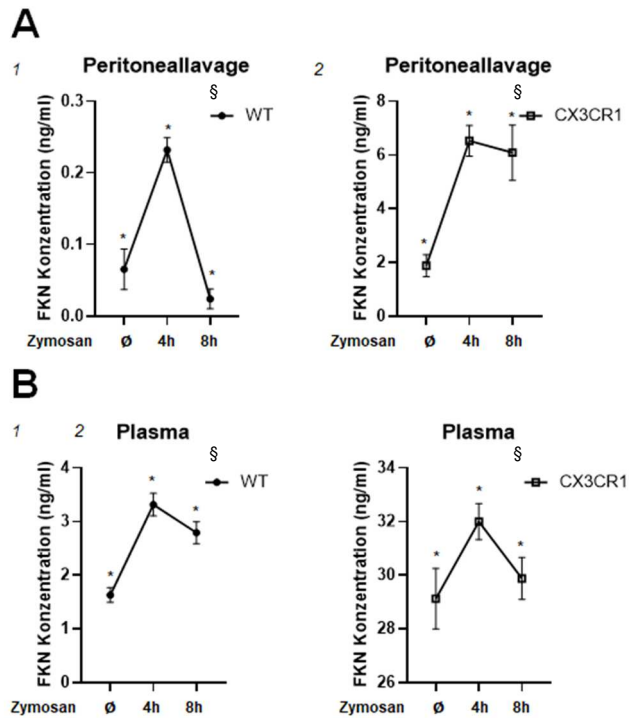


Abbildung 24: Fraktalkin in der PL und Plasma (Verlauf)

Bestimmung der Fraktalkin (FKN) Konzentration in der Peritoneallavage (**A**) und im Blutplasma (**B**) mittels ELISA. Darstellung der Ergebnisse getrennt nach Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SEM im zeitlichen Verlauf. Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni Korrektur (* $P < 0,05$; * WT vs. CX3CR1^{-/-}).

A1: zeitlicher Verlauf, Wildtyp. A2: zeitlicher Verlauf, CX3CR1^{-/-}. B1: zeitlicher Verlauf, Wildtyp. B2: zeitlicher Verlauf, CX3CR1^{-/-}. § Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

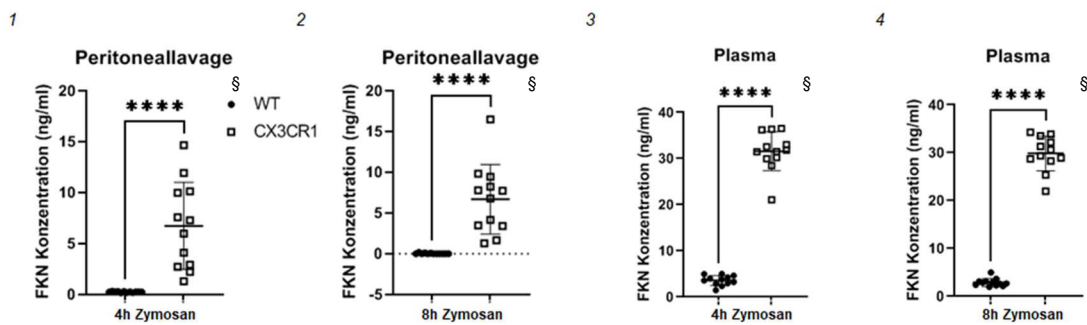


Abbildung 25: Fraktalkin in PL und Plasma

Bestimmung der Fraktalkin (FKN) Konzentration in der Peritoneallavage (1+2) und Blutplasma (3+4) vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen mittels ELISA. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD. Statistischer Vergleich mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte und Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (*****P* < 0,0001).

1: 4h Zymosan, *p* < 0,0001, *n* = 12/12 (WT/CX3CR1^{-/-}). 2: 8h Zymosan, *p* < 0,0001, *n* = 12/12.

3: 4h Zymosan, *p* < 0,0001, *n* = 12/12. 4: 8h Zymosan, *p* < 0,0001, *n* = 12/12

§ Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

Fraktalkin (FKN), der Hauptligand des CX3CR1 Rezeptors, wurde sowohl in der PL als auch im Plasma bei CX3CR1^{-/-} Mäusen hoch signifikant gesteigert freigesetzt (Abbildung 25).

Bei Betrachtung der Konzentrationsverläufe (Abbildung 24), lassen sich in beiden Gruppen und Kompartimenten ein Peak bei 4 Stunden erkennen. Die Konzentrationen des Fraktalkins entwickeln sich analog den Konzentrationen von TNF α und IL6 (vgl. Abbildung 21 und Abbildung 22). Des Weiteren konnten auch bei Mäusen ohne Stimulation signifikante Unterschiede detektiert werden.

Der Abfall des Fraktalkins zwischen 4 und 8 Stunden war in der PL bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen (Abbildung 24: A2) im Vergleich zu den WT Tieren geringer. Dies lässt sich mit deutlich höheren Fraktalkin Konzentrationen bei CX3CR1^{-/-} Mäusen (Abbildung 25: 1+2) vereinbaren.

3.4.4 C-X-C-Motiv Chemokin Ligand 1 und 2 (CXCL1 und CXCL2)

CXCL1 und CXCL2 als Liganden des CXCR2 Rezeptors sind die wichtigsten chemotaktischen Mediatoren der PMNs in der akuten Phase der Inflammation. Es wurden die Konzentrationen von CXCL1 und CXCL2 in der Peritoneallavage mittels ELISA gemessen.

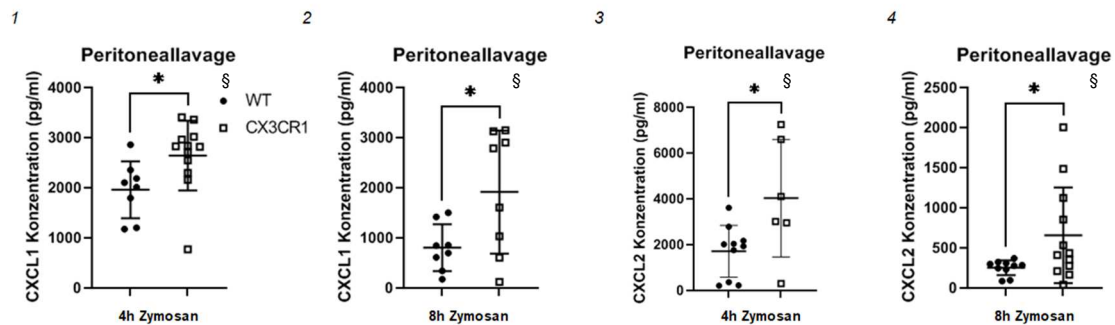


Abbildung 26: CXCL1 und CXCL2 in der PL

Bestimmung der CXCL1 (1+2) und CXCL2 (3+4) Konzentrationen in der Peritoneallavage vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen mittels ELISA. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD. Statistischer Vergleich mittels *t*-Test bei Normalverteilung der Werte (**P* < 0,05).

1: 4h Zymosan, *p* = 0,0333, *n* = 8/12 (WT/CX3CR1^{-/-}). 2: 8h Zymosan, *p* = 0,0316, *n* = 8/8.

3: 4h Zymosan, *p* = 0,0243, *n* = 10/6. 4: 8h Zymosan, *p* = 0,0457, *n* = 10/12.

§ Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

In der Peritoneallavage konnten sowohl 4 Stunden als auch 8 Stunden nach der Zymosan Injektion bei den CX3CR1^{-/-} Tieren signifikant erhöhte Konzentrationen von CXCL1 als auch von CXCL2 nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 26). Auffällig hierbei ist ein Peak der CXCL2 Konzentration zum Zeitpunkt 4 Stunden.

Bei Betrachtung der PMN Zahlen in der Peritoneallavage (vgl. Abbildung 12: A3) in Verbindung mit der CXCL2 Konzentration, kann der weitere Anstieg der PMNs zum Zeitpunkt 8 Stunden bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen durch den 4 Stunden Peak der CXCL2 Konzentration erklärt werden. Im Gegensatz hierzu kommt es bei den WT Tieren zu einer Abnahme der PMN Zahl 8 Stunden nach der Stimulation im Vergleich zum Zeitpunkt 4 Stunden, was einhergeht mit einer erheblich geringeren CXCL2 Konzentration bei 4 Stunden.

3.4.5 C-C Chemokin Rezeptor Typ 2 (CCR2)

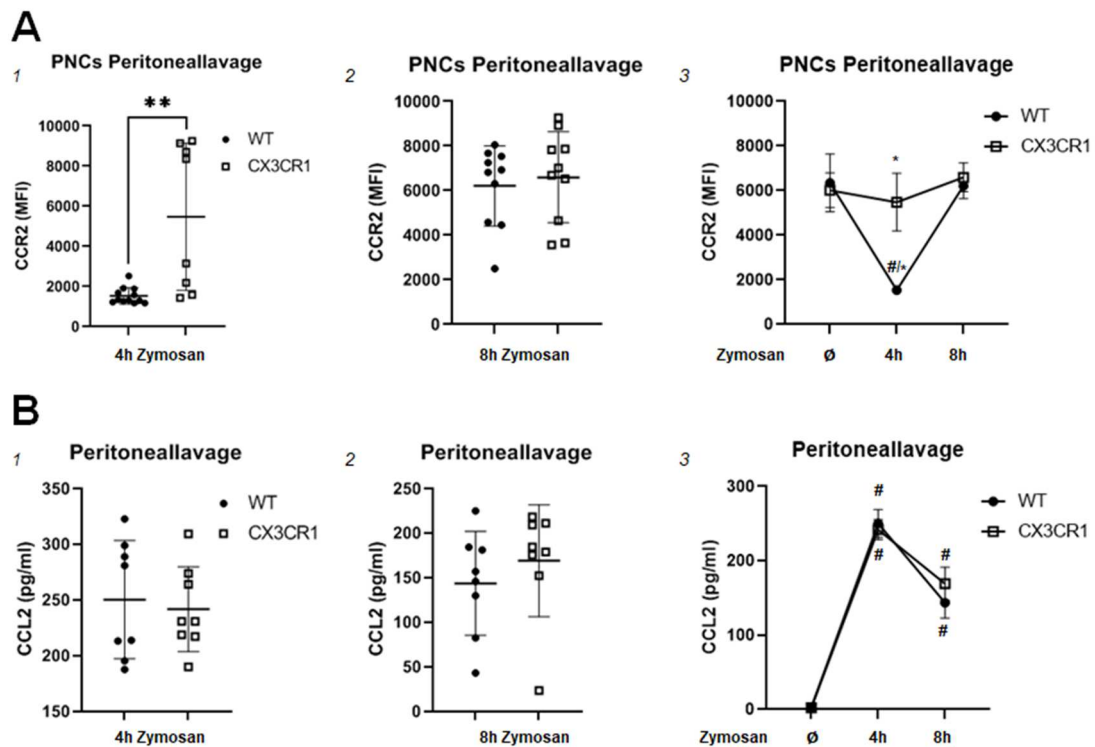


Abbildung 27: CCR2 auf den PNCs und CCL2 in der PL

A Durchflusszytometrische Bestimmung der C-C Chemokin Rezeptor Typ 2 (CCR2) Expression auf den Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNCs) in der Peritoneallavage (PL) gemessen durch die mittlere Fluoreszenzintensität vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen. **B** Bestimmung der C-C Chemokin Ligand 2 (CCL2) Konzentration in der PL vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen mittels ELISA.

Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD (1, 2) sowie der zeitlichen Verläufe im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SEM (3). Statistischer Vergleich von zwei Gruppen mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte und Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (***P* < 0,01). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni Korrektur (#*P* < 0,05; # stimuliert vs. nicht-stimuliert, * WT vs. CX3CR1^{-/-}).

A1: 4h Zymosan, *p* = 0,0022, *n* = 12/8 (WT/CX3CR1^{-/-}). A2: 8h Zymosan, *n* = 10/10. A3: zeitlicher Verlauf.
B1: 4h Zymosan, *n* = 8/8. B2: 8h Zymosan, *n* = 8/8. B3: zeitlicher Verlauf.

Der C-C Chemokin Rezeptor Typ 2 (CCR2), der ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Chemotaxis hat, konnte auf PNCs nachgewiesen werden. Bei Stimulation kam es zum Zeitpunkt 4 Stunden zur signifikanten Abnahme der Rezeptorexpression bei den WT Tieren (Abbildung 27: A1+3), wobei die Rezeptorexpression bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen nahezu konstant blieb. Im zeitlichen Verlauf der Infektion relativierte sich der Unterschied wieder und zum Zeitpunkt 8 Stunden konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abbildung 27: A2).

Der C-C Chemokin Ligand 2 (CCL2) zeigte ein Maximum zum Zeitpunkt 4 Stunden (Abbildung 27: B3). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT und CX3CR1^{-/-} Mäusen gemessen werden (Abbildung 27: B1+2).

Neben den Zellinteraktionen, vermittelt durch Selektine und Interleukine, wurde auch die Myeloperoxidase Aktivität als lysosomales Enzym der PMNs im Rahmen des Entzündungsprozesses untersucht.

3.5 Myeloperoxidase

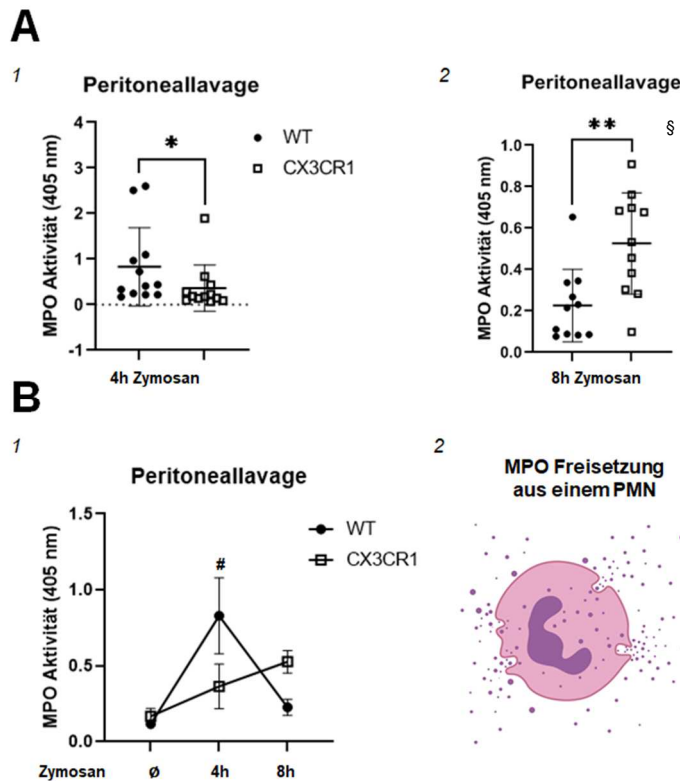


Abbildung 28: Myeloperoxidase Aktivität in der PL

Bestimmung der Myeloperoxidase (MPO) Aktivität in der Peritoneallavage vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen. Photometrische Messung mit einer Wellenlänge von 405 nm. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert ± SD (**A**) sowie der zeitliche Verlauf im Punktdiagramm mit Mittelwert ± SEM (**B1**). Statistischer Vergleich von zwei Gruppen mittels Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni Korrektur (# $P < 0,05$; # stimuliert vs. nicht-stimuliert). **B2** Vereinfachte Darstellung der MPO Freisetzung aus einem stimulierten PMN (Darstellung mit BioRender.com).

A1: 4h Zymosan, $p = 0,0205$, $n = 12/12$ (WT/CX3CR1^{-/-}). 2: 8h Zymosan, $p = 0,0024$, $n = 11/11$.

B1: zeitlicher Verlauf. § Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

Die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) von PMNs in der PL zeigte bei 4 Stunden eine signifikant höhere Aktivität bei den WT Tieren als bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen (Abbildung 28: A1). Zum Zeitpunkt 8 Stunden war die MPO Aktivität bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen signifikant höher (Abbildung 28: A2), wohingegen die MPO Aktivität der WT Tiere nahe dem Ausgangswert lag (Abbildung 28: B1). Zum Teil kann das Überwiegen der MPO Aktivität bei den

CX3CR1^{-/-} Mäusen durch die signifikant gesteigerte PMN Zahl zum Zeitpunkt 8 Stunden erklärt werden (vgl. Abbildung 12).

3.6 Proteinbestimmung

3.6.1 Proteinbestimmung in der Peritoneallavage

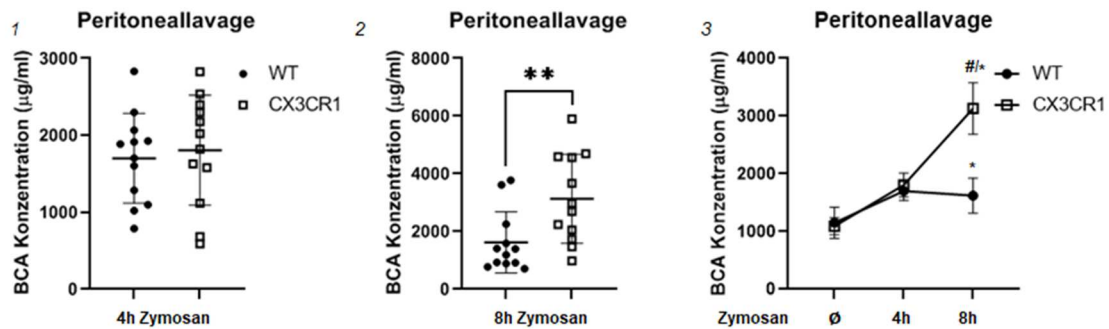


Abbildung 29: Proteinbestimmung in der Peritoneallavage

Bestimmung der Proteinkonzentration in der Peritoneallavage vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen durch einen Bicinchoninsäure-Assay (BCA). Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD (1+2) sowie der zeitliche Verlauf im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SEM (3). Statistischer Vergleich von zwei Gruppen mittels Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (**P < 0,01). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni Korrektur (#*P < 0,05: # stimuliert vs. nicht-stimuliert, * WT vs. CX3CR1^{-/-}).

1: 4h Zymosan, n = 12/12 (WT/CX3CR1^{-/-}). 2: 8h Zymosan, p = 0,0056, n = 12/12. 3: zeitlicher Verlauf.

Der Nachweis von Proteinen, insbesondere von Albumin, in der PL als indirekter Indikator für eine gesteigerte Gefäßpermeabilität im Rahmen des Entzündungsprozesses, zeigte nach 4 Stunden keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 29: 1). Zum Zeitpunkt 8 Stunden konnte ein signifikanter Unterschied detektiert werden, wobei die CX3CR1^{-/-} Mäuse eine signifikant erhöhte Proteinkonzentration in der PL aufwiesen (Abbildung 29: 2). Bei den WT Tieren stagnierte die Proteinkonzentration im Verlauf, sodass hier von einer Remission des Endothelschadens auszugehen ist (vgl. Abbildung 29: 3). Im Gegensatz dazu persistiert bzw. verstärkt sich die Schädigung bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen, sodass die Proteinkonzentration im Verlauf weiter zunahm.

3.6.2 Zelluläre Signalkaskaden

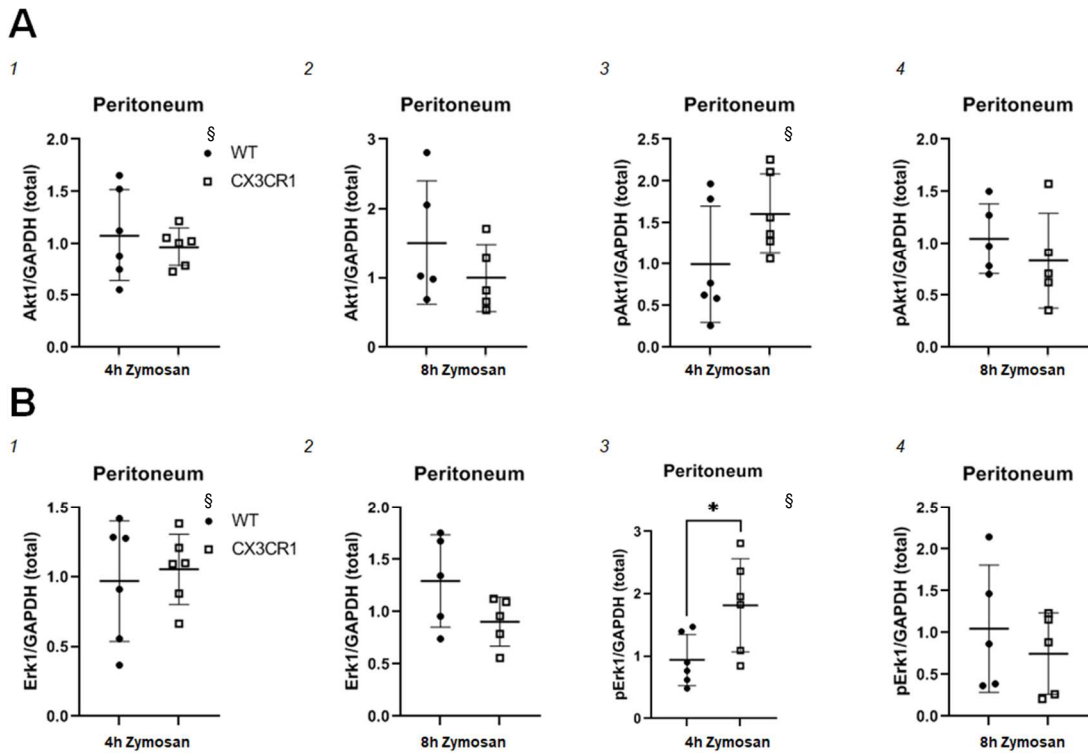


Abbildung 30: zelluläre Signalkaskaden Akt1 und Erk1

Bestimmung der Proteinkonzentration von Akt1 (Serin/Threonin-Protein Kinase), Phospho-Akt1 (beide Proteinkinase B Signalweg) (**A**), Erk1 (extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1) und Phospho-Erk1 (beide MAP-Kinase Signalweg) (**B**) im Peritoneum vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen durch Western Blots. Darstellung der Ergebnisse nach Normalisierung mit der GAPDH im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD. Statistischer Vergleich mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte (* $P < 0,05$).

A1: 4h Zymosan, $n = 6/6$ (WT/CX3CR1^{-/-}). A2: 8h Zymosan, $n = 5/5$. A3: 4h Zymosan, $n = 6/6$. A4: 8h Zymosan, $n = 5/5$. B1: 4h Zymosan, $n = 6/6$. B2: 8h Zymosan, $n = 5/5$. B3: 4h Zymosan, $n = 5/5$, $p = 0,03$. B4: 8h Zymosan, $n = 5/5$. § Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

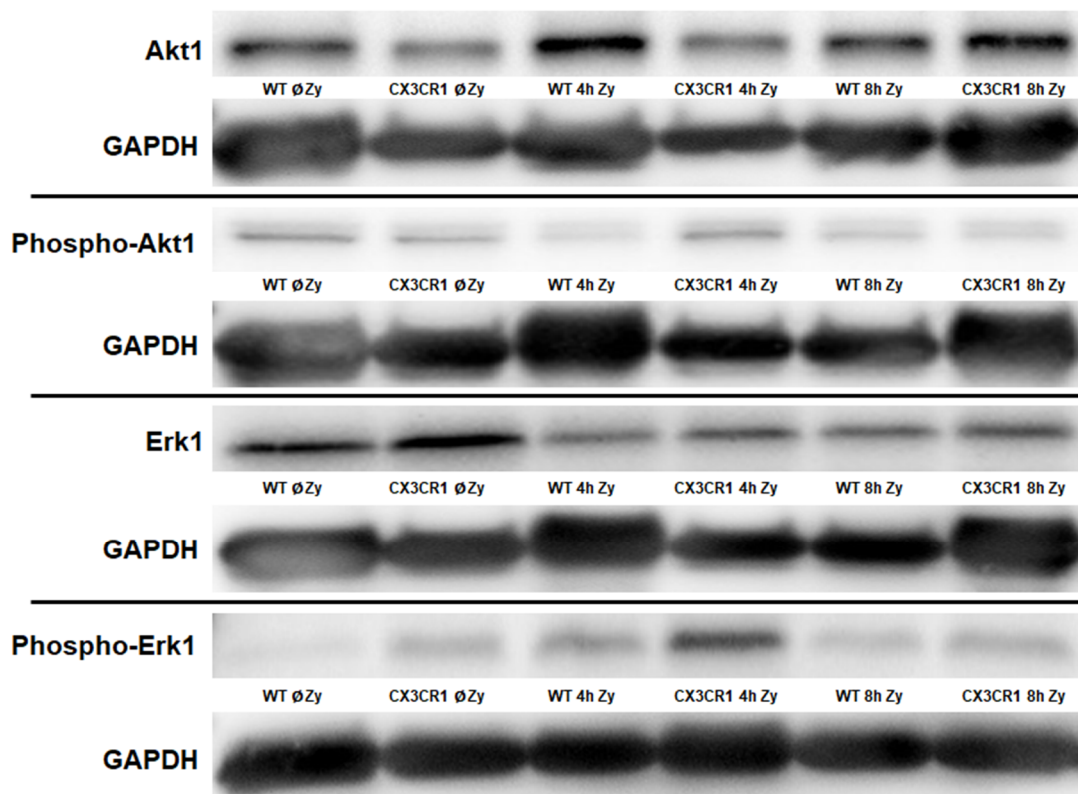


Abbildung 31: Western Blots

Darstellung der Western Blots von den peritonealen Proteinisolaten Akt1, Phospho-Akt1 (Proteinkinase B Signalweg), Erk1 und Phospho-Erk1 (MAP-Kinase Signalweg) mit GAPDH vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen ohne Zymosan sowie 4h und 8h nach der Zymosan-Injektion. Exemplarische Auswahl aus n = 5-6 pro Gruppe.

Zelluläre Signalkaskaden wie beispielsweise der Proteinkinase B Signalweg (Akt1 bzw. Phospho-Akt1) oder der MAP-Kinase Signalweg (Erk1 bzw. Phospho-Erk1) haben wichtige Funktionen in der Regulation der Genexpression, der Zellproliferation, der Zellmigration und der Chemotaxis. Durch Phosphorylierung werden diese Signalkaskaden aktiviert bzw. inaktiviert. Im inaktivem, nicht-phosphoryliertem Zustand konnten bei Betrachtung von Akt1 und Erk1 keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT Tieren und den CX3CR1^{-/-} Tieren detektiert werden (Abbildung 30: A1+2, B1+2). Ein signifikant gesteigerter aktivierter MAP-Kinase Signalweg konnte 4 Stunden nach Zymosan Injektion bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen gezeigt werden (Abbildung 30: B3, Abbildung 31). Acht

Stunden nach Zymosan Injektion konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden (Abbildung 30: A4, B4).

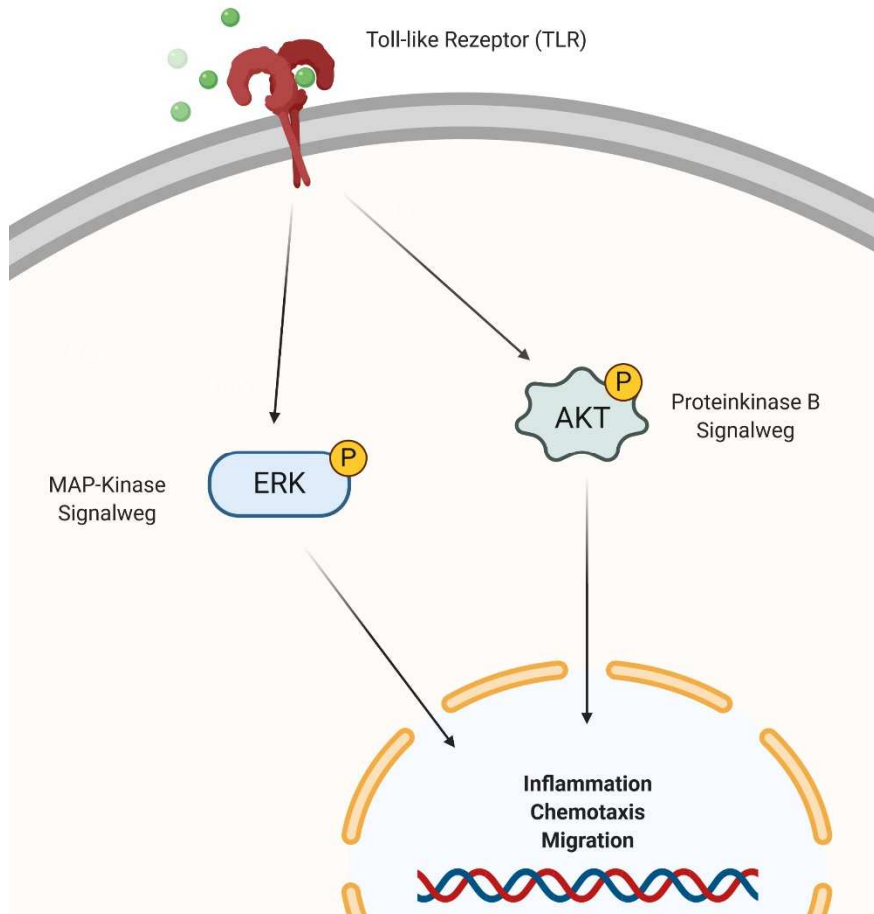


Abbildung 32: MAP-Kinase und Proteinkinase B Signalweg

Vereinfachte Darstellung der Toll-like Rezeptor vermittelten Aktivierung des MAP-Kinase (*engl.: mitogen-activated protein kinase*) Signalwegs mit der extrazellulären Signal-regulierten Kinase (ERK) und des Proteinkinase B Signalwegs mit der Serin/Threonin Kinase (AKT) im peritonealen Gewebe in der akuten Inflammation. (Eigene Darstellung erstellt mit BioRender.com)

3.7 Genexpression

Um die Thematik umfassender zu betrachten, wurde die Expression von relevanten Genen im Peritoneum mit Hilfe der PCR näher untersucht. Die nachfolgende Heatmap (Abbildung 33) soll hierzu einen Überblick geben.

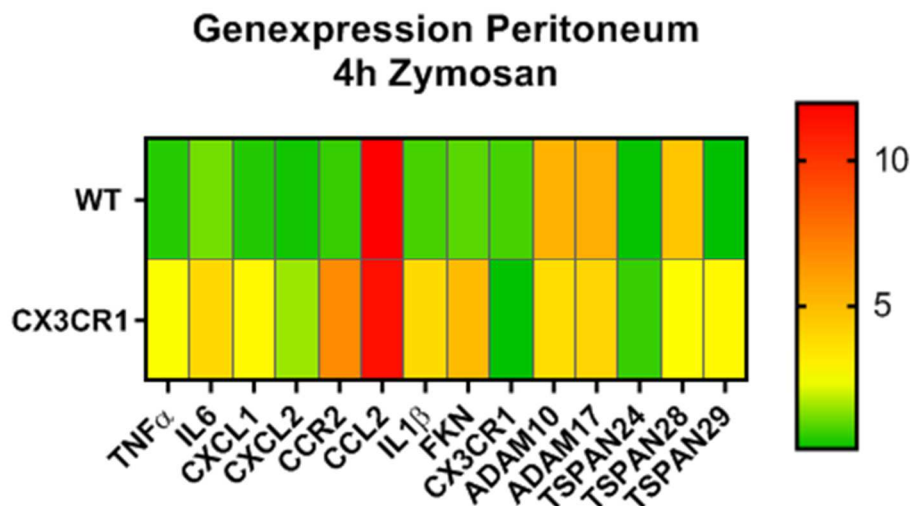


Abbildung 33: Heatmap zur Übersicht der Genexpression im Peritoneum

Heatmap-Darstellung der Gen-Expression von mit der FKN-CX3CR1-Achse assoziierten Proteine im peritonealen Gewebe. Verglichen wurde 4 Stunden nach der Zymosan Injektion Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäuse. In der Heatmap wurden die Mittelwerte farblich kodiert.

Tumornekrose Faktor α (TNF α): 12/12 (n-Zahl: WT/CX3CR1^{-/-}); Interleukin 6 (IL6): 12/12; C-X-C Motiv Chemokin Ligand (CXCL) 1: 12/12; CXCL2: 12/12; C-C Chemokin Rezeptor 2 (CCR2): 12/12; C-C Chemokin Ligand 2 (CCL2): 7/8; Interleukin 1 β (IL1 β): 12/12; Fraktalkin (FKN): 12/12; CX3 Chemokin Rezeptor 1 (CX3CR1): 12/12; A Disintegrin und Metalloproteinase Domäne-enthaltendes Protein (ADAM)10: 6/6; ADAM17: 6/6; Tetraspanin (TSPAN) 24: 6/6; TSPAN28: 6/6; TSPAN29: 5/5

Im Folgenden soll eine Auswahl dieser Gene näher betrachtet werden.

3.7.1 TNF α und IL6

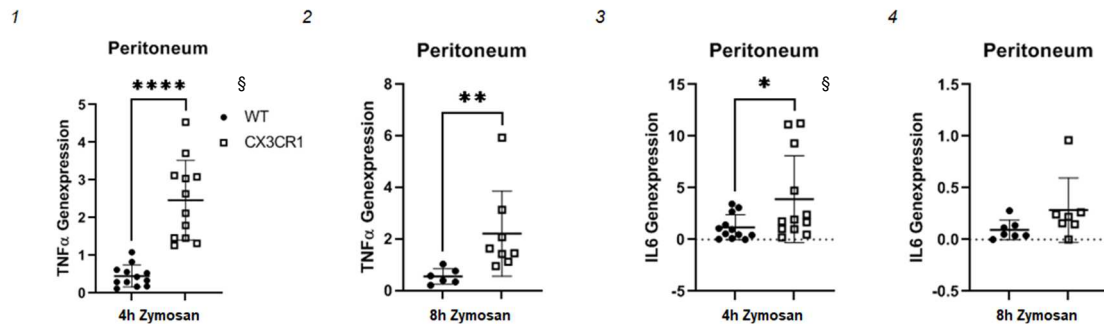


Abbildung 34: Genexpression TNF α und IL6

Bestimmung der Tumornekrose Faktor α (TNF α) [1+2] und Interleukin 6 (IL6) [3+4] Genexpressionen im peritonealen Gewebe vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen mittels PCR. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD. Statistischer Vergleich mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte und Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (**P* < 0,05; ***P* < 0,01; *****P* < 0,0001).

1: 4h Zymosan, *p* < 0,0001, *n* = 12/12 (WT/CX3CR1^{-/-}). 2: 8h Zymosan, *p* = 0,0013, *n* = 6/8.

3: 4h Zymosan, *p* = 0,0424, *n* = 12/12. 4: 8h Zymosan, *n* = 7/7

§ Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

Die Genexpression der Zytokine Tumornekrose Faktor α (TNF α) und Interleukin 6 (IL6) im Peritoneum zeigte signifikante Unterschiede zwischen den WT- und CX3CR1^{-/-} Mäusen. Als Zytokine der Akuten Phase einer Entzündungsreaktion konnte zum Zeitpunkt 4 Stunden sowohl beim TNF α (Abbildung 34: 1) als auch beim IL6 (Abbildung 34: 3) eine signifikant erhöhte Genexpression bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen detektiert werden. Besonders beim IL6 war ein Abfall der Expression zum Zeitpunkt 8 Stunden im Vergleich zu 4 Stunden zu verzeichnen (vgl. Abbildung 34: 4).

Die erhöhte Genexpression im Gewebe resultierte verzögert in signifikant erhöhte TNF α und IL6 Konzentrationen in der PL zum Zeitpunkt 8 Stunden (vgl. Abbildung 21 und Abbildung 22). Acht Stunden nach der Stimulation konnte eine signifikant erhöhte Expression des TNF α Gens detektiert werden (Abbildung 34: 2).

3.7.2 CXCL1 und CXCL2

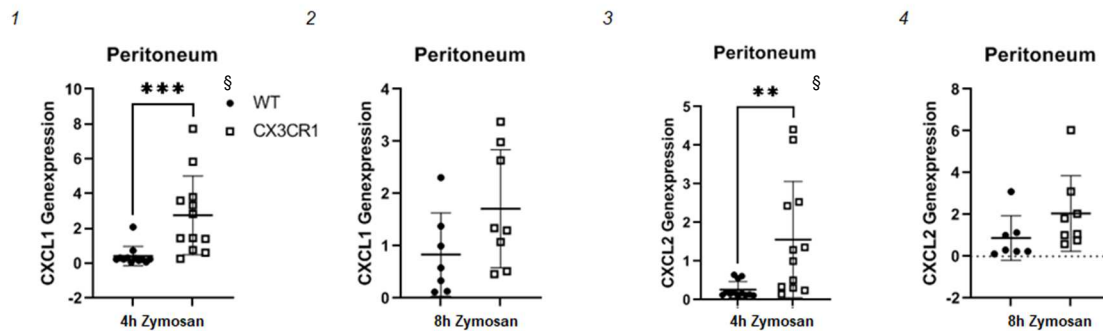


Abbildung 35: Genexpression von CXCL1 und CXCL2 im Peritoneum

Bestimmung der C-X-C Motiv Chemokin Ligand 1 (CXCL1) [1+2] und C-X-C Motiv Chemokin Ligand 2 (CXCL2) [3+4] Genexpressionen im peritonealen Gewebe vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen mittels PCR. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD. Statistischer Vergleich mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte und Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (***P* < 0,01; ****P* < 0,001).

1: 4h Zymosan, *p* = 0,0001, *n* = 12/12 (WT/CX3CR1^{-/-}). 2: 8h Zymosan, *n* = 7/8.

3: 4h Zymosan, *p* = 0,0014, *n* = 12/12. 4: 8h Zymosan, *n* = 7/8

§ Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

Die Expressionen der Gene für CXCL1 und CXCL2 im Peritoneum zeigten zum Zeitpunkt 4 Stunden eine signifikante Steigerung bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen (Abbildung 35: 1+3). Zum Zeitpunkt 8 Stunden konnte bei beiden Genen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abbildung 35: 2+4). Die erhöhten Genexpressionen von CXCL1 und CXCL2 lassen sich vereinbaren mit den erhöhten Chemokin Konzentrationen bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen in der PL (vgl. Abbildung 26).

3.7.3 Fraktalkin und CX3CR1

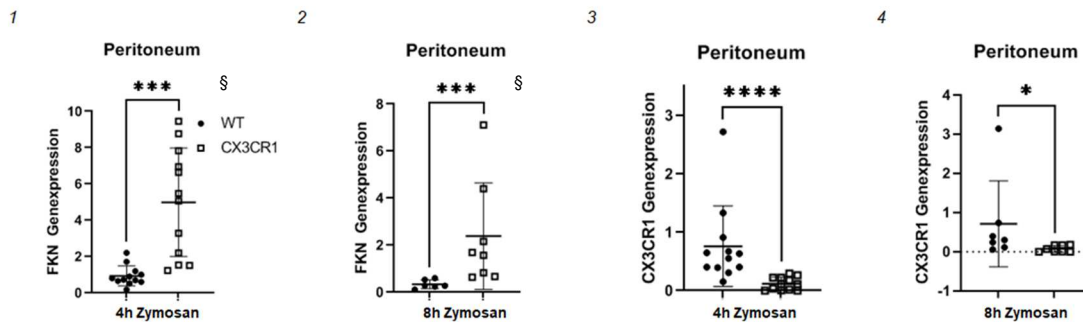


Abbildung 36: Genexpression von Fraktalkin und CX3CR1 im Peritoneum

Bestimmung der Fraktalkin (FKN) [1+2] und CX3C Chemokin Rezeptor 1 (CX3CR1) [3+4] Genexpressionen im peritonealen Gewebe vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen mittels PCR. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD. Statistischer Vergleich mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei Normalverteilung der Werte und Mann-Whitney Test bei nicht-normalverteilten Werten (**P* < 0,05; ****P* < 0,001, *****P* < 0,0001).

1: 4h Zymosan, *p* = 0,0001, *n* = 12/12 (WT/CX3CR1^{-/-}). 2: 8h Zymosan, *p* = 0,0007, *n* = 6/8.

3: 4h Zymosan, *p* < 0,0001, *n* = 12/12. 4: 8h Zymosan, *p* = 0,0140, *n* = 7/8

§ Daten in Publikation enthalten (siehe Kapitel 8)

Vergleichbar zu den erhöhten Fraktalkin Konzentrationen in der PL und zum Blutplasma (vgl. Abbildung 25) konnte auch im Peritoneum eine signifikant gesteigerte Expression des Fraktalkin Gens bei CX3CR1^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 36: 1+2). Hierbei ist von einer kompensatorischen Hochregulation des Fraktalkins durch das Fehlen des Rezeptors auszugehen, da auch bei nicht-stimulierten CX3CR1^{-/-} Mäusen eine signifikant höhere FKN Genexpression gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Das Fehlen des CX3CR1 Rezeptors konnte durch die fehlende Genexpression in CX3CR1^{-/-} Mäusen bestätigt werden (Abbildung 36: 3+4). Einhergehend mit der Genexpression von TNF α und IL6 konnte beim Fraktalkin das Maximum zum Zeitpunkt 4 Stunden detektiert werden (vgl. Abbildung 34: 1+3).

3.7.4 CCR2 und CCL2

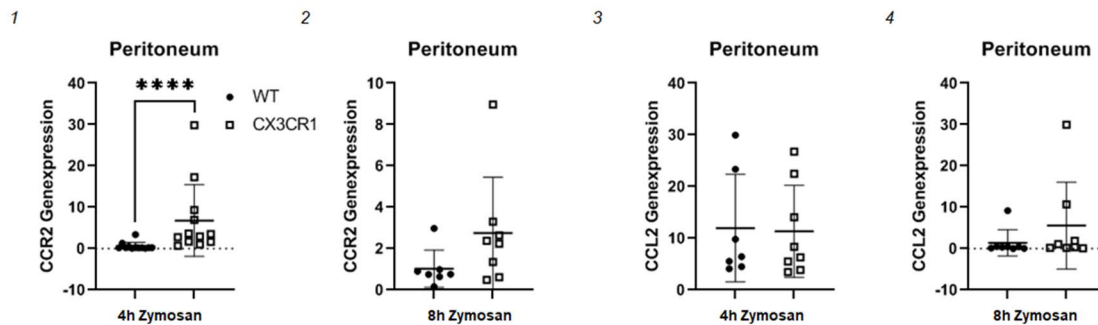


Abbildung 37: Genexpression von CCR2 und CCL2 im Peritoneum

Bestimmung der C-C Chemokinrezeptor 2 (CCR2) [1+2] und C-C Chemokin Ligand 2 (CCL2) [3+4] Genexpression im peritonealen Gewebe vergleichend zwischen Wildtyp (WT)- und CX3CR1^{-/-} Mäusen mittels PCR. Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert \pm SD. Statistischer Vergleich mittels Mann-Whitney Test bei nicht normal-verteilten Werten (**** $P < 0,0001$).

1: 4h Zymosan, $p < 0,0001$, $n = 12/12$ (WT/CX3CR1^{-/-}). 2: 8h Zymosan, $n = 7/8$. 3: 4h Zymosan, $n = 7/8$. 4: 8h Zymosan, $n = 8/8$.

Die Genexpression des C-C Chemokin-Rezeptors 2 (CCR2) im Peritoneum zeigte zum Zeitpunkt 4 Stunden eine signifikante Steigerung der Expression bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen (Abbildung 37: 1). Dieser Unterschied konnte zum Zeitpunkt 8 Stunden nicht signifikant nachgewiesen werden (Abbildung 37: 2).

Beim C-C Chemokin Liganden 2 (CCL2) konnten zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Genexpression detektiert werden (Abbildung 37: 3+4). Dies korreliert mit den gemessenen CCL2 Konzentration in der Peritoneallavage (vgl. Abbildung 27: B).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss des CX3CR1 Rezeptors auf die PNC Bildung untersucht. Das hierfür verwendete Modell der Zymosan-induzierte Peritonitis ist ein etabliertes Modell [132]. Auf mehreren Ebenen wurde die akute Phase der Inflammation beleuchtet: Die Genexpression im Peritoneum, intrazelluläre Signalkaskaden, das Oberflächenprofil der Zellen im Blut und in der PL. Des Weiteren wurden die Zytokin Konzentrationen im Plasma und in der PL sowie die Verteilung der Zellen in den einzelnen Kompartimenten betrachtet.

Die klinische Relevanz einer Mutation des CX3CR1 Rezeptors bei Menschen wurde durch die Entdeckung der zwei Polymorphismen T280M und V249I und deren Bedeutung im Rahmen einer HIV-Infektion, eines akuten Koronarsyndrom sowie einer Candida Infektion bereits gezeigt [133, 109, 108]. Bei HIV-Patienten, die den homozygoten CX3CR1 Haplotyp I249-M280 aufweisen, konnte eine schnellere Progression der HIV-Infektion detektiert werden [108]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Patienten mit dem CX3CR1 I249 und M280 Polymorphismus ein reduziertes Risiko für ein akutes Koronarsyndrom haben [109, 134]. Bei Patienten mit heterozygotem CX3CR1 I249 Polymorphismus konnten während des akuten Koronarsyndroms erhöhte Fraktalkin- und C-reaktives Protein Konzentrationen im Blut gemessen werden [135]. Bei Patienten mit dem Polymorphismus CX3CR1 M280 konnte der Haplotyp als Risikofaktor für eine disseminierte Kandidose identifiziert werden [133].

4.1 PMN Zahlen

Im Rahmen der Peritonitis konnten in der akuten Entzündungsphase 8 Stunden nach der Zymosan Injektion bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen vermehrt PMNs in der PL nachgewiesen werden (vgl. Absatz 3.1.2). Gleichartige Zellzahlverläufe konnten auch durch eine andere Arbeitsgruppe im Caecum-Ligation und Punktions-Peritonitismodell (CLP) erhoben werden [136]. Eine gesteigerte PMN Zahl bei CX3CR1^{-/-} Mäusen konnte auch in der Niere bei der Angiotensin-II induzierten Hypertension nach mehreren Tagen Stimulation gezeigt werden

[103]. Weiterhin konnte bei der systemischen *Candida albicans* Infektion im mehrtägigen Verlauf signifikant erhöhte PMN Zahlen in der Niere bei *CX3CR1*^{-/-} Mäusen detektiert werden [133]. Vergleichbar mit den PMN Zahlen, konnten bei der LPS-induzierten Peritonitis bei den *CX3CR1*^{-/-} Tieren eine signifikant gesteigerte Monozyten-Zahl im Peritoneum nachgewiesen werden [137]. Entgegen diesen Erkenntnissen wurden bei den *CX3CR1*^{-/-} Mäusen mit hypoxischer pulmonaler Hypertension bedingter Inflammation keine Unterschiede in der PMN Zahl im Lungengewebe gesehen [138]. Dies lässt sich vermutlich durch die Abwesenheit eines exogenen Pathogens erklären.

4.2 PNC Bildung

Sowohl im Blut als auch in der PL konnten bei den *CX3CR1*^{-/-} Mäusen eine signifikant höhere Zahl an PNCs beobachtet werden (vgl. Absatz 3.1.3). Hieraus kann man schlussfolgern, dass das Fehlen des *CX3CR1* Rezeptors die PNC Bildung als auch die PNC Migration begünstigt. Einerseits kann dies durch vermehrte L-Selektin und P-Selektin Expressionen auf den PNCs im Blut erklärt werden (vgl. Absatz 3.2.1). Andererseits konnten auf den PLTs und den PMNs der *CX3CR1*^{-/-} Tiere mehr PSGL1 nachgewiesen werden (vgl. Absatz 3.2.2), was ebenfalls zur gesteigerten PNC Bildung beitragen kann.

Andere Arbeitsgruppen konnten im Peritonitismodell zeigen, dass L-Selektin-defiziente Mäuse eine gehemmte PMN Migration aufweisen, sowie ein vermindertes Rolling an der Gefäßwand stattfindet [139]. In anderen Modellen konnte die verminderte PMN Migration bei Fehlen des L-Selektins bestätigt werden, jedoch kein Effekt auf das Rolling gesehen werden [140]. Die Bedeutung von PSGL1 auf die Migration der PMNs in der initialen Inflammationsphase wurde gezeigt [141, 142]. Des Weiteren konnte die PSGL1 und P-Selektin abhängige Interaktion zwischen aktivierten Plättchen und PMNs im Rahmen der Transmigration nachgewiesen werden [143].

Weiterhin konnte eine signifikant gesteigerte Integrin β_3 Expression auf den Plättchen in der PL nachgewiesen werden (vgl. Absatz 3.3.1). In anderen Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des Integrins β_3 zu einer

reduzierten Migration führte [144], was sich mit der gesteigerten Migration bei erhöhter Integrin β_3 Expression bei den CX3CR1^{-/-} Tieren vereinbaren lässt. Zudem konnte die direkte Interaktion zwischen dem Integrin β_3 und dem Fraktalkin nachgewiesen werden [117], was die gleichzeitig verstärkte Fraktalkin Expression und die gesteigerte Integrin β_3 Expression bei CX3CR1^{-/-} Tieren erklärt.

Klinische Studien konnten gesteigerte PNC Zahlen bei Patienten mit Bakteriämie nachweisen und konnten zudem eine Steigerung der PNC Bildung in Blutproben dieser Patienten durch Zugabe des gleichen, Infektion-auslösenden Bakteriums erzielen [145]. Bei der Peritonitis-bedingten Sepsis im CLP-Mausmodell wurden ebenfalls erhöhte PNC Anteile detektiert [146]. Des Weiteren konnten auch bei der Sepsis in klinischen Studien erhöhte PNC Zahlen beobachtet werden, wobei bei der schweren Sepsis mit Multiorganversagen in klinischen Studien verminderte PNC Zahlen gemessen wurden [147, 148]. Bei Patienten mit einer chronischen Entzündung, einer Colitis ulcerosa, konnten ebenfalls erhöhte PNC Zahlen detektiert werden [149]. Weiterhin konnte bei Patienten mit einer myokardialen Schädigung durch einen Myokardinfarkt eine gesteigerte PNC Bildung nachgewiesen werden und experimentell gezeigt werden, dass dies die PMN Migration ins entzündlich geschädigte Gewebe triggert [150].

Neben dem Einfluss des CX3CR1 Rezeptors auf die PNC Bildung konnten bereits andere Einflussfaktoren identifiziert werden. Die Inhibition von Thrombin mittels Dabigatran führte zu einer reduzierten PNC Bildung bei der Klebsiellen-Pneumonie bedingten Sepsis [151]. Auch Clopidogrel als P2Y₁₂-Inhibitor führte im Rahmen einer LPS-induzierten Entzündung zu einer verminderten PNC Bildung [152]. Hieraus lässt sich der Einfluss der Thrombozyten Aktivierung auf die Formation der PNCs ableiten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl auf Ebene der Selektine als auch der Integrine signifikante Unterschiede bestehen, die auf die PNC Bildung und Migration Einfluss nehmen. Vergleichbar zur Induktion der Peritonitis durch

Zymosan, konnten auch in anderen Peritonitis Modellen sowie in klinischen Studien erhöhte PNC Zahlen bei der Sepsis detektiert werden.

4.3 Inflammation

Des Weiteren konnte bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen ein kontinuierlicher Anstieg der MPO Aktivität beobachtet werden, wohingegen die MPO Aktivität bei den WT Mäusen 8 Stunden nach der Zymosan Injektion bereits rückläufig war (vgl. Abschnitt 3.5). Die Interaktion zwischen Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten bedingt eine gesteigerte MPO Aktivität und somit eine vermehrte Freisetzung von ROS [153, 154]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von P-Selektin oder PSGL1 zu einer Reduktion der ROS Bildung führt [155]. Zudem konnte eine Altersabhängigkeit der ROS Produktion nachgewiesen werden, sodass bei adulten Mäusen höhere ROS Level im Vergleich zu Jungtieren gemessen werden konnten [156]. Hiermit einhergehend konnten bei Patienten mit septischem Schock signifikant erhöhte MPO-DNA Plasmalevel gemessen werden, wobei die Konzentration mit der Schwere und dem Outcome des Patienten korrelierte [157].

Ein erhöhter Fraktalkinspiegel im Rahmen einer Sepsis konnte in den ersten 4 Tagen bei Patienten auf der Intensivstation gezeigt werden und eine Korrelation zwischen der Schwere einer Sepsis und dem Fraktalkinspiegel hergestellt werden, wobei die Konzentration unabhängig vom Auslöser der Sepsis war [158]. Bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen konnten zu beiden Zeitpunkten erhöhte Fraktalkinspiegel im Plasma und in der PL gemessen werden (vgl. Absatz 3.4.3) sowie eine erhöhte Fraktalkin Genexpression im Peritoneum detektiert werden (vgl. Absatz 3.7.3). In der Atheroskleroseforschung konnte vermehrt Fraktalkin in nativen atherosklerotischen Koronargefäßen nachgewiesen werden, bei zusätzlichem Diabetes mellitus konnte im Vergleich zur nativen Atherosklerose eine gesteigerte Expression von Fraktalkin detektiert werden [159]. Auch beim akuten Koronarsyndrom, chronischer Herzinsuffizienz sowie einer systolischen Herzinsuffizienz bedingt durch einen Myokardinfarkt, konnten erhöhte Fraktalkinspiegel im Serum nachgewiesen werden [102, 160, 161]. In klinischen Studien konnte eine Korrelation zwischen dem NT-proBNP

(engl.: *N terminales pro brain natriuretic peptide*) und Fraktalkin bei ischämisch-bedingter als auch nicht-ischämischer Herzinsuffizienz gezeigt werden, wobei Fraktalkin als Prädiktionsmarker für die kardiovaskuläre Mortalität identifiziert wurde [162].

Hieraus lässt sich die Annahme ableiten, dass ein erhöhter PNC Anteil mit einer verstärkten Inflammation der Mäuse einhergeht. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte durch eine andere Arbeitsgruppe im CLP-Modell bei CX3CR1^{-/-} Tieren eine erhöhte Sterblichkeit nachgewiesen werden [136].

Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen sind auch protektive Effekte bei CX3CR1 Genknockout beschrieben. Bei zerebraler Ischämie konnte bei CX3CR1^{-/-} Mäusen eine verminderte Schädigung des Gehirns gemessen werden, was durch die Autoren auf einen modulierenden Effekt der CX3CR1^{-/-}-Fraktalkin Achse auf die Mikroglia zurückgeführt wird [163]. Außerdem konnte beim ischämischen akuten Nierenversagen im Mausmodell ein protektiver Effekt der Behandlung mit Anti-CX3CR1-Antikörpern nachgewiesen werden, was durch die Autoren auf eine reduzierte Makrophagen Infiltration zurück geführt wurde [164].

4.4 Chemotaxis

Die beiden Chemokine CXCL1 und CXCL2 sind Liganden des CXCR2 Rezeptors auf den PMNs [65]. Es wurde bereits gezeigt, dass der CXCR2 Rezeptor einen relevanten Einfluss auf die PMN Rekrutierung hat [165, 166]. Experimentell wurde ein Effekt des CXCR2 Rezeptors auf die Bindung von PMNs auf aktivierte PLTs bei Blutstase beschrieben [167]. Im Mausmodell mit LPS-induzierter Peritonitis konnte der Einfluss von CXCL1 und CXCL2 auf die PMN Rekrutierung nachgewiesen werden [168, 169]. Der anhaltende Anstieg der PMN Zahlen (vgl. Absatz 3.1.2) sowie die gesteigerten PNC Zahlen (vgl. Absatz 3.1.3) bei den CX3CR1^{-/-} lassen sich mit der verstärkten Freisetzung der Chemokine CXCL1 und CXCL2 bei den CX3CR1^{-/-} Tieren in der PL erklären (vgl. Absatz 3.4.4). Auch die erhöhten Genexpressionen von CXCL1 und CXCL2 im Peritoneum bei den CX3CR1^{-/-} Tieren (vgl. Absatz 3.7.2) deutet auf eine verstärkte Chemotaxis hin. Die Bedeutung von CXCL1 für die PMN Rekrutierung konnte bei Mäusen mit

Streptokokken-Pneumonie gezeigt werden, wo der CXCL1 Genknockout zu einer reduzierten PMN Zahl in der bronchoalveolären Lavage geführt hat [170]. Dem widersprechend konnte gezeigt werden, dass CXCL1 und die PMN Zahl in der Peritonealdialyse bei Patienten mit akuter Peritonitis nicht korreliert sind [171]. Im Allgemeinen konnte ein reduziertes chemotaktisches Ansprechen von PMNs bei septischen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden, wobei die reduzierte Chemotaxis mit einer höheren Sterblichkeit assoziiert war [172].

Neben Makrophagen können auch PMNs Chemokine sezernieren. Bei der Streptokokken-induzierten Peritonitis wurde nachgewiesen, dass PMNs primär an einer CXCL2 Freisetzung beteiligt sind und weniger CXCL1 sezernieren [173]. Diese Erkenntnis in Verbindung mit den gesteigerten PNC Zahlen bei CX3CR1^{-/-} Tieren könnten die vermehrten CXCL2 Konzentrationen in der PL erklären (vgl. Absatz 3.4.4), wobei bei dieser Annahme der Anteil der Chemokinfreisetzung zu Beginn der Inflammation durch Makrophagen unterschätzt wird [168].

4.5 Dysregulierte Immunantwort

Bei Betrachtung der Tendenz der PMN Zahlen in der PL (siehe Abbildung 12: A3) kann auch eine dysregulierte, überschießende Immunantwort bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen vermutet werden. Eine Dysregulation der Mikroglia, bedingt durch das Fehlen des CX3CR1 Rezeptors, konnte auch im zentralen Nervensystem bei autoimmunen Entzündungsprozessen detektiert werden [174]. Des Weiteren konnte im Tiermodell mit Glioblastom-Mäusen eine reduzierte Überlebensrate in CX3CR1^{-/-} Mäusen beobachtet werden, welche jedoch nicht mit einer verstärkten Migration von Ly6G⁺-Zellen (PMNs) in das Tumorgewebe einherging [175].

Die endotheliale Barriere wird im Rahmen der Sepsis durch verschiedene Pathomechanismen gestört [176]. Auch die Persistenz bzw. der fortlaufende Anstieg der Proteinkonzentration, primär durch Albumin bedingt, in der PL bei den CX3CR1^{-/-} Tieren (vgl. 3.6.1) lässt sich mit einem Endothelschaden und einer gestörten endothelialen Barriere vereinbaren und stützt die These der Dysregulation. Des Weiteren kann der kontinuierliche Anstieg der MPO Aktivität

bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen in einer Dysregulation der Immunantwort begründet sein (vgl. Absatz 3.5).

Außerdem deutet die gesteigerte Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs, repräsentiert durch ein erhöhtes Phospho-Erk, bei den CX3CR1^{-/-} ebenfalls auf eine Dysregulation hin (vgl. Absatz 3.6.2). Diese Annahme geht einher mit Untersuchungen der MAP-Kinase Aktivität bei Sepsis Patienten, welche eine erhöhte Aktivität verglichen mit einer gesunden Kontrollkohorte zeigten [177]. Bei humanen PMNs konnte eine MAP-Kinase vermittelte gesteigerte Migration bei Stimulation der Zellen über TLR2 und TLR4 gezeigt werden [178]. Weiterhin konnte bei peripheren Nervenverletzungen im Tiermodell gezeigt werden, dass die Aktivität des MAP-Kinase Signalwegs durch IL6 gesteigert wird [179], was mit der vermehrten IL6 Freisetzung bei CX3CR1^{-/-} Tieren zu vereinbaren ist (vgl. Absatz 3.4.1). Eine pharmakologische Blockade des CX3CR1^{-/-} Rezeptor führte jedoch zu einer verminderten MAP-Kinase Aktivität [179]. In Mikroglia-Zellkulturen führte eine Inkubation mit Fraktalkin zu erhöhten Phospho-Akt und Phospho-Erk Proteinexpression [180], was mit den gesteigerten Signalkaskaden (vgl. Absatz 3.6.2) und erhöhten Fraktalkinspiegeln bei den CX3CR1^{-/-} Tieren (vgl. Absatz 3.4.3) vereinbar ist. Weiterhin führte die Aktivierung der MAP-Kinase zu einer Aktivierung der Metalloprotease ADAM17, welche an der Freisetzung von Fraktalkin beteiligt ist [181].

4.6 ADAM10 und ADAM17

Die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 sind Sheddasen, welche an der Spaltung des Membran-gebundenen Fraktalkins in die freie Form beteiligt sind [112, 113]. Beide konnten auf den PMNs im Blut bei den CX3CR1^{-/-} Tieren gesteigert nachgewiesen werden (vgl. Absatz 3.4.2). In Zellkulturen mit stimulierten humanen Astrozyten konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von ADAM10 und ADAM17 zu reduzierten Fraktalkinspiegeln führt [182], was die Bedeutung der beiden Metalloproteasen unterstreicht. Dies erklärt die höheren Fraktalkinspiegel in der PL und im Blutplasma (vgl. Absatz 3.4.3). Hier stellt sich die Frage, ob das Fehlen des CX3CR1 Rezeptors zu einer kompensatorischen Erhöhung seines Liganden Fraktalkin führt. Die erheblichen Konzentrations-

unterschiede im Blutplasma deuteten darauf hin, dass der Unterschied nicht alleinig durch die Inflammation bedingt war (vgl. Absatz 3.4.3). Auch bei nicht-stimulierten Kontrollen wurde eine signifikant gesteigerte Fraktalkinkonzentration im Blutplasma und in der PL bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen detektiert, was die Annahme einer kompensatorischen Hochregulation von Fraktalkin unterstreicht (vgl. Abbildung 24). Weiterhin konnte bei Patienten mit dem heterozygotem CX3CR1 I249 Polymorphismus erhöhte Fraktalkinspiegel im Vergleich zu CX3CR1 Wildtyp Patienten im Rahmen des akuten Koronarsyndroms detektiert werden [135]. Konträr zu den Ergebnissen, konnte bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung und CX3CR1-Polymorphismen keine erhöhten Fraktalkinspiegel im Vergleich zu CX3CR1-Wildtyp Patienten gemessen werden [183]. Letztlich bleibt die Frage, ob das Fehlen des CX3CR1-Rezeptors in einem kompensatorisch erhöhten Fraktalkinspiegel resultiert, unklar und sollte in weiteren Untersuchungen genauer evaluiert werden.

Weiterhin ist ADAM17 an der Spaltung von L-Selektin von der Leukozytenoberfläche beteiligt [184]. Hiermit einhergehend zeigt das Fehlen von ADAM17 bei der Escherichia coli-induzierten Peritonitis im murinen Modell eine verstärkte Migration von PMNs [185]. Bei der Zymosan-induzierten Peritonitis konnten bei den CX3CR1^{-/-} Tiere eine gesteigerte Expression von ADAM17 auf den PMNs im Blut 4 Stunden nach der Stimulation detektiert werden (vgl. Absatz 3.4.2). Dem widersprechend konnte auf den PNCs und PMNs der CX3CR1^{-/-} Tiere eine erhöhte Expression von L-Selektin nachgewiesen werden (vgl. Absätze 3.2.1 und 3.2.2). Bei Patienten mit Peritonitis konnten sowohl im Blut als auch im Peritonealraum PMNs isoliert werden, die weniger L-Selektin exprimiert haben als die Kontrollkohorte [186]. Eine weitere klinische Studie zeigte, dass Sepsis Patienten weniger freies L-Selektin im Blut aufwiesen als die Vergleichsgruppe und die Mortalität mit einer niedrigen freien L-Selektin Konzentrationen assoziiert war [187]. Im Rahmen der Sepsis wird eine protektive Funktion der L-Selektin Abspaltung angenommen [188]. Um die Diskrepanz zwischen gesteigerter L-Selektin Expression bei gleichzeitig erhöhter Expression von ADAM17 bei den CX3CR1^{-/-} Tieren zu erklären, müsste eine Messung des freien L-Selektins im Blut und in der PL erfolgen.

Die beiden Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 sind neben der bereits erwähnten Fraktalkinfreisetzung auch für die Freisetzung von TNF α und IL6 verantwortlich [189, 190]. Es konnten bei den CX3CR1^{-/-} Mäusen erhöhte TNF α und IL6 Konzentrationen in der PL nachgewiesen werden (vgl. Absatz 3.4.1), was sich durch die erhöhten ADAM10 und ADAM17 Expressionen erklären lässt. Zudem zeigte sich im zeitlichen Verlauf erst eine Hochregulation der Metalloproteasen im Blut 4 Stunden nach der Stimulation (vgl. Absatz 3.4.2) und zum Zeitpunkt 8 Stunden dann die gesteigerten IL6 Konzentration in der PL (vgl. Absatz 3.4.1), was auf einen kausalen Zusammenhang hindeutet. Bei Patienten mit Peritonitis-bedingter Sepsis konnte ebenfalls eine gesteigerte Expression von ADAM17 auf den PMNs nachgewiesen werden, einhergehend mit signifikant erhöhten TNF α -Konzentrationen im Blut und in der Peritonealflüssigkeit [186].

Die erhöhte Expression von ADAM17 auf den PMNs bei den CX3CR1^{-/-} Tieren (vgl. Absatz 3.4.2) kann durch die gesteigerte Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs erklärt werden, welche durch die vermehrte Detektion von Phospho-ERK1/2 bei den CX3CR1^{-/-} Tieren verdeutlicht wird (vgl. Absatz 3.6.2). Diese Annahme wird gestützt durch den Nachweis im murinen Modell, dass ERK1/2 einen regulierenden Effekt auf die ADAM17 Expression hat [191, 192].

4.7 CX3CR1 und CCR2

In der Literatur sind, wie einleitend bereits erwähnt, synergistische Effekte zwischen CCR2 bzw. CCL2 und CX3CR1 beschrieben worden [120, 121]. Auf genetischer Ebene konnte im peritonealen Gewebe eine signifikant gesteigerte Expression des CCR2 Rezeptors bei CX3CR1^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden (vgl. Absatz 3.7.4). Weiterhin konnte auf den PNCs in der PL 4 Stunden nach der Zymosan Injektion ein signifikanter Unterschied in der CCR2 Expression detektiert werden (vgl. Absatz 3.4.5). Im CLP-Peritonitis Modell bei Ratten konnte eine gesteigerte Genexpression von CCR2 in PMNs unter inflammatorischen Bedingungen gesehen werden [193]. Des Weiteren konnten im Lungengewebe von septischen Patienten eine erhöhte CCR2- und CX3CR1-exprimierende Makrophagenzahl im Vergleich zu nicht-Sepsis Patienten immunhistochemisch nachgewiesen werden [194].

Beim Liganden des CCR2, dem CCL2, wurden sowohl auf Ebene der Genexpression als auch in gelöster Form in der PL keine signifikanten Unterschiede gemessen (vgl. Absatz 3.4.5 und 3.7.4).

Im Mausmodell mit CCR2^{-/-} und CX3CR1^{-/-} Genknockout Mäusen konnten synergistische Effekte auf die Aktivierung von Fettgewebsmakrophagen gezeigt werden [120]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CCL2 die Expression von CX3CR1 auf Makrophagen steigert [195]. Bei humanen Monozyten konnte nach siRNA-induzierten CX3CR1-Knockout eine signifikant gesteigerte Expression von CCR2 und CCL2 gezeigt werden [196]. Im Rahmen der viralen Enzephalitis wurden die beiden Rezeptoren vergleichend untersucht, wobei der Genknockout eines Rezeptors meistens zu ähnlichen Ergebnissen führte [197]. Im Mausmodell mit gleichzeitigem CCR2^{-/-} und CX3CR1^{-/-} Genknockout konnte bei ischämischer Hirnschädigung eine reduzierte PMN Migration in die betroffenen Areale beobachtet werden [198]. Im Rahmen der vaskulären Entzündung konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Blockade des CCR2 Rezeptors bei CX3CR1^{-/-} Tieren zu einer stärkeren Hemmung der Makrophagen Migration führt im Vergleich zu CX3CR1^{-/-} Mäusen [199].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die gezeigten Daten als auch die vorangegangenen publizierten Ergebnisse die Vermutung zu lassen, dass der CCR2 Rezeptor als Co-Rezeptor des CX3CR1 Rezeptors fungiert.

4.8 Ausblick

Die epidemiologischen Daten zeigen die Relevanz der Peritonitis und der Peritonitis-bedingten Sepsis im klinischen Alltag (vgl. Absatz 1.3). Die hohe Sterblichkeit trotz intensivmedizinischer Maßnahmen unterstreicht den Handlungsbedarf zur Untersuchung der verschiedenen Pathomechanismen [53, 54, 56], denn trotz langer intensiver Forschung sind viele Fragen weiterhin ungeklärt und Zusammenhänge nicht hinreichend verstanden.

In dieser Arbeit konnte der Einfluss des CX3CR1 Rezeptors auf die PNC Bildung im murinen Modell verdeutlicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Rezeptors mit einer gesteigerten PNC Bildung vergesellschaftet ist. Diese Erkenntnis konnte durch eine veränderte Selektin- und Integrinexpression auf den Zellen erklärt werden. Weiterhin konnte anhand einer vermehrten Zytokinfreisetzung bei den CX3CR1^{-/-} Tieren ein fulminanterer Verlauf der Peritonitis-bedingten Sepsis aufgezeigt werden. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse kann der CX3CR1 Rezeptor als ein wichtiger Einflussfaktor für den Verlauf der Inflammation im Rahmen der Sepsis angesehen werden. Der Vergleich mit der internationalen Literatur zeigt jedoch, dass das Fehlen des CX3CR1 Rezeptors kontrovers diskutiert wird, sodass weitere Einflussfaktoren im Zusammenhang mit dem CX3CR1 Rezeptor identifiziert werden müssen. Hier bedarf es weiterführender Grundlagenforschung sowie klinischer Studien. Weiterhin wurde nur die Akute Phase Reaktion bis 8 Stunden nach der Zymosan Injektion betrachtet. In weiteren Untersuchungen müsste der weitere Verlauf über die Akute Phase Reaktion hinaus als auch die Resolution der Inflammation näher beleuchtet werden.

Die Ursachen der Sepsis sind sehr heterogen. Jeder Patient weist individuelle Einflussfaktoren wie beispielsweise Vorerkrankungen, Alter sowie ein spezifisches genetisches Profil auf, die sich auf den Krankheitsverlauf und das Outcome auswirken können. Die oben aufgeführten genetischen Polymorphismen im CX3CR1 Rezeptor sind ein Beispiel für die Heterogenität der Patienten [109, 108, 133]. Weiterführende klinische Studien mit CX3CR1 Polymorphismen Trägern sollten durchgeführt werden, um die gewonnenen

Erkenntnisse aus dem Mausmodell zu validieren. Letztlich kann die zeitnahe Genomanalyse nach Aufnahme auf die Intensivstation bei Sepsis Patienten ein elementarer Schritt in der individuellen Therapiefindung darstellen. Der Nachweis der CX3CR1 Polymorphismen könnte so frühzeitig zu einer individuellen Anpassung der Therapie führen mit dem Ziel, deren Effektivität zu steigern und die Mortalität zu senken. Auch hierzu bedarf es weiterführender Grundlagenforschung als auch klinischer Studien, um die komplexen Pathomechanismen sowie deren klinischer Bedeutung umfassender zu beleuchten.

Es konnten in der Arbeit Anhaltspunkte für eine Dysregulation der Immunantwort bei den CX3CR1^{-/-} Tieren identifiziert werden (vgl. Absatz 4.5). In weiterführender Forschung könnte der Einfluss eines pharmakologischen Eingriffs in die Fraktalkin-CX3CR1 Achse auf die dysregulierte Immunreaktion im Rahmen der Sepsis näher untersucht werden. Hier stellt sich die Frage, ob die Fraktalkin-CX3CR1 Achse das Potenzial hat, als kausaler Therapieansatz der Sepsis zu fungieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bedeutung des CX3CR1 Rezeptors auf die PNC Bildung im Rahmen der Peritonitis und Peritonitisbedingten Sepsis im murinen Modell näher beleuchtet werden konnte. Das Fehlen des CX3CR1 resultiert in einer verstärkten PNC Bildung und fördert die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine. Eine klinische Validierung der Ergebnisse bei Peritonitis- und Sepsis Patienten steht noch aus. Der Vergleich der Daten mit der aktuellen Literatur zeigt weitere Ansätze für Forschungsvorhaben auf, mit dem Ziel die immunologischen Prozesse sowie Einflussfaktoren der Sepsis näher zu verstehen und eine kausale Therapieoption zu schaffen. Die Identifikation von Mutationen des CX3CR1 bei Patienten kann in der Zukunft ein wichtiger Schritt für eine zielgerichtete Therapie der Sepsis darstellen.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Die Peritonitis und die Peritonitis bedingte Sepsis stellt ein intensivmedizinisches Krankheitsbild mit hoher Letalität dar. Im Rahmen des Entzündungsprozesses kommt es zu einer Chemokin-getriggerten Selektin und Integrin vermittelten Migration von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) zum Infektionsfokus. Die Formation von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNC) spielt hierbei eine wichtige Rolle. Die Bedeutung des Fraktalkins (CX3CL1) sowie dessen Rezeptor CX3CR1 auf inflammatorische Prozesse wurde durch zahlreiche Vorarbeiten in vielen Teilaspekten beleuchtet. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des CX3CR1 auf die PNC Bildung im Rahmen der Zymosan-induzierten Peritonitis und Peritonitis-bedingten Sepsis aufgezeigt.

Methoden: In der Zymosan-induzierten Peritonitis wurden CX3CR1^{-/-} Mäusen vergleichend mit Wildtyp Tieren in Hinblick auf die PNC Bildung und PMN Migration untersucht. Zudem wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Expression von Selektinen, Integrinen und weiteren wichtigen Oberflächenstrukturen auf den verschiedenen Zellen im Blut und in der Peritoneallavage (PL) detektiert. Konzentrationen von relevanten Zytokinen wurden im Blutplasma und in der PL mittels Enzym-linked Immunosorbent Assay gemessen. Die Expression bedeutender Gene im Peritoneum wurden mit der Polymerasekettenreaktion bestimmt. Proteine relevanter intrazellulärer Signalkaskaden wurden mittels Westernblot detektiert. Immunhistochemische Färbungen zeigten die Verteilung von PMNs und PNCs im Peritoneum.

Ergebnis: Bei den CX3CR1^{-/-} Tieren konnte eine gesteigerte PNC Bildung und eine erhöhte PMN Migration detektiert werden. Diese Erkenntnis konnte durch eine vermehrte Expression von Integrin β_3 sowie einer verstärkten Selektin-vermittelten Migration erklärt werden. Hiermit einhergehend konnten gesteigerte Konzentrationen von Fraktalkin, Tumornekrose Faktor α , Interleukin 6 sowie C-X-C-Motiv Chemokin Ligand (CXCL) 1 und CXCL2 gemessen werden. Weiterhin konnten eine verstärkte Expression der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 (*engl.: a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10/17*) bei den CX3CR1^{-/-} Tieren gezeigt werden. Eine gesteigerte

Aktivität des MAP-Kinase (*engl.: mitogen-activated protein kinase*) Signalwegs konnte nachgewiesen werden.

Diskussion: Das Fehlen des CX3CR1 Rezeptors bei Mäusen lässt auf eine dysregulierte Immunantwort hindeuten. Es sind zwei relevante humane Polymorphismen des CX3CR1 Rezeptors bisher beschrieben worden. Hieraus lässt sich die Frage ableiten, ob Peritonitis und Sepsis Patienten von einer Gensequenzierung zur Therapieoptimierung profitieren, in der Hoffnung die hohe Letalität durch eine frühzeitige adäquate Therapie senken zu können.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2019. Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen – Update 2018. *AWMF: S2k Leitlinie*.
2. Lippert, H. 2013. Peritonitis. *In: Jauch, K.-W., Mutschler, W., Hoffmann, J. N. & Kanz, K.-G. (eds.) Chirurgie Basisweiterbildung: In 100 Schritten durch den Common Trunk*. Berlin, Heidelberg: Springer, 717-726.
3. Dever, J. B. & Sheikh, M. Y. 2015. Review article: spontaneous bacterial peritonitis--bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 41, 1116-1131.
4. Weledji, E. P. & Ngowe, M. N. 2013. The challenge of intra-abdominal sepsis. *International Journal of Surgery (London, England)*, 11, 290-295.
5. van Ruler, O. & Boermeester, M. A. 2016. Die chirurgische Therapie der sekundären Peritonitis. *Der Chirurg*, 87, 13-19.
6. Brunkhorst, F. M., Weigand, M. A., Pletz, M., Gastmeier, P., Lemmen, S. W., Meier-Hellmann, A., Ragaller, M., Weyland, A., Marx, G., Bucher, M., Gerlach, H., Salzberger, B., Grabein, B., Welte, T., Werdan, K., Kluge, S., Bone, H. G., Putensen, C., Rossaint, R., Quintel, M., Spies, C., Weiß, B., John, S., Opper, M., Jörres, A., Brenner, T., Elke, G., Gründling, M., Mayer, K., Weimann, A., Felbinger, T. W., Axer, H. & Deutsche Sepsis Gesellschaft e. V. 2020. S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge. *Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 115, 37-109.
7. Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M. & Sibbald, W. J. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101, 1644-1655.
8. Deutsche Sepsis-Gesellschaft (DSG). *Sepsisdefinition*. Abgerufen von: <https://www.sepsis-gesellschaft.de/sepsisdefinition> (Abgerufen am 21.12.2019).
9. Vincent, J. L., Opal, S. M., Marshall, J. C. & Tracey, K. J. 2013. Sepsis definitions: time for change. *Lancet*, 381, 774-775.
10. Lambden, S., Laterre, P. F., Levy, M. M. & Francois, B. 2019. The SOFA score-development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. *Critical Care (London, England)*, 23, 374.

11. Vincent, J. L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonça, A., Bruining, H., Reinhart, C. K., Suter, P. M. & Thijs, L. G. 1996. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Medicine*, 22, 707-710.
12. Raith, E. P., Udy, A. A., Bailey, M., McGloughlin, S., Maclsaac, C., Bellomo, R. & Pilcher, D. V. 2017. Prognostic Accuracy of the SOFA Score, SIRS Criteria, and qSOFA Score for In-Hospital Mortality Among Adults With Suspected Infection Admitted to the Intensive Care Unit. *Journal of the American Medical Association*, 317, 290-300.
13. Churpek, M. M., Zdravetz, F. J., Winslow, C., Howell, M. D. & Edelson, D. P. 2015. Incidence and Prognostic Value of the Systemic Inflammatory Response Syndrome and Organ Dysfunctions in Ward Patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 192, 958-964.
14. Kaukonen, K. M., Bailey, M., Pilcher, D., Cooper, D. J. & Bellomo, R. 2015. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *New England Journal of Medicine*, 372, 1629-1638.
15. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. & Mathison, J. C. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249, 1431-1433.
16. Wiersinga, W. J., Leopold, S. J., Cranendonk, D. R. & van der Poll, T. 2014. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*, 5, 36-44.
17. Sato, M., Sano, H., Iwaki, D., Kudo, K., Konishi, M., Takahashi, H., Takahashi, T., Imaizumi, H., Asai, Y. & Kuroki, Y. 2003. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *Journal of Immunology*, 171, 417-425.
18. Roeder, A., Kirschning, C. J., Rupec, R. A., Schaller, M., Weindl, G. & Korting, H. C. 2004. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Medical Mycology*, 42, 485-498.
19. Gong, T., Liu, L., Jiang, W. & Zhou, R. 2020. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nature Reviews: Immunology*, 20, 95-112.
20. Chousterman, B. G., Swirski, F. K. & Weber, G. F. 2017. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Seminars in Immunopathology*, 39, 517-528.
21. Weis, S., Dickmann, P., Pletz, M. W., Coldewey, S. M., Gerlach, H. & Bauer, M. 2017. Sepsis 2017: Eine neue Definition führt zu neuen Konzepten. *Deutsches Ärzteblatt International*, 114, 1424.

22. Levi, M. & van der Poll, T. 2005. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 15, 254-259.
23. Mesters, R. M., Mannucci, P. M., Coppola, R., Keller, T., Ostermann, H. & Kienast, J. 1996. Factor VIIa and antithrombin III activity during severe sepsis and septic shock in neutropenic patients. *Blood*, 88, 881-886.
24. Levi, M. & Ten Cate, H. 1999. Disseminated intravascular coagulation. *New England Journal of Medicine*, 341, 586-592.
25. Lubbers, R., van Essen, M. F., van Kooten, C. & Trouw, L. A. 2017. Production of complement components by cells of the immune system. *Clinical and Experimental Immunology*, 188, 183-194.
26. Redegeld, F. A., Yu, Y., Kumari, S., Charles, N. & Blank, U. 2018. Non-IgE mediated mast cell activation. *Immunological Reviews*, 282, 87-113.
27. Briegel, J. 2019. Systemic Inflammatory Response-Syndrome (SIRS), Sepsis und Multiorganversagen. In: Rossaint, R., Werner, C. & Zwißler, B. (eds.) *Die Anästhesiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2143-2161.
28. Wang, H. & Ma, S. 2008. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *American Journal of Emergency Medicine*, 26, 711-715.
29. Kumar, A., Roberts, D., Wood, K. E., Light, B., Parrillo, J. E., Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., Gurka, D., Kumar, A. & Cheang, M. 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine*, 34, 1589-1596.
30. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. & Zychlinsky, A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303, 1532-1535.
31. Sollberger, G., Tilley, D. O. & Zychlinsky, A. 2018. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Developmental Cell*, 44, 542-553.
32. Kaplan, M. J. & Radic, M. 2012. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *Journal of Immunology*, 189, 2689-2695.
33. Papayannopoulos, V. 2018. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews: Immunology*, 18, 134-147.
34. Czaikoski, P. G., Mota, J. M., Nascimento, D. C., Sônego, F., Castanheira, F. V., Melo, P. H., Scortegagna, G. T., Silva, R. L., Barroso-Sousa, R., Souto, F. O., Pazin-Filho, A., Figueiredo, F., Alves-Filho, J. C. & Cunha,

- F. Q. 2016. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PloS One*, 11, e0148142.
35. Englert, J. A., Bobba, C. & Baron, R. M. 2019. Integrating molecular pathogenesis and clinical translation in sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Journal of Clinical Investigation Insight*, 4, 1-13.
36. Gómez, H. & Kellum, J. A. 2016. Sepsis-induced acute kidney injury. *Current Opinion in Critical Care*, 22, 546-553.
37. Kakihana, Y., Ito, T., Nakahara, M., Yamaguchi, K. & Yasuda, T. 2016. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. *Journal of Intensive Care*, 4, 22.
38. Woźnica, E. A., Inglot, M., Woźnica, R. K. & Łysenko, L. 2018. Liver dysfunction in sepsis. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27, 547-551.
39. Singer, M. 2014. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*, 5, 66-72.
40. Brealey, D., Brand, M., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., Smolenski, R., Davies, N. A., Cooper, C. E. & Singer, M. 2002. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*, 360, 219-223.
41. Blanco, J., Muriel-Bombín, A., Sagredo, V., Taboada, F., Gandía, F., Tamayo, L., Collado, J., García-Labattut, A., Carriedo, D., Valledor, M., De Frutos, M., López, M. J., Caballero, A., Guerra, J., Alvarez, B., Mayo, A. & Villar, J. 2008. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Critical Care (London, England)*, 12, R158.
42. Tabah, A., Koulenti, D., Laupland, K., Misset, B., Valles, J., Bruzzi de Carvalho, F., Paiva, J. A., Cakar, N., Ma, X., Eggimann, P., Antonelli, M., Bonten, M. J., Csomos, A., Krueger, W. A., Mikstacki, A., Lipman, J., Depuydt, P., Vesin, A., Garrouste-Orgeas, M., Zahar, J. R., Blot, S., Carlet, J., Brun-Buisson, C., Martin, C., Rello, J., Dimopoulos, G. & Timsit, J. F. 2012. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EUROBACT International Cohort Study. *Intensive Care Medicine*, 38, 1930-1945.
43. Giannoni, E., Agyeman, P. K. A., Stocker, M., Posfay-Barbe, K. M., Heininger, U., Spycher, B. D., Bernhard-Stirnemann, S., Niederer-Loher, A., Kahlert, C. R., Donas, A., Leone, A., Hasters, P., Relly, C., Riedel, T., Kuehni, C., Aebi, C., Berger, C. & Schlapbach, L. J. 2018. Neonatal Sepsis of Early Onset, and Hospital-Acquired and Community-Acquired Late Onset: A Prospective Population-Based Cohort Study. *Journal of Pediatrics*, 201, 106-114.

44. Vincent, J. L., Sakr, Y., Sprung, C. L., Ranieri, V. M., Reinhart, K., Gerlach, H., Moreno, R., Carlet, J., Le Gall, J. R. & Payen, D. 2006. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Critical Care Medicine*, 34, 344-353.
45. Ferrer, R., Martin-Loeches, I., Phillips, G., Osborn, T. M., Townsend, S., Dellinger, R. P., Artigas, A., Schorr, C. & Levy, M. M. 2014. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Critical Care Medicine*, 42, 1749-1755.
46. Acheampong, A. & Vincent, J. L. 2015. A positive fluid balance is an independent prognostic factor in patients with sepsis. *Critical Care (London, England)*, 19, 251.
47. Sprung, C. L., Annane, D., Keh, D., Moreno, R., Singer, M., Freivogel, K., Weiss, Y. G., Benbenishty, J., Kalenka, A., Forst, H., Laterre, P. F., Reinhart, K., Cuthbertson, B. H., Payen, D. & Briegel, J. 2008. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *New England Journal of Medicine*, 358, 111-124.
48. Stephens, D. P., Thomas, J. H., Higgins, A., Bailey, M., Anstey, N. M., Currie, B. J. & Cheng, A. C. 2008. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor in patients with septic shock. *Critical Care Medicine*, 36, 448-454.
49. Brunkhorst, F. M., Engel, C., Bloos, F., Meier-Hellmann, A., Ragaller, M., Weiler, N., Moerer, O., Gruendling, M., Opper, M., Grond, S., Olthoff, D., Jaschinski, U., John, S., Rossaint, R., Welte, T., Schaefer, M., Kern, P., Kuhnt, E., Kiehntopf, M., Hartog, C., Natanson, C., Loeffler, M. & Reinhart, K. 2008. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *New England Journal of Medicine*, 358, 125-139.
50. Rivers, E., Nguyen, B., Havstad, S., Ressler, J., Muzzin, A., Knoblich, B., Peterson, E. & Tomlanovich, M. 2001. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *New England Journal of Medicine*, 345, 1368-1377.
51. Statistisches Bundesamt. 2017. *Krankenhausstatistik - Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern*. Abgerufen von: www.gbe-bund.de (Abgerufen am: 08.12.2019).
52. Fleischmann, C., Thomas-Rueddel, D. O., Hartmann, M., Hartog, C. S., Welte, T., Heublein, S., Dennler, U. & Reinhart, K. 2016. Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-Patienten im Krankenhaus. *Deutsches Ärzteblatt International*, 113, 159-166.
53. Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N. K., Hartog, C. S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D. C. & Reinhart, K. 2016. Assessment of

- Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 193, 259-272.
54. Weis, S., Pletz, M. W. & Bauer, M. 2017. Sepsis – neue Definition, neue Kontroversen. *Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin* Nr. 37, 415-419.
 55. Bauer, M., Groesdonk, H. V., Preissing, F., Dickmann, P., Vogelmann, T. & Gerlach, H. 2021. Mortality in sepsis and septic shock in Germany. Results of a systematic review and meta-analysis. *Anaesthetist*, 70, 673-680.
 56. Ross, J. T., Matthay, M. A. & Harris, H. W. 2018. Secondary peritonitis: principles of diagnosis and intervention. *British Medical Journal*, 361, 1407.
 57. Hadley, G. P. 2014. Intra-abdominal sepsis - epidemiology, aetiology and management. *Seminars in Pediatric Surgery*, 23, 357-362.
 58. Schneider, C. P., Seyboth, C., Vilsmaier, M., Küchenhoff, H., Hofner, B., Jauch, K. W. & Hartl, W. H. 2009. Prognostic factors in critically ill patients suffering from secondary peritonitis: a retrospective, observational, survival time analysis. *World Journal of Surgery*, 33, 34-43.
 59. Gabay, C. & Kushner, I. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine*, 340, 448-454.
 60. Papadakis, K. A. & Targan, S. R. 2000. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology*, 119, 1148-1157.
 61. Gressner, A. M. & Gressner, O. A. 2019. Tumornekrosefaktor- α . In: Gressner, A. M. & Arndt, T. (eds.) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer 2380-2382.
 62. Gressner, A. M. & Gressner, O. A. 2019. Interleukin-6. In: Gressner, A. M. & Arndt, T. (eds.) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer 1265-1266.
 63. Tanaka, T. & Kishimoto, T. 2014. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunology Research*, 2, 288-294.
 64. Petri, B. & Sanz, M. J. 2018. Neutrophil chemotaxis. *Cell and Tissue Research*, 371, 425-436.
 65. Koelink, P. J., Overbeek, S. A., Braber, S., de Kruijf, P., Folkerts, G., Smit, M. J. & Kraneveld, A. D. 2012. Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: an extensive review. *Pharmacology and Therapeutics*, 133, 1-18.

66. Waugh, D. J. & Wilson, C. 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14, 6735-6741.
67. Konrad, F. M. & Reutershan, J. 2012. CXCR2 in acute lung injury. *Mediators of Inflammation*, 2012, 1-8.
68. Kobayashi, Y. 2008. The role of chemokines in neutrophil biology. *Frontiers in Bioscience*, 13, 2400-2407.
69. Suzuki, M., Tetsuka, T., Yoshida, S., Watanabe, N., Kobayashi, M., Matsui, N. & Okamoto, T. 2000. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF-alpha- or IL-1beta-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *FEBS Letters*, 465, 23-27.
70. Zhang, Z. J., Cao, D. L., Zhang, X., Ji, R. R. & Gao, Y. J. 2013. Chemokine contribution to neuropathic pain: respective induction of CXCL1 and CXCR2 in spinal cord astrocytes and neurons. *Pain*, 154, 2185-2197.
71. Driscoll, K. E. 1994. Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Experimental Lung Research*, 20, 473-490.
72. Sherwood, E. R. & Toliver-Kinsky, T. 2004. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research: Clinical Anaesthesiology*, 18, 385-405.
73. Nourshargh, S. & Alon, R. 2014. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*, 41, 694-707.
74. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews: Immunology*, 7, 678-689.
75. Kelly, M., Hwang, J. M. & Kubes, P. 2007. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120, 3-10.
76. Hidalgo, A., Peired, A. J., Wild, M., Vestweber, D. & Frenette, P. S. 2007. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*, 26, 477-489.
77. Laudanna, C., Kim, J. Y., Constantin, G. & Butcher, E. 2002. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunological Reviews*, 186, 37-46.
78. Rudziak, P., Ellis, C. G. & Kowalewska, P. M. 2019. Role and Molecular Mechanisms of Pericytes in Regulation of Leukocyte Diapedesis in Inflamed Tissues. *Mediators of Inflammation*, 2019, 1-9.

79. Murphy, K. M., Weaver, C., Mowat, A., Berg, L. J., Chaplin, D. D., Seidler, L. & Janeway, C. 2018. *Janeway Immunologie*, Springer Spektrum. 139-144, 1002-1004.
80. Rimmelé, T., Payen, D., Cantaluppi, V., Marshall, J., Gomez, H., Gomez, A., Murray, P. & Kellum, J. A. 2016. Immune cell phenotype and function in sepsis. *Shock*, 45, 282-291.
81. Worthylake, R. A. & Burridge, K. 2001. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 569-577.
82. Schafer, A., Schulz, C., Eigenthaler, M., Fraccarollo, D., Kobsar, A., Gawaz, M., Ertl, G., Walter, U. & Bauersachs, J. 2004. Novel role of the membrane-bound chemokine fractalkine in platelet activation and adhesion. *Blood*, 103, 407-412.
83. Moore, K. L., Patel, K. D., Bruehl, R. E., Li, F., Johnson, D. A., Lichenstein, H. S., Cummings, R. D., Bainton, D. F. & McEver, R. P. 1995. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *Journal of Cell Biology*, 128, 661-671.
84. Spertini, O., Cordey, A. S., Monai, N., Giuffrè, L. & Schapira, M. 1996. P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes, and CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Journal of Cell Biology*, 135, 523-531.
85. Hartman, H., Abdulla, A., Awla, D., Lindkvist, B., Jeppsson, B., Thorlacius, H. & Regnér, S. 2012. P-selectin mediates neutrophil rolling and recruitment in acute pancreatitis. *British Journal of Surgery*, 99, 246-255.
86. Devi, S., Kuligowski, M. P., Kwan, R. Y., Westein, E., Jackson, S. P., Kitching, A. R. & Hickey, M. J. 2010. Platelet recruitment to the inflamed glomerulus occurs via an alphaIIb beta3/GPVI-dependent pathway. *American Journal of Pathology*, 177, 1131-1142.
87. Page, C. & Pitchford, S. 2013. Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *International Immunopharmacology*, 17, 1176-1184.
88. Kornerup, K. N., Salmon, G. P., Pitchford, S. C., Liu, W. L. & Page, C. P. 2010. Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration. *Journal of Applied Physiology*, 109, 758-767.
89. Ding, Z. M., Babensee, J. E., Simon, S. I., Lu, H., Perrard, J. L., Bullard, D. C., Dai, X. Y., Bromley, S. K., Dustin, M. L., Entman, M. L., Smith, C. W. & Ballantyne, C. M. 1999. Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to

- neutrophil adhesion and migration. *Journal of Immunology*, 163, 5029-5038.
90. Diacovo, T. G., deFougerolles, A. R., Bainton, D. F. & Springer, T. A. 1994. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *The Journal of clinical investigation*, 94, 1243-1251.
 91. Simon, D. I., Chen, Z., Xu, H., Li, C. Q., Dong, J., McIntire, L. V., Ballantyne, C. M., Zhang, L., Furman, M. I., Berndt, M. C. & Lopez, J. A. 2000. Platelet glycoprotein I α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *Journal of Experimental Medicine*, 192, 193-204.
 92. Peters, M. J., Dixon, G., Kotowicz, K. T., Hatch, D. J., Heyderman, R. S. & Klein, N. J. 1999. Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *British Journal of Haematology*, 106, 391-399.
 93. Ghasemzadeh, M. & Hosseini, E. 2013. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thrombosis Research*, 131, 191-197.
 94. Bazan, J. F., Bacon, K. B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D. R., Zlotnik, A. & Schall, T. J. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 385, 640-644.
 95. Kim, K. W., Vallon-Eberhard, A., Zigmond, E., Farache, J., Shezen, E., Shakhar, G., Ludwig, A., Lira, S. A. & Jung, S. 2011. In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood*, 118, 156-167.
 96. Auffray, C., Fogg, D. K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., Molina, T., Charo, I., Hume, D. A., Cumano, A., Lauvau, G. & Geissmann, F. 2009. CX3CR1⁺ CD115⁺ CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 206, 595-606.
 97. Yoneda, O., Imai, T., Goda, S., Inoue, H., Yamauchi, A., Okazaki, T., Imai, H., Yoshie, O., Bloom, E. T., Domae, N. & Umehara, H. 2000. Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. *Journal of Immunology*, 164, 4055-4062.
 98. Hatori, K., Nagai, A., Heisel, R., Ryu, J. K. & Kim, S. U. 2002. Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells. *Journal of Neuroscience Research*, 69, 418-426.
 99. Furio, E., García-Fuster, M. J., Redon, J., Marques, P., Ortega, R., Sanz, M. J. & Piqueras, L. 2018. CX3CR1/CX3CL1 Axis Mediates Platelet-

- Leukocyte Adhesion to Arterial Endothelium in Younger Patients with a History of Idiopathic Deep Vein Thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*, 118, 562-571.
100. Marques, P., Collado, A., Martinez-Hervas, S., Domingo, E., Benito, E., Piqueras, L., Real, J. T., Ascaso, J. F. & Sanz, M. J. 2019. Systemic Inflammation in Metabolic Syndrome: Increased Platelet and Leukocyte Activation, and Key Role of CX3CL1/CX3CR1 and CCL2/CCR2 Axes in Arterial Platelet-Proinflammatory Monocyte Adhesion. *Journal of Clinical Medicine*, 8, 708.
 101. Postea, O., Vasina, E. M., Cauwenberghs, S., Projahn, D., Liehn, E. A., Lievens, D., Theelen, W., Kramp, B. K., Butoi, E. D., Soehnlein, O., Heemskerk, J. W., Ludwig, A., Weber, C. & Koenen, R. R. 2012. Contribution of platelet CX(3)CR1 to platelet-monocyte complex formation and vascular recruitment during hyperlipidemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32, 1186-1193.
 102. Hildemann, S. K., Schulz, C., Fraccarollo, D., Schopp, C., Flierl, U., Wissel, K., Pelisek, J., Massberg, S., Bauersachs, J. & Schafer, A. 2014. Fractalkine promotes platelet activation and vascular dysfunction in congestive heart failure. *Thrombosis and Haemostasis*, 111, 725-735.
 103. Ahadzadeh, E., Rosendahl, A., Czesla, D., Steffens, P., Prussner, L., Meyer-Schwesinger, C., Wanner, N., Paust, H. J., Huber, T. B., Stahl, R. A. K., Wiech, T., Kurts, C., Seniuk, A., Ehmke, H. & Wenzel, U. O. 2018. The chemokine receptor CX3CR1 reduces renal injury in mice with angiotensin II-induced hypertension. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 315, F1526-F1535.
 104. Menasria, R., Canivet, C., Piret, J., Gosselin, J. & Boivin, G. 2017. Protective role of CX3CR1 signalling in resident cells of the central nervous system during experimental herpes simplex virus encephalitis. *Journal of General Virology*, 98, 447-460.
 105. Pachot, A., Lepape, A., Vey, S., Bienvenu, J., Mouglin, B. & Monneret, G. 2006. Systemic transcriptional analysis in survivor and non-survivor septic shock patients: a preliminary study. *Immunology Letters*, 106, 63-71.
 106. Raspe, C., Hocherl, K., Rath, S., Sauvant, C. & Bucher, M. 2013. NF-kappaB-mediated inverse regulation of fractalkine and CX3CR1 during CLP-induced sepsis. *Cytokine*, 61, 97-103.
 107. Becker, F., Holthoff, C., Anthoni, C., Rijcken, E., Alexander, J. S., Gavins, F. N., Spiegel, H. U., Senninger, N. & Vowinkel, T. 2017. Downregulation of CX3CR1 ameliorates experimental colitis: evidence for CX3CL1-CX3CR1-mediated immune cell recruitment. *International Journal of Colorectal Disease*, 32, 315-324.

108. Faure, S., Meyer, L., Costagliola, D., Vaneensberghe, C., Genin, E., Autran, B., Delfraissy, J. F., McDermott, D. H., Murphy, P. M., Debré, P., Théodorou, I. & Combadière, C. 2000. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science*, 287, 2274-2277.
109. Moatti, D., Faure, S., Fumeron, F., Amara Mel, W., Seknadji, P., McDermott, D. H., Debré, P., Aumont, M. C., Murphy, P. M., de Prost, D. & Combadière, C. 2001. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood*, 97, 1925-1928.
110. Muehlhoefer, A., Saubermann, L. J., Gu, X., Luedtke-Heckenkamp, K., Xavier, R., Blumberg, R. S., Podolsky, D. K., MacDermott, R. P. & Reinecker, H. C. 2000. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *Journal of Immunology*, 164, 3368-3376.
111. Ludwig, A., Berkhout, T., Moores, K., Groot, P. & Chapman, G. 2002. Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity. *Journal of Immunology*, 168, 604-612.
112. Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T. A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., Kallen, K. J., Rose-John, S. & Ludwig, A. 2003. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*, 102, 1186-1195.
113. Garton, K. J., Gough, P. J., Blobel, C. P., Murphy, G., Greaves, D. R., Dempsey, P. J. & Raines, E. W. 2001. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *Journal of Biological Chemistry*, 276, 37993-38001.
114. Fong, A. M., Robinson, L. A., Steeber, D. A., Tedder, T. F., Yoshie, O., Imai, T. & Patel, D. D. 1998. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *Journal of Experimental Medicine*, 188, 1413-1419.
115. Umehara, H., Bloom, E., Okazaki, T., Domae, N. & Imai, T. 2001. Fractalkine and vascular injury. *Trends in Immunology*, 22, 602-607.
116. Haskell, C. A., Cleary, M. D. & Charo, I. F. 1999. Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 10053-10058.

117. Fujita, M., Takada, Y. K. & Takada, Y. 2012. Integrins $\alpha\beta3$ and $\alpha4\beta1$ act as coreceptors for fractalkine, and the integrin-binding defective mutant of fractalkine is an antagonist of CX3CR1. *Journal of Immunology*, 189, 5809-5819.
118. Baratin, M., Simon, L., Jorquera, A., Ghigo, C., Dembele, D., Nowak, J., Gentek, R., Wienert, S., Klauschen, F., Malissen, B., Dalod, M. & Bajénoff, M. 2017. T Cell Zone Resident Macrophages Silently Dispose of Apoptotic Cells in the Lymph Node. *Immunity*, 47, 349-362.
119. Sokolowski, J. D., Chabanon-Hicks, C. N., Han, C. Z., Heffron, D. S. & Mandell, J. W. 2014. Fractalkine is a "find-me" signal released by neurons undergoing ethanol-induced apoptosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 360.
120. Zhang, H., Hinkle, C. C., O'Neill, S. M., Shi, J., Caughey, J., Lynch, E., Lynch, G., Gerelus, M., Tsai, A. S. D., Shah, R., Ferguson, J. F., Ahima, R. S. & Reilly, M. P. 2017. Synergistic Modulation of Inflammatory but not Metabolic Effects of High-Fat Feeding by CCR2 and CX3CR1. *Obesity (Silver Spring)*, 25, 1410-1420.
121. Combadiere, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A. & Mallat, Z. 2008. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 117, 1649-1657.
122. Mionnet, C., Buatois, V., Kanda, A., Milcent, V., Fleury, S., Lair, D., Langelot, M., Lacoeyille, Y., Hessel, E., Coffman, R., Magnan, A., Dombrowicz, D., Glaichenhaus, N. & Julia, V. 2010. CX3CR1 is required for airway inflammation by promoting T helper cell survival and maintenance in inflamed lung. *Nature Medicine*, 16, 1305-1312.
123. Luong, V. H., Utsunomiya, A., Chino, T., Doanh, L. H., Matsushita, T., Obara, T., Kuboi, Y., Ishii, N., Machinaga, A., Ogasawara, H., Ikeda, W., Kawano, T., Imai, T., Oyama, N. & Hasegawa, M. 2019. Inhibition of the Progression of Skin Inflammation, Fibrosis, and Vascular Injury by Blockade of the CX3 CL1/CX3 CR1 Pathway in Experimental Mouse Models of Systemic Sclerosis. *Arthritis and Rheumatology*, 71, 1923-1934.
124. BD Bioscience 2012. Brochure BD FACS CANTO II.
125. Lüllmann-Rauch, R. 2009. *Taschenlehrbuch Histologie*, Stuttgart, Thieme. 599.
126. Vectastain 2017. Datasheet ABC-Kit.
127. peqLab Datenblatt peqGold TriFast. *Version (v0815_D)*.

128. Löffler, G., Petrides, P. E., Heinrich, P. C. & Graeve, L. 2014. *Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie*, Berlin ; Heidelberg, Springer. 666-667, 673-674.
129. Löffler, G., Petrides, P. E., Heinrich, P. C. & Graeve, L. 2014. *Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie*, Berlin Heidelberg, Springer. 889.
130. Thermo Scientific 2013. Introduction Pierce™ BCA Protein Assay Kit.
131. Ngamsri, K. C., Böhne, J., Simelitis, M. S., Gamper-Tsigaras, J., Zhang, Y., Ehnert, S. & Konrad, F. M. 2021. CX3CR1 Depletion Promotes the Formation of Platelet-Neutrophil Complexes and Aggravates Acute Peritonitis. *Shock*, 287-297.
132. Ngamsri, K. C., Jans, C., Putri, R. A., Schindler, K., Gamper-Tsigaras, J., Eggstein, C., Köhler, D. & Konrad, F. M. 2020. Inhibition of CXCR4 and CXCR7 Is Protective in Acute Peritoneal Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 11, 407.
133. Lionakis, M. S., Swamydas, M., Fischer, B. G., Plantinga, T. S., Johnson, M. D., Jaeger, M., Green, N. M., Masedunskas, A., Weigert, R., Mikelis, C., Wan, W., Lee, C. C., Lim, J. K., Rivollier, A., Yang, J. C., Laird, G. M., Wheeler, R. T., Alexander, B. D., Perfect, J. R., Gao, J. L., Kullberg, B. J., Netea, M. G. & Murphy, P. M. 2013. CX3CR1-dependent renal macrophage survival promotes *Candida* control and host survival. *Journal of Clinical Investigation*, 123, 5035-5051.
134. Singh, N., Rai, H., Sinha, N., Kumar, S., Pandey, C. M. & Agrawal, S. 2012. Association of V249I and T280M polymorphisms in the chemokine receptor CX3CR1 gene with early onset of coronary artery disease among North Indians. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 16, 756-760.
135. Niessner, A., Marculescu, R., Haschemi, A., Endler, G., Zorn, G., Weyand, C. M., Maurer, G., Mannhalter, C., Wojta, J., Wagner, O. & Huber, K. 2005. Opposite effects of CX3CR1 receptor polymorphisms V249I and T280M on the development of acute coronary syndrome. A possible implication of fractalkine in inflammatory activation. *Thrombosis and Haemostasis*, 93, 949-954.
136. Ishida, Y., Hayashi, T., Goto, T., Kimura, A., Akimoto, S., Mukaida, N. & Kondo, T. 2008. Essential Involvement of CX3CR1-Mediated Signals in the Bactericidal Host Defense during Septic Peritonitis. *Journal of Immunology*, 181, 4208-4218.
137. Hamon, P., Loyher, P. L., Baudesson de Chanville, C., Licata, F., Combadière, C. & Boissonnas, A. 2017. CX3CR1-dependent endothelial margination modulates Ly6C(high) monocyte systemic deployment upon inflammation in mice. *Blood*, 129, 1296-1307.

138. Amsellem, V., Abid, S., Poupel, L., Parpaleix, A., Rodero, M., Gary-Bobo, G., Latiri, M., Dubois-Rande, J. L., Lipskaia, L., Combadiere, C. & Adnot, S. 2017. Roles for the CX3CL1/CX3CR1 and CCL2/CCR2 Chemokine Systems in Hypoxic Pulmonary Hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 56, 597-608.
139. Arbonés, M. L., Ord, D. C., Ley, K., Rotech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D. J. & Tedder, T. F. 1994. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity*, 1, 247-260.
140. Hickey, M. J., Forster, M., Mitchell, D., Kaur, J., De Caigny, C. & Kubes, P. 2000. L-selectin facilitates emigration and extravascular locomotion of leukocytes during acute inflammatory responses in vivo. *Journal of Immunology*, 165, 7164-7170.
141. Sreeramkumar, V., Adrover, J. M., Ballesteros, I., Cuartero, M. I., Rossaint, J., Bilbao, I., Nácher, M., Pitaval, C., Radovanovic, I., Fukui, Y., McEver, R. P., Filippi, M. D., Lizasoain, I., Ruiz-Cabello, J., Zarbock, A., Moro, M. A. & Hidalgo, A. 2014. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science*, 346, 1234-1238.
142. Lam, F. W., Burns, A. R., Smith, C. W. & Rumbaut, R. E. 2011. Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 300, H468-475.
143. Zuchriegel, G., Uhl, B., Pühr-Westerheide, D., Pörnbacher, M., Lauber, K., Krombach, F. & Reichel, C. A. 2016. Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. *PLoS Biology*, 14, e1002459.
144. Hanlon, S. D., Smith, C. W., Sauter, M. N. & Burns, A. R. 2014. Integrin-dependent neutrophil migration in the injured mouse cornea. *Experimental Eye Research*, 120, 61-70.
145. Johansson, D., Shannon, O. & Rasmussen, M. 2011. Platelet and neutrophil responses to Gram positive pathogens in patients with bacteremic infection. *PLoS One*, 6, e26928.
146. Liverani, E., Mondrinos, M. J., Sun, S., Kunapuli, S. P. & Kilpatrick, L. E. 2018. Role of Protein Kinase C-delta in regulating platelet activation and platelet-leukocyte interaction during sepsis. *PLoS One*, 13, e0195379.
147. Gawaz, M., Dickfeld, T., Bogner, C., Fateh-Moghadam, S. & Neumann, F. J. 1997. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Medicine*, 23, 379-385.
148. Kirschenbaum, L. A., Aziz, M., Astiz, M. E., Saha, D. C. & Rackow, E. C. 2000. Influence of rheologic changes and platelet-neutrophil interactions

- on cell filtration in sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161, 1602-1607.
149. Pamuk, G. E., Vural, O., Turgut, B., Demir, M., Umit, H. & Tezel, A. 2006. Increased circulating platelet-neutrophil, platelet-monocyte complexes, and platelet activation in patients with ulcerative colitis: a comparative study. *American Journal of Hematology*, 81, 753-759.
 150. Köhler, D., Granja, T., Volz, J., Koeppen, M., Langer, H. F., Hansmann, G., Legchenko, E., Geisler, T., Bakchoul, T., Eggstein, C., Häberle, H. A., Nieswandt, B. & Rosenberger, P. 2020. Red blood cell-derived semaphorin 7A promotes thrombo-inflammation in myocardial ischemia-reperfusion injury through platelet GPIIb. *Nature Communications*, 11, 1315.
 151. Claushuis, T. A., de Stoppelaar, S. F., Stroo, I., Roelofs, J. J., Ottenhoff, R., van der Poll, T. & Van't Veer, C. 2017. Thrombin contributes to protective immunity in pneumonia-derived sepsis via fibrin polymerization and platelet-neutrophil interactions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 15, 744-757.
 152. Wang, X. L., Deng, H. F., Li, T., Miao, S. Y., Xiao, Z. H., Liu, M. D., Liu, K. & Xiao, X. Z. 2019. Clopidogrel reduces lipopolysaccharide-induced inflammation and neutrophil-platelet aggregates in an experimental endotoxemic model. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33, e22279.
 153. Moon, D. G., van der Zee, H., Weston, L. K., Gudewicz, P. W., Fenton, J. W., 2nd & Kaplan, J. E. 1990. Platelet modulation of neutrophil superoxide anion production. *Thrombosis and Haemostasis*, 63, 91-96.
 154. Hidalgo, A., Chang, J., Jang, J. E., Peired, A. J., Chiang, E. Y. & Frenette, P. S. 2009. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nature Medicine*, 15, 384-391.
 155. Wetterö, J., Tengvall, P. & Bengtsson, T. 2003. Platelets stimulated by IgG-coated surfaces bind and activate neutrophils through a selectin-dependent pathway. *Biomaterials*, 24, 1559-1573.
 156. Colón, D. F., Wanderley, C. W., Franchin, M., Silva, C. M., Hiroki, C. H., Castanheira, F. V. S., Donate, P. B., Lopes, A. H., Volpon, L. C., Kavaguti, S. K., Borges, V. F., Speck-Hernandez, C. A., Ramalho, F., Carlotti, A. P., Carmona, F., Alves-Filho, J. C., Liew, F. Y. & Cunha, F. Q. 2019. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. *Critical Care (London, England)*, 23, 113.
 157. Maruchi, Y., Tsuda, M., Mori, H., Takenaka, N., Gocho, T., Huq, M. A. & Takeyama, N. 2018. Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level

- predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. *Critical Care (London, England)*, 22, 176.
158. Hoogendijk, A. J., Wiewel, M. A., van Vught, L. A., Scicluna, B. P., Belkasim-Bohoudi, H., Horn, J., Zwinderman, A. H., Klein Klouwenberg, P. M. C., Cremer, O. L., Bonten, M. J., Schultz, M. J., van der Poll, T. & Care, o. b. o. t. M. c. J. C. 2015. Plasma fractalkine is a sustained marker of disease severity and outcome in sepsis patients. *Critical Care*, 19, 412.
 159. Wong, B. W., Wong, D. & McManus, B. M. 2002. Characterization of fractalkine (CX3CL1) and CX3CR1 in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus, and transplant vascular disease. *Cardiovascular Pathology*, 11, 332-338.
 160. Ji, C. L., Nomi, A., Li, B., Shen, C., Song, B. C. & Zhang, J. G. 2019. Increased Plasma Soluble Fractalkine in Patients with Chronic Heart Failure and Its Clinical Significance. *International Heart Journal*, 60, 701-707.
 161. Gao, L., Xu, Z., Yin, Z., Chen, K., Wang, C. & Zhang, H. 2015. Association of hydrogen sulfide with alterations of monocyte chemokine receptors, CCR2 and CX3CR1 in patients with coronary artery disease. *Inflammation Research*, 64, 627-635.
 162. Richter, B., Koller, L., Hohensinner, P. J., Rychli, K., Zorn, G., Goliash, G., Berger, R., Mortl, D., Maurer, G., Huber, K., Pacher, R., Wojta, J., Hulsmann, M. & Niessner, A. 2012. Fractalkine is an independent predictor of mortality in patients with advanced heart failure. *Thrombosis and Haemostasis*, 108, 1220-1227.
 163. Dénes, A., Ferenczi, S., Halász, J., Környei, Z. & Kovács, K. J. 2008. Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28, 1707-1721.
 164. Oh, D. J., Dursun, B., He, Z., Lu, L., Hoke, T. S., Ljubanovic, D., Faubel, S. & Edelstein, C. L. 2008. Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 294, F264-271.
 165. Tsai, W. C., Strieter, R. M., Mehrad, B., Newstead, M. W., Zeng, X. & Standiford, T. J. 2000. CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infection and Immunity*, 68, 4289-4296.
 166. Sheikh, S., Rahman, M., Gale, Z., Luu, N. T., Stone, P. C., Matharu, N. M., Rainger, G. E. & Nash, G. B. 2005. Differing mechanisms of leukocyte recruitment and sensitivity to conditioning by shear stress for endothelial

- cells treated with tumour necrosis factor-alpha or interleukin-1beta. *British Journal of Pharmacology*, 145, 1052-1061.
167. Weber, C. & Springer, T. A. 1997. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIb beta3 and stimulated by platelet-activating factor. *Journal of Clinical Investigation*, 100, 2085-2093.
168. De Filippo, K., Henderson, R. B., Laschinger, M. & Hogg, N. 2008. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *Journal of Immunology*, 180, 4308-4315.
169. De Filippo, K., Dudeck, A., Hasenberg, M., Nye, E., van Rooijen, N., Hartmann, K., Gunzer, M., Roers, A. & Hogg, N. 2013. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*, 121, 4930-4937.
170. Paudel, S., Baral, P., Ghimire, L., Bergeron, S., Jin, L., DeCorte, J. A., Le, J. T., Cai, S. & Jeyaseelan, S. 2019. CXCL1 regulates neutrophil homeostasis in pneumonia-derived sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3. *Blood*, 133, 1335-1345.
171. Catar, R. A., Chen, L., Cuff, S. M., Kift-Morgan, A., Eberl, M., Kettritz, R., Kamhieh-Milz, J., Moll, G., Li, Q., Zhao, H., Kawka, E., Zickler, D., Parekh, G., Davis, P., Fraser, D. J., Dragun, D., Eckardt, K. U., Jörres, A. & Witowski, J. 2020. Control of neutrophil influx during peritonitis by transcriptional cross-regulation of chemokine CXCL1 by IL-17 and IFN- γ . *Journal of Pathology*, 175-186.
172. Tavares-Murta, B. M., Zaparoli, M., Ferreira, R. B., Silva-Vergara, M. L., Oliveira, C. H., Murta, E. F., Ferreira, S. H. & Cunha, F. Q. 2002. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Critical Care Medicine*, 30, 1056-1061.
173. Lentini, G., Famà, A., Biondo, C., Mohammadi, N., Galbo, R., Mancuso, G., Iannello, D., Zummo, S., Giardina, M., De Gaetano, G. V., Teti, G., Beninati, C. & Midiri, A. 2020. Neutrophils Enhance Their Own Influx to Sites of Bacterial Infection via Endosomal TLR-Dependent Cxcl2 Production. *Journal of Immunology*, 204, 660-670.
174. Cardona, S. M., Kim, S. V., Church, K. A., Torres, V. O., Cleary, I. A., Mendiola, A. S., Saville, S. P., Watowich, S. S., Parker-Thornburg, J., Soto-Ospina, A., Araque, P., Ransohoff, R. M. & Cardona, A. E. 2018. Role of the Fractalkine Receptor in CNS Autoimmune Inflammation: New Approach Utilizing a Mouse Model Expressing the Human CX3CR1(I249/M280) Variant. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 365.

175. Feng, X., Szulzewsky, F., Yerevanian, A., Chen, Z., Heinzmann, D., Rasmussen, R. D., Alvarez-Garcia, V., Kim, Y., Wang, B., Tamagno, I., Zhou, H., Li, X., Kettenmann, H., Ransohoff, R. M. & Hambardzumyan, D. 2015. Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. *Oncotarget*, 6, 15077-15094.
176. Opal, S. M. & van der Poll, T. 2015. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *Journal of Internal Medicine*, 277, 277-293.
177. Härter, L., Keel, M., Steckholzer, U., Ungethuem, U., Trentz, O. & Ertel, W. 2002. Activation of mitogen-activated protein kinases during granulocyte apoptosis in patients with severe sepsis. *Shock*, 18, 401-406.
178. Aomatsu, K., Kato, T., Fujita, H., Hato, F., Oshitani, N., Kamata, N., Tamura, T., Arakawa, T. & Kitagawa, S. 2008. Toll-like receptor agonists stimulate human neutrophil migration via activation of mitogen-activated protein kinases. *Immunology*, 123, 171-180.
179. Lee, K. M., Jeon, S. M. & Cho, H. J. 2010. Interleukin-6 induces microglial CX3CR1 expression in the spinal cord after peripheral nerve injury through the activation of p38 MAPK. *European Journal of Pain (London, England)*, 14, 682.
180. Galán-Ganga, M., García-Yagüe Á, J. & Lastres-Becker, I. 2019. Role of MSK1 in the Induction of NF- κ B by the Chemokine CX3CL1 in Microglial Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39, 331-340.
181. Sun, C., Hu, A., Wang, S., Tian, B., Jiang, L., Liang, Y., Wang, H. & Dong, J. 2020. ADAM17-regulated CX3CL1 expression produced by bone marrow endothelial cells promotes spinal metastasis from hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*, 57, 249-263.
182. O'Sullivan, S. A., Gasparini, F., Mir, A. K. & Dev, K. K. 2016. Fractalkine shedding is mediated by p38 and the ADAM10 protease under pro-inflammatory conditions in human astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, 13, 189.
183. Yadav, A. K., Kumar, V. & Jha, V. 2016. Association of chemokine receptor CX3CR1 V249I and T280M polymorphisms with chronic kidney disease. *Indian Journal of Nephrology*, 26, 275-279.
184. Li, Y., Brazzell, J., Herrera, A. & Walcheck, B. 2006. ADAM17 deficiency by mature neutrophils has differential effects on L-selectin shedding. *Blood*, 108, 2275-2279.
185. Long, C., Hosseinkhani, M. R., Wang, Y., Sriramarao, P. & Walcheck, B. 2012. ADAM17 activation in circulating neutrophils following bacterial challenge impairs their recruitment. *Journal of Leukocyte Biology*, 92, 667-672.

186. Kermarrec, N., Selloum, S., Plantefeve, G., Chosidow, D., Paoletti, X., Lopez, A., Mantz, J., Desmots, J. M., Gougerot-Pocidaló, M. A. & Chollet-Martin, S. 2005. Regulation of peritoneal and systemic neutrophil-derived tumor necrosis factor- α release in patients with severe peritonitis: role of tumor necrosis factor- α converting enzyme cleavage. *Critical Care Medicine*, 33, 1359-1364.
187. Seidelin, J. B., Nielsen, O. H. & Strøm, J. 2002. Soluble L-selectin levels predict survival in sepsis. *Intensive Care Medicine*, 28, 1613-1618.
188. Zonneveld, R., Martinelli, R., Shapiro, N. I., Kuijpers, T. W., Plötz, F. B. & Carman, C. V. 2014. Soluble adhesion molecules as markers for sepsis and the potential pathophysiological discrepancy in neonates, children and adults. *Critical Care (London, England)*, 18, 204.
189. Zunke, F. & Rose-John, S. 2017. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864, 2059-2070.
190. Edwards, D. R., Handsley, M. M. & Pennington, C. J. 2008. The ADAM metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine*, 29, 258-289.
191. Wawro, K., Wawro, M., Strzelecka, M., Czarnek, M. & Bereta, J. 2019. The role of NF- κ B and Elk-1 in the regulation of mouse ADAM17 expression. *Biology Open*, 8, bio039420.
192. Inoue, Y., Shimazawa, M., Nakamura, S., Takata, S., Hashimoto, Y., Izawa, H., Masuda, T., Tsuruma, K., Sakaue, T., Nakayama, H., Higashiyama, S. & Hara, H. 2018. Both Autocrine Signaling and Paracrine Signaling of HB-EGF Enhance Ocular Neovascularization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38, 174-185.
193. Speyer, C. L., Gao, H., Rancilio, N. J., Neff, T. A., Huffnagle, G. B., Sarma, J. V. & Ward, P. A. 2004. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *American Journal of Pathology*, 165, 2187-2196.
194. An, J. L., Ishida, Y., Kimura, A., Tsokos, M. & Kondo, T. 2009. Immunohistochemical detection of CCR2 and CX3CR1 in sepsis-induced lung injury. *Forensic Science International*, 192, e21-25.
195. Green, S. R., Han, K. H., Chen, Y., Almazan, F., Charo, I. F., Miller, Y. I. & Quehenberger, O. 2006. The CC chemokine MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK. *Journal of Immunology*, 176, 7412-7420.
196. Montague, K., Simeoli, R., Valente, J. & Malcangio, M. 2018. A novel interaction between CX(3)CR(1) and CCR(2) signalling in monocytes

- constitutes an underlying mechanism for persistent vincristine-induced pain. *Journal of Neuroinflammation*, 15, 101.
197. Käufer, C., Chhatbar, C., Bröer, S., Walzl, I., Ghita, L., Gerhauser, I., Kalinke, U. & Löscher, W. 2018. Chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 regulate viral encephalitis-induced hippocampal damage but not seizures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, E8929-E8938.
 198. Faustino, J., Chip, S., Derugin, N., Jullienne, A., Hamer, M., Haddad, E., Butovsky, O., Obenaus, A. & Vexler, Z. S. 2019. CX3CR1-CCR2-dependent monocyte-microglial signaling modulates neurovascular leakage and acute injury in a mouse model of childhood stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39, 1919-1935.
 199. Jerath, M. R., Liu, P., Struthers, M., Demartino, J. A., Peng, R., Peterson, L. B., Cumiskey, A. M., Yang, L., Rojas, M., Patel, D. D. & Fong, A. M. 2010. Dual targeting of CCR2 and CX3CR1 in an arterial injury model of vascular inflammation. *Thrombosis Journal*, 8, 14.

6.2 Material

6.2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Ort
Brutschrank	Heraeus Oven	Thermo Scientific	Schwerte, DE
Cheminlumineszenz Reader	Fusion SL	Vilber Lourmat	Eberhardzell, DE
Einbettssystem	EG1150H	Leica	Wetzlar, DE
ELISA Washer	hydro flex	Tecan	Männedorf, CH
Histokarussell	TP1020	Leica	Wetzlar, DE
Homogenisator	Precellys 24	Bertin technologies	Montigny-le-Bretonneux, FR
Inkubationsschüttler	Infors HT Ecotron	Infors AG	Einsbach, DE
Mehrkanalpipette 100 µl	Research plus	eppendorf	Hamburg, DE
Mehrkanalpipette 300 µl	Reasearch plus	eppendorf	Hamburg, DE
Microplate reader	Infinite M200 Pro	Tecan	Männedorf, CH
Microtom	RM2235	Leica	Wetzlar, DE
Mikroskop	Leitz DM IRB	Leica	Bensheim, DE
Mikrowelle		Bosch	Stuttgart, DE
Multipipette	Multipipette plus	eppendorf	Hamburg, DE
Nanodrop	NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific	Schwerte, DE
Paraffinstreckbad	HI1210	Leica	Wetzlar, DE
Paraffinstrecktisch	HI1220	Leica	Wetzlar, DE
Pipetboy	Pipetboy acu	Integra Biosciences	Wallisellen, CH
Pipette 10 µl	Reference	eppendorf	Hamburg, DE
Pipette 100 µl	Reference	eppendorf	Hamburg, DE
Pipette 1000 µl	Reference	eppendorf	Hamburg, DE
Pipette 20 µl	Research plus	eppendorf	Hamburg, DE
Pipette 200 µl	Research plus	eppendorf	Hamburg, DE
Thermoblock	Thermomixer 5436	eppendorf	Hamburg, DE
Thermocycler	T100 Thermal Cycler	Bio Rad	München, DE
Thermocycler	C1000 Thermal Cycler CFX96 Real-Time System	Bio Rad	München, DE
Tischmischer	Vortex Genie 2	Scientific Industrie	New York, USA
Tischzentrifuge	Sprout	Heathrow Scientific	Vernon Hills, USA

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Ort
Waage	Mettler PK4800	Mettler	Gießen, DE
Waage	Kern ALS	Kern & Sohn GmbH	Balingen, DE
Wippschüttler	Wippschüttler ST5	CAT	Ballrechten-Dottingen, DE
Wippschüttler	Speci-Mix 92641	Bioblock Scientific	Dubuque, USA
Zentrifuge	Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scientific	Schwerte, DE
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Scientific	Schwerte, DE

6.2.2 Materialien

Material	Hersteller	Ort
Abdeckfolie für PCR Platten	Bio Rad	München, DE
Abdeckfolien für ELISA Platten	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Deckgläser (24 x 50 mm)	R. Langenbrinck GmbH	Emmendingen, DE
Einbett-Kassetten	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
ELISA Platten	Thermo Scientific	Schwerte, DE
FACS Falcon 5 ml	Corning Science Mexico	Tamaulipas, Mexiko
Falcon 15 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, DE
Falcon 50 ml	Corning Science	Tamaulipas, Mexiko
Fettstift	Kisker Biotech	Steinfurt, DE
Filterpapier (10 cm)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Filterpipettenspitze 10 µl kurz	nerbe plus GmbH	Winsen, DE
Filterpipettenspitze 10 µl lang	nerbe plus GmbH	Winsen, DE
Filterpipettenspitze 100 µl	nerbe plus GmbH	Winsen, DE
Filterpipettenspitze 1000 µl	nerbe plus GmbH	Winsen, DE
Filterpipettenspitze 20 µl	nerbe plus GmbH	Winsen, DE
Filterpipettenspitze 200 µl	nerbe plus GmbH	Winsen, DE
Kanüle Microlance 3 (27G)	BD	Drogheda, Irland
Kanüle Sterican (20G)	Braun Medical	Melsungen, DE
Kryo Röhrchen Vials 1,8 ml	Thermo Scientific	Roskilde, Dänemark
Mehrkanalpipettenspitzen 200 µl	eppendorf	Hamburg, DE
Microtome Blade R35	Feather	Osaka, JPN
Mullkompresse Gazin	Lohmann & Rauscher GmbH	Rengsdorf, DE
Multipipetten Spitze 10 ml	eppendorf	Hamburg, DE

Material	Hersteller	Ort
Mundschutz Aura Health Care Respirator	3M	Berkshire, UK
Nitril Handschuhe	Abena	Aabenraa, Dänemark
Nitril Handschuhe	Paul Hartmann AG	Heidenheim, DE
Paraplast Plus	Mc Cormick Scientific	Richmond, USA
Pasteurpipette 3ml	Alpha Laboratories Limited	Eastleigh, UK
PCR Platte 96 well, klar	Bio Rad	München, DE
Pipettenspitze 10 µl	Sarstedt	Nürnberg, DE
Pipettenspitze 1000 µl	Sarstedt	Nürnberg, DE
Pipettenspitze 20 µl	Sarstedt	Nürnberg, DE
Pipettenspitze 200 µl	Sarstedt	Nürnberg, DE
Punktionskanüle (22 GA 1.00 IN)	BD	Utah, USA
PVDF Membran (0,45 µm)	Thermo Scientific	Rockford, USA
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, DE
RNase frei Reaktionsgefäße 1,5 ml	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Spritze 1 ml	BD	Madrid, Spanien
Spritze 10 ml Injekt	Braun Medical	Melsungen, DE
Spritze 2 ml Injekt Luer Solo	Braun Medical	Melsungen, DE
Spritze 5 ml Injekt Luer Solo	Braun Medical	Melsungen, DE
Stripette 10 ml	Corning Life Sciences	Durham, USA
Stripette 25 ml	Corning Life Sciences	Durham, USA
Stripette 5ml	Corning Life Sciences	Durham, USA
SuperFrost Plus Objekt	R. Langenbrinck GmbH	Emmendingen, DE
Zellkulturplatten Cellstar	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, DE
Zellsieb (70 µm Porengröße)	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, DE

6.2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Ort
ABTS	Sigma Aldrich	Darmstadt, DE
Chloroform	honeywell	Morristown, USA
DAB Peroxidase Substrate Kit SK-4100	Vector Laboratories	St. Louis, USA
Ethanol	PanReac AppliChem	Darmstadt, DE
Eukitt Quick-hardening mounting medium	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Formaldehyd (4%)	PanReac AppliChem	Darmstadt, DE
Glycerin	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Histogreen Buffer	Linaris	Dossenheim, DE
Histogreen H2O2	Linaris	Dossenheim, DE
Histogreen Substrat	Linaris	Dossenheim, DE
Isopropanol	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio Rad	München, DE
Mayers Hämlaunlösung	Merck	Darmstadt, DE
Methanol	honeywell	Morristown, USA
NaN ₃	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Nuclear Fast Red	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Nuclease Freies Wasser	PanReac AppliChem	Darmstadt, DE
PBS Minus	Gibco	Carlsbad, USA
peqGold TriFast	VWR Life Science	Darmstadt, DE
Protease u. Phosphatase Inhibitor	Thermo Scientific	Schwerte, DE
RNase Away	Thermo Scientific	Schwerte, DE
Triton X-100	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Trockenmilch	PanReac AppliChem	Karlsruhe, DE
Türks Lösung	Merck	Darmstadt, DE
Tween 20	PanReac AppliChem	Darmstadt, DE
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck	Darmstadt, DE
Western Blotting Luminol Reagent sc-2048	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
Xylol	PanReac AppliChem	Darmstadt, DE

6.2.4 Lösungen

Lösung	Hersteller	Ort
Avidin Blocking Solution	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Biotin Blocking Solution	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Unmasking Solution	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Color Reagent A	R&D Systems	Minneapolis, USA
Color Reagent B	R&D Systems	Minneapolis, USA
<u>ELISA Stopp Lösung</u> 68 ml A. dest. 4 ml H ₂ SO ₄ (18 M)	eigene Herstellung	Tübingen, DE
Erythrozyten-Lyse FACS Lysing Solution	BD Biosciences	San Jose, USA
FACS Flow	BD Bioscience	San Jose, USA
FACS Shutdown Solution	BD Bioscience	San Jose, USA
FACS Clean	BD Bioscience	San Jose, USA
<u>Färbepuffer:</u> 1 Liter Aqua dest. 2 Tabletten PBS Minus 10 g BSA 5 ml NaN ₃	eigene Herstellung	Tübingen, DE
Tris-Glycin-SDS Puffer	Bio Rad	München, DE
<u>Tris-Glycin-Transferpuffer</u> 400 ml Methanol 200 ml Tris-Glycin (10x Konz.) 1400 ml A. dest.	eigene Herstellung	Tübingen, DE

6.2.5 Medikamente

Medikament	Wirkstoff	Dosierung	Firma	Ort
Ketamin-hameln	Ketamin-hydrochlorid	50 mg/ml	Hameln Pharma Plus GmbH	Hameln, DE
Sedaxylan	Xylazin	20 mg/ml	Dechra Pharmaceuticals	Northwich, GB
Heparin	Heparin-Natrium	5000 I.E./ml	Leo Pharma GmbH	Neu-Isenburg, DE
Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1 mg/ml	Sigma	St. Louis, USA
NaCl	Natriumchlorid	0,9%	Braun	Melsungen, Hessen

6.2.6 PCR-Primer

PCR Primer	Sequenz	Hersteller	Ort
murin ADAM10 fwd	5'-cat tgc tga gtg gat tgt gg-3'	biomers	Ulm, DE
murin ADAM10 rev	5'-gtg cct gga agt ggt tta gg-3'	biomers	Ulm, DE
murin ADAM17 fwd	5'-gga aca cgt cgt ggg ata at-3'	biomers	Ulm, DE
murin ADAM17 rev	5'-agc atc ttc aca tcc caa gc-3'	biomers	Ulm, DE
murin CCL2 fwd	5'-cca caa cca cct caa gca c-3'	biomers	Ulm, DE
murin CCL2 rev	5'-agg cat cac agt ccg agt c-3'	biomers	Ulm, DE
murin CCR2 fwd	5'-gcc atc ata aag gag cca tac c-3'	biomers	Ulm, DE
murin CCR2 rev	5'-gga gta gag tgg agg cag ga-3'	biomers	Ulm, DE
murin CX3CR1 fwd	5'-cag cat cga ccg gta cct t-3'	biomers	Ulm, DE
murin CX3CR1 rev	5'-gct gca ctg tcc ggt tgt t-3'	biomers	Ulm, DE
murin CXCL1 fwd	5'-aaa ccg aag tca tag cca cac-3'	biomers	Ulm, DE
murin CXCL1 rev	5'-ggg gac acc ttt tag cat ctt-3'	biomers	Ulm, DE
murin CXCL2 fwd	5'-atc cag agc ttg agt gtg acg-3'	biomers	Ulm, DE
murin CXCL2 rev	5'-gcc ttg cct ttg ttc agt atc-3'	biomers	Ulm, DE
murin FKN fwd	5'-acg aaa tgc gaa atc atg tgc-3'	biomers	Ulm, DE
murin FKN rev	5'-ctg tgt cgt ctc cag gac aa-3'	biomers	Ulm, DE
murin IL1 β fwd	5'-cat tgt ggc tgt gga gaa gct g-3'	biomers	Ulm, DE
murin IL1 β rev	5'-ggg aac gtc aca cac cag cag g-3'	biomers	Ulm, DE
murin IL6 fwd	5'-gag gat acc act ccc aac ag-3'	biomers	Ulm, DE
murin IL6 rev	5'-aac gca cta ggt ttg ccg ag-3'	biomers	Ulm, DE
murin TNF α fwd	5'-tct act gaa ctt cgg ggt ga-3'	biomers	Ulm, DE
murin TNF α rev	5'-cac ttg gtg gtt tgc tac ga-3'	biomers	Ulm, DE
murin TSPN24 fwd	5'-ggg aac ggg tat gag tgg-3'	biomers	Ulm, DE
murin TSPN24 rev	5'-agg ccg tgg cta ggt aag-3'	biomers	Ulm, DE
murin TSPN28 fwd	5'-ccc tac gtc tca ttc tcc-3'	biomers	Ulm, DE
murin TSPN28 rev	5'-tgc ttc aca tcc ttg gcg-3'	biomers	Ulm, DE
murin TSPN29 fwd	5'-ctt ctg tcc cag tcg ttc-3'	biomers	Ulm, DE
murin TSPN29 rev	5'-ctg ggg ttc atc ctt gct-3'	biomers	Ulm, DE
murin 18s fwd	5'-gta acc cgt tga acc cca tt-3'	biomers	Ulm, DE
murin 18s rev	5'-cca tcc aat cgg tag tag cg-3'	biomers	Ulm, DE

6.2.7 FACS-Antikörper

FACS	Firma	Ort
Cytometer Setup and Tracking Beads	BD Bioscience	San Jose, USA

Antikörper	Fluoreszenz	Klon	Firma	Ort
CD42b	FITC	Xia.G5	Emfret	Eibelstadt, DE
CD45	PerCP/Cy5.5	RA3-6B2	BioLegend	San Diego, USA
Ly6G	PE-Cy7	1A8	BioLegend	San Diego, USA
ADAM10	APC	# 139712	R&D Systems	Minneapolis, USA
ADAM17	PE	KLH	BioSS	Boston, USA
CD62P	APC	RMP-1	BioLegend	San Diego, USA
CD62L	PB	MEL-14	BioLegend	San Diego, USA
CD162	PE	2PH1	BD Bioscience	San Jose, USA
CD192	BV421	SA203G11	BioLegend	San Diego, USA
CD61	APC	2C9.G2	BioLegend	San Diego, USA
CD49e	PE	5H10-27	BioLegend	San Diego, USA

6.2.8 Immunhistochemische Färbung

IHC-Färbung	Hersteller	Ort
Biotinylated Rabbit Anti-Rat IgG	Vector Laboratories	Burlingame, USA
DAPI	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
goat-anti Rabbit IgG	Vector Laboratories	Burlingame, USA
normal rabbit IgG	Invitrogen	Carlsbad, USA
normal rat IgG	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
rabbit anti-mouse CD41	Abcam	Cambridge, UK
rat anti-mouse Ly6G	Abcam	Cambridge, UK
rat anti-mouse neutrophil	Bio Rad	München, DE
Vectastain ABC Kit HRP	Vector Laboratories	Burlingame, USA

6.2.9 ELISA

ELISA	Hersteller	Ort
mouse CXCL1	R & D Systems	Minneapolis, USA
mouse CCL2	R & D Systems	Minneapolis, USA
mouse CX3CL1	R & D Systems	Minneapolis, USA
mouse CXCL2	R & D Systems	Minneapolis, USA
mouse IL6	R & D Systems	Minneapolis, USA
mouse TNF α	R & D Systems	Minneapolis, USA

6.2.10 Western Blots

Marker	Hersteller	Ort
Magic Marker	invitrogen	Carlsbad, USA
Protein Leiter	neoFoxx GmbH	Einhausen, DE
Protein Marker VI (10-245)	PanReac AppliChem	Darmstadt, DE

Antikörper	Hersteller	Ort
Akt 1/2	Santa Cruz	Dallas, USA
Anti-GAPDH	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
ERK1	Santa Cruz	Dallas, USA
Phospho-Akt	Cell Signaling Technology	Danvers, USA
Phospho-ERK	Cell Signaling Technology	Danvers, USA
Phospho-p44/42 MAPK	Cell Signaling Technology	Danvers, USA

6.2.11 Enzyme

Enzym	Hersteller	Ort
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio Rad	München, DE
Collagenase from Clostridium histolyticum	Sigma, Life Science	St. Louis, USA
DNAse from bovine pancreas	Sigma, Life Science	St. Louis, USA
Hyaluronidase from bovine testes	Sigma, Life Science	St. Louis, USA
Streptavidin-HRP	R&D Systems	Minneapolis, USA

6.2.12 Proteinbestimmung

BCA	Hersteller	Ort
Albumin Standard	Thermo Scientific	Rockford, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Rockford, USA
Pierce BCA Protein Reagent A	Thermo Scientific	Rockford, USA
Pierce BCA Protein Reagent B	Thermo Scientific	Rockford, USA

6.2.13 Software

Software	Hersteller	Ort
AxioVision	Zeiss	Oberkochen, DE
bio Render	bio Render	Toronto, Kanada
CFX Manager	Bio Rad	München, DE
Excel	Microsoft	Redmond, USA
FACSDiva Software	Becton Dickinson	Heidelberg, DE
Flow Jo	FlowJo LCC	Ashland, USA
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, Inc.	San Diego, USA
Magellan	Tecan	Männedorf, CH
PowerPoint	Microsoft	Redmond, USA
Word	Microsoft	Redmond, USA

7 Eigenständigkeitserklärung

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin im Zentrum für medizinische Forschung (ZMF) unter Betreuung von PD Dr. Franziska Konrad durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Franziska Konrad und Dr. Kristian-Christos Ngamsri.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Kristian-Christos Ngamsri und Diplom-Biologin Frau Jutta Gamper-Tsigaras von mir eigenständig und in Zusammenarbeit mit Dr. Kristian-Christos Ngamsri durchgeführt. Die Western Blots wurden durch Diplom-Biologin Frau Jutta Gamper-Tsigaras erstellt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 10. Mai 2022

8 Veröffentlichung

Teile der Daten dieses Projekts wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Ngamsri, K.C.; Böhne, J.; Simelitis, M.S.; Gamper-Tsigaras, J.; Zhang, Y.; Ehnert, S.; Konrad, F.M.: CX3CR1 Depletion Promotes the Formation of Platelet-Neutrophil Complexes and Aggravates Acute Peritonitis. Shock, 2021.

Ergebnisse, die in die genannte Publikation eingeflossen sind, wurden im Ergebnisteil mit § gekennzeichnet.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die in verschiedenen Formen zu meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Zunächst danke ich Franziska Konrad für die Überlassung des Themas und die außerordentlich gute Betreuung. Ihre Unterstützung und Vertrauen haben maßgeblich zum Erfolg der Dissertation beigetragen.

Außerdem gilt mein besonderer Dank Kristian Ngamsri, der mir als Betreuer jederzeit für Fragen und Probleme zur Verfügung stand und mich bei meiner Tätigkeit im Labor begleitet hat.

Des Weiteren danke ich Jutta Gamper-Tsigaras. Ihre Unterstützung und Erfahrung im Labor haben zum Gelingen der Projekte beigetragen. Ebenso danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors der Anästhesie Tübingen.

Ich möchte mich bei allen Freundinnen und Freunden sowie Studienkolleginnen und -kollegen bedanken, die mir zur Seite standen.

Abschließend danke ich meinen Eltern, meinen Geschwistern und meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht haben und mich in meinen Taten bekräftigt haben.