

Die Rolle von TNF α in der Blaseninfektion

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Der Rheinisch Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Marzena Schiwon

aus

Ratibor

Bonn 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Die vorliegende Arbeit wurde an den Instituten für Molekulare Medizin und
Experimentelle Immunologie am Universitätsklinikum Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Percy Knolle

Institut für Molekulare Medizin

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

2. Gutachter: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Life and Medical Sciences Institute

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2013

Erscheinungsjahr: 2013

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 6 der Promotionsordnung vom 03.06.2011 im Zeitraum von Juni 2009 bis Mai 2013 von Herrn Prof. Dr. Knolle betreut.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass

- die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln
- persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde,
- die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind,
- die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind, sowie eine Erklärung über frühere Promotionsversuche und deren Resultate,
- für die inhaltlich-materielle Erstellung der vorgelegten Arbeit keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen wurde sowie keinerlei Dritte vom Doktoranden unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Tätigkeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Bonn, den 29.06.2013

An dieser Stelle möchte ich mich bei Professor Dr. Knolle, Professor Dr. Kurts und Dr. Engel für die Überlassung des interessanten Themas und die freundliche Beratung bedanken.

Ich danke ebenfalls Prof. Dr. Kolanus und Prof. Dr. Förster für die Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Zudem möchte ich allen Mitgliedern des Institutes für das freundschaftliche Arbeitsklima und die immer offenen Ohren danken.

Auf diesem Wege möchte ich mich zudem bei meinen Freunden für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft in Form des Händchenhaltens bedanken. Dafür danke ich ganz besonders Jessica Hallerberg.

Ganz herzlich danke ich meinen Eltern, die mir immer zur Seite standen und mich während meiner gesamten Promotion in jeglicher Hinsicht unterstützt und vorangebracht haben. Weiterhin möchte ich meiner Schwester Katharina sehr danken, da sie zu jeder Zeit die passenden Worte gefunden hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt Lars Franken für die außergewöhnliche Unterstützung während meiner gesamten Arbeit und die schöne Zeit zwischendurch. Ohne dich wäre die Zeit nur halb so schön gewesen.

Danke

Für meine Eltern

und

Lars Franken

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Harnwegsinfektionen	1
1.2	Physiologie und Anatomie der Harnblase	2
1.2.1	Lage und Funktion der Harnblase	2
1.2.2	Anatomie der Harnblase	3
1.3	Das Immunsystem	4
1.3.1	Die Entwicklung der Immunzellen	6
1.3.2	Makrophagen	7
1.3.3	Neutrophile Granulozyten	8
1.4	Zytokine, Chemokine und Matrixmetalloproteasen	9
1.4.1	Zytokine	9
1.4.2	Chemokine	11
1.4.3	Matrixmetalloproteasen	12
1.5	Die innate Immunantwort	13
1.5.1	Die Wahrnehmung von Mikroorganismen durch das innate Immunsystem ...	13
1.5.2	Die Rekrutierung und Extravasation von Phagozyten in das infizierte Gewebe	15
1.5.3	Die Migration von Phagozyten zum Infektionsort	18
1.6	Zielsetzung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Verwendete Geräte	20

2.1.2	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.3	Antikörper	24
2.1.4	Verwendete Kits.....	25
2.1.5	Verwendete Bakterienstämme	25
2.1.6	Verwendete Mauslinien	25
2.1.7	Verwendete Pufferlösungen und Medien.....	26
2.1.8	Verwendete Programme.....	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Generierung einer Cystitis in Mäusen.....	28
2.2.2	Entnahme von Vollblut, Mausserum, der Harnblase, Endpunkt- und Sammel – Urin aus uninfizierten und mit UPECs infizierten Mäusen.....	28
2.2.3	Generierung von Einzelzellsuspensionen aus Mausgewebe.....	29
2.2.4	Immunofluoreszenzfärbung und durchflusszytometrische Analyse von Harnblasen- und Blutzellen	30
2.2.5	Detektion und Quantifizierung von Chemokinen, Zytokinen und Proteasen in Blasenhomogeneten.....	32
2.2.6	Gelatine Zymographie	32
2.2.7	Quantifizierung der Infektionsstärke	33
2.2.8	<i>In vivo</i> Chemokinblockade, Makrophagendepletion und CXCL2 – Gabe	33
2.2.9	Generierung von Knochenmarks – Chimären.....	34
2.2.10	Immunohistochemische Methoden	35
2.2.11	Isolation, adaptiver Transfer und <i>in vitro</i> Kulturen von neutrophilen Granulozyten bzw. Ly6C positiven Makrophagen aus dem Knochenmark.....	38
2.2.12	Analyse der chemotaktischen Migration von neutrophilen Granulozyten <i>in vitro</i>	41

2.2.13 Statistik	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Relevante Immunzellen in der Zystitis.....	43
3.2 Chemokin- und Zytokinproduktion von Immun- und Gewebezellen während der Zystitis.....	45
3.3 Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten und Ly6C ⁺ Makrophagen in die Harnblase und die Bakterienlast nach einer Chemokinblockade.....	47
3.4 Phänotyp der <i>TNFR</i> ^{-/-} Maus	49
3.5 Phänotypische Analyse von Knochenmarkschimären und von <i>TNFα</i> ^{-/-} Mäusen mit transferierten Ly6C ⁺ Makrophagen.....	51
3.6 Adaptiver Transfer von neutrophilen Granulozyten.....	53
3.7 Analysen der Migrationsmechanismen von neutrophilen Granulozyten.....	55
3.8 <i>TNFα</i> - abhängige CXCL2 - Sekretion ermöglicht die epitheliale Migration von <i>TNFα</i> -KO Granulozyten.....	58
3.9 Phänotyp der <i>MMP9</i> ^{-/-} Maus	60
3.10 Autokrin produziertes MMP9 reguliert die epitheliale Migration von neutrophilen Granulozyten.....	62
3.11 Die Aktivität von MMP9, aber nicht von MMP2, wird <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> von <i>TNFα</i> reguliert.....	64
3.12 TIMP-1: Einer der natürlichen Inhibitoren von Metallomatrixproteasen.....	66
3.13 Analyse von direkten <i>TNFα</i> - Effekten auf neutrophile Granulozyten <i>in vitro</i>	67

4	Diskussion	71
4.1	Neutrophile Granulozyten, Ly6C ⁻ - und Ly6C ⁺ - Makrophagen besitzen unterschiedliche Funktionen während der Zystitis.....	71
4.2	Die Migration von neutrophilen Granulozyten in das Uroepithel während einer Zystitis wird durch TNF α , CXCL2 und MMP9 reguliert.....	75
4.2.1	In <i>TNFR</i> ^{-/-} Mäusen ist die Migration von neutrophilen Granulozyten in das infizierte Uroepithel defekt.....	75
4.2.2	Durch TNF α induziertes CXCL2 reguliert die Migration von neutrophilen Granulozyten in das Uroepithel.....	79
4.2.3	Die durch CXCL2 freigesetzte Metallomatrixprotease MMP9 ist für Migration von neutrophilen Granulozyten in das Uroepithel essentiell.....	81
4.3	Die Regulation der transepithelialen Migration von neutrophilen Granulozyten im Überblick	85
4.4	TNF α und CXCL2 regulieren <i>in vitro</i> die Migrations - Geschwindigkeit von neutrophilen Granulozyten.....	87
4.5	Die innate Helferfunktion durch Makrophagen	88
4.6	Die klinische Relevanz	91
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	93
6	Anhang.....	94
6.1	Abkürzungsverzeichnis	94
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	96
6.3	Tabellenverzeichnis.....	98

6.4 Depletion von Ly6C⁻ und Ly6C⁺ Makrophagen durch Chlodronat

Liposomen 98

6.5 Literaturverzeichnis 99

1 Einleitung

1.1 Harnwegsinfektionen

Unter Harnwegsinfekten wird die Entzündung der ableitenden Harnwege verstanden, die sich aus der Harnröhre, der Harnblase, dem Harnleiter und dem Nierenbecken zusammensetzen. Mit der Zystitis (Infektion der Harnblase) und der Pyelonephritis (Infektion des Nierenbeckens) werden zwei Formen der Harnwegsinfekte unterschieden^{1,2}. Beide Krankheitsbilder sind in der Weltbevölkerung weit verbreitet und werden zu 70 bis 95% von uropathogenen *E.colis* (UPECs) hervorgerufen^{1,3-5}. Bei diesen Erregern handelt es sich um gram-negative Stäbchenbakterien, die über den Harnleiter in die Blase gelangen und daraufhin eine Zystitis auslösen⁵. Weiterhin sind diese Bakterien in der Lage, über die Ureter in das Sammelbecken der Niere vorzustößen, um dort das umliegende Gewebe zu infizieren. Neben den UPECs sind ebenfalls andere Bakterienstämme, wie *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* und *Pseudomonas aeruginosa* dazu fähig einen Harnwegsinfekt auszulösen². Die gängige Behandlungsmethode dieser Infektionen ist die Anwendung von Antibiotika wie Gentamicin und Clindamycin, die entweder einzeln oder in Kombination verabreicht werden^{1,2,6}. Eine lang anhaltende Therapie mit Antibiotika hat allerdings starke Nebenwirkungen, wie Allergien, einem erhöhten Risiko an Pilzbefall und der Schädigung der Darmflora.

Überwiegend erkranken Frauen an Harnwegsinfektionen, da ihre kurzen Harnröhren das Eindringen von Pathogen begünstigen^{7,8}. Rund die Hälfte aller Frauen erleiden eine oder mehrere Harnwegsinfektionen im Laufe ihres Lebens, die statistisch im Alter von 20 bis 30 und 80 bis 85 Jahren am häufigsten auftreten^{7,9}. Mit ca. 12% erkranken ebenfalls Männer an diesen Infektionskrankheiten^{7,9}.

Bereits Kinder erkranken in jungen Jahren an Harnwegsinfektionen, 7 bis 8% der Mädchen und 2% der Jungen infizieren sich bis zu ihrem achten Lebensjahr mit uropathogenen *E.coli*¹⁰. Sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen enden diese unbehandelt oftmals in Niereninfektionen, wobei eine Chronifizierung schlimmstenfalls zu einer verringerten Nierenfunktion führen kann. Selbst nach einer erfolgreichen Behandlung der Infektion kommt es im weiteren Lebensverlauf bei Betroffenen zu ständig wiederkehrenden Harnblasen- und Niereninfektionen. Zudem rufen Harnwegsinfektionen bei schwangeren Frauen ein erhöhtes Risiko einer Frühgeburt hervor und führen im Alter oder bei

Menschen mit Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes, zur Sepsis und daraufhin in einigen Fällen zum Tod¹.

Harnwegsinfektionen verlaufen in der Regel periodisch, 25% der Patienten erleiden in den ersten sechs Monaten nach dem primären Infekt eine Reinfektion mit demselben Erreger^{1,2}. Der Grund für diese häufigen Infektionen sind persistierende Bakterien, die während der Infektion in Uroepithelzellen eingedrungen sind und sich unter eingeschränkten Entwicklungsbedingungen und verborgen vor dem Immunsystem vermehren. Nach der Genesung sind diese Bakterien in der Lage wieder aus der Wirtszelle auszubrechen, neue Epithelzellen zu befallen und eine neue Infektion auszulösen. Welche Signale für einen solchen Ausbruch verantwortlich sind, konnte bisher nicht geklärt werden^{1,2}.

1.2 Physiologie und Anatomie der Harnblase

1.2.1 Lage und Funktion der Harnblase

Die Harnblase (*Vesica urinaria*) ist ein Hohlorgan, dessen Aufgabe die Sammlung und die Ausscheidung des Urins ist. Dieser wird mittels der Ureter von den Nieren bis hin zum Blasenlumen geführt, wo er mit den darin befindlichen Stoffwechselprodukten bis zu einem definierten Volumen gespeichert wird. Nach dessen Erreichen wird der Urin kontrolliert abgesondert. Dieses Volumen ist stark von der Blasengröße abhängig und variiert daher innerhalb der Spezies¹¹.

Die Harnblase ist im vorderen Bereich des Beckens hinter der Schambeinfuge und dem Schambein lokalisiert. Ihre Form und Größe ist stark von ihrem Füllungsgrad abhängig, da sie die Fähigkeit besitzt sich mit steigenden Urinmengen erheblich auszudehnen und bei einer Entleerung wieder in sich einzufallen. Aus diesem Grund erscheint die Blasenwand im leeren Zustand zottig und im sich füllenden Zustand fortgängig ebener.

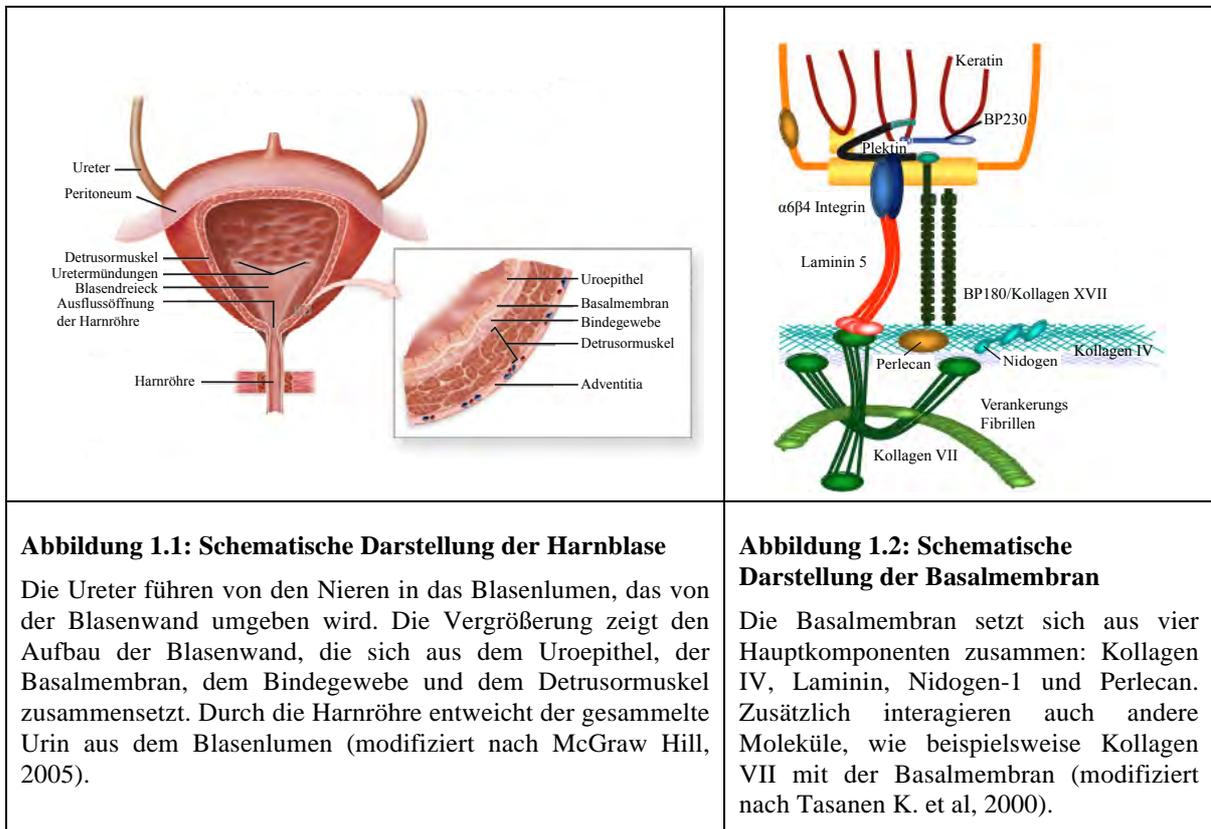
Die Harnblase wird in drei Bereiche gegliedert: Dem Blasenkörper, dem Blasengrund und dem Blasen Hals. Am Blasengrund erreichen die Ureter die Blase, der Blasen Hals dagegen geht in die Harnröhre über, wo der Urin abgeleitet wird. Die Befüllung und Entleerung der Harnblase wird über den Detrusor-Muskel reguliert, indem dieser den Öffnungszustand der Ureter und der Harnröhre variiert¹¹ (Abbildung 1.1).

1.2.2 Anatomie der Harnblase

Die Blasenwand besteht aus der Mukosa, dem darunterliegenden Bindegewebe und dem bereits erwähnten umringenden Detrusor – Muskel (Abbildung 1.1). Die Mukosa grenzt an das Blasenlumen und setzt sich aus dem mehrschichtigen Epithel und der direkt darunterliegenden Basalmembran (*lamina propria mucosæ*) zusammen. Aufgrund ihrer Fähigkeit sich entsprechend des Füllstandes der Blase auszudehnen, wird das Epithel der Blase auch als Übergangsepithel bezeichnet. Das Uroepithel setzt sich aus drei unterschiedlichen Zelltypen zusammen: Die äußere Schicht wird aus den Deckzellen gebildet, die polyploiden Kerne aufweisen und mit 25 bis 250 µm sehr groß und zudem elastisch sind. Die mittlere Schicht setzt sich aus den 10 bis 25µm großen Intermediärzellen zusammen. Darunter liegend befindet sich die dritte und letzte Schicht des Uroepithels, die aus Basalzellen gebildet wird, welche die Vorläuferzellen der beiden darüber liegenden Zelltypen darstellen. Des Weiteren sind sie mit ca. 10µm die kleinsten Uroepithelzellen und stehen im direkten Kontakt mit der Basalmembran¹²⁻¹⁵. Die Funktion des Uroepithels besteht darin, eine Barriere für Pathogene zu bilden und die Passage von Wasser, Ionen, gelösten Substanzen und großen Makromolekülen in das darunterliegende Gewebe zu kontrollieren^{15,16}.

Die Basalmembran grenzt das Uroepithel vom darunterliegenden Bindegewebe ab und dient zum einen zur Stabilisierung des umgebenden Gewebes. Zum anderen besitzt sie einen bedeutenden Einfluss auf den Stoffwechsel, der Polarität und der Differenzierung von Epithelzellen. Es handelt sich um eine extrazelluläre Matrix (ECM), die sich aus vier Hauptkomponenten zusammensetzt: Kollagen IV, Laminin, Nidogen-1 und Perlecan¹⁷ (Abbildung 1.2). Zudem steht die Basalmembran mit anderen Komponenten der umliegenden Zellen, wie beispielsweise Kollagen VII, Fibulin oder Osteonectin in Kontakt¹⁸. Um welche es sich dabei im Einzelnen handelt, ist stark von der Position der Basalmembran im Körper und den umliegenden Zelltypen abhängig. Die Basalmembran ist lediglich mittels eines Elektronenmikroskops zu erkennen¹². Unter der Mukosa grenzt das Bindegewebe an, in dem sich die Blutgefäße befinden, die die Blase mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen und gleichzeitig die Einwanderung von Immunzellen in die Harnblase ermöglichen. Die äußerste Schicht der Blasenwand ist der Detrusor – Muskel, der aus drei glatten Muskulaturebenen besteht: Der äußeren Längsmuskelschicht (*Stratum longitudinale externum*), der mittleren Schicht mit quer verlaufenden Fasern

(*Stratum circulare*) und der inneren Längsmuskelschicht (*Stratum longitudinale internum*). Ausgenommen vom oberen Bereich der Blase, der vom Peritoneum bedeckt ist, umschließt die Adventitia die Harnblase. Diese besteht aus lockerem Bindegewebe und dient zur Verankerung der Blase in ihrer Umgebung¹¹.



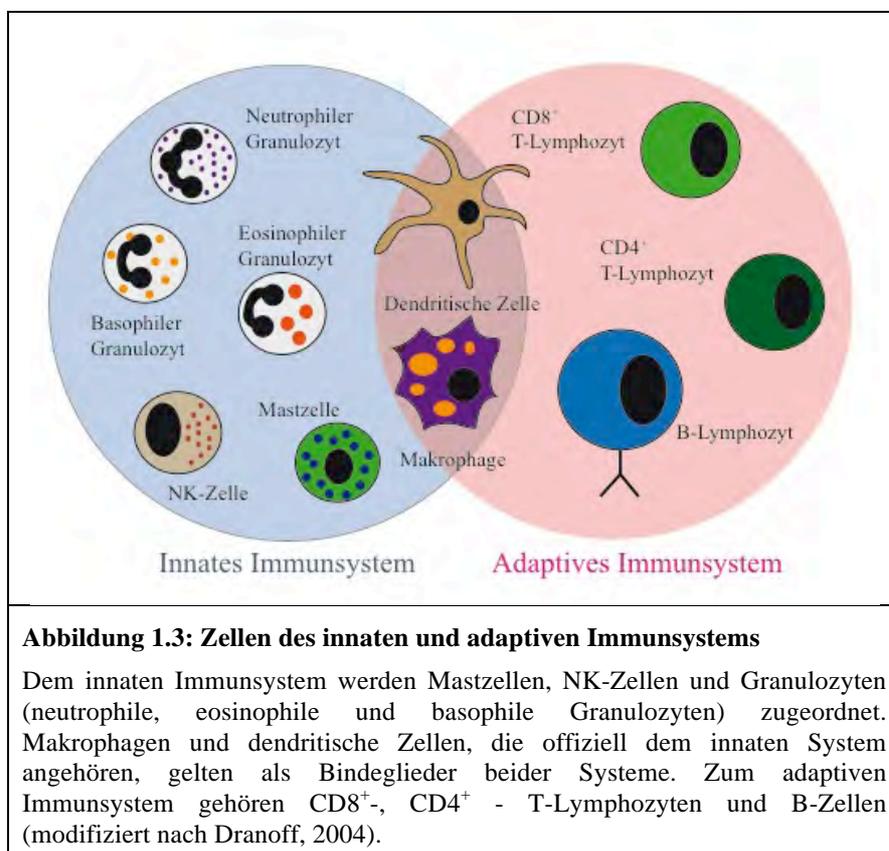
1.3 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Körper vor Infektionen mit Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, sowie vor Substanzen wie Toxinen und den Schäden, den sie verursachen. Nachdem pathogene Mikroorganismen oder andere infektiöse Moleküle durch Effektorzellen des Immunsystems wahrgenommen worden sind, wird eine Immunantwort induziert. Dabei wird zwischen zwei verschiedenen Antworten unterschieden, der innaten und der adaptiven Immunantwort¹⁹.

Die innate Immunantwort ist unmittelbar nach der Infektion verfügbar und in der Lage ein weites Spektrum an Pathogenen abzuwehren. In vielen Fällen ist diese relativ unspezifische Antwort in der Lage die Pathogene vollständig zu beseitigen. Kann das innate System die Infektion nicht auflösen, so wird anschließend das adaptive

Immunsystem aktiviert. Dieses benötigt allerdings eine Latenzzeit von mehreren Tagen, bevor es Pathogene hochspezifisch bekämpfen kann. Zusätzlich verfügt das adaptive System über eine Gedächtnisfunktion, die wiederkehrende Infektionen bekämpfen kann.

Der innaten Immunabwehr werden das Komplementsystem und spezielle Immunzelltypen zugeordnet. Das Komplementsystem setzt sich aus 30 verschiedenen Plasmaproteinen zusammen, die hauptsächlich in der Leber produziert werden^{19,20}. Die Aktivierung der zirkulierenden Proteine erfolgt durch Oberflächenbestandteile von Mikroorganismen und löst eine Kaskade von proteolytischen Reaktionen aus. An Pathogene gebundene Komplementfragmente ermöglichen Phagozyten mittels spezieller Komplementrezeptoren diese als körperfremde Zellen zu identifizieren, um sie nachfolgend zu phagozytieren und zu eliminieren^{19,21,22}. Des Weiteren schließt das innate Immunsystem folgende Immunzellen ein: Mastzellen, NK-Zellen, Eosinophile-, Basophile bzw. Neutrophile Granulozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen (Abbildung 1.3). Die letzten beiden Zelltypen stellen eine Verbindung zum adaptiven System her, indem sie Bestandteile von Mikroorganismen prozessieren und an lymphatische Immunzellen des adaptiven Systems präsentieren können. Mittels dieser Aktivierung von T – Zellen wird eine adaptive Immunantwort mobilisiert.



Das adaptive Immunsystem dagegen besteht aus Zellen der humoralen und zellassozierten Immunabwehr. B-Zellen werden der humoralen Abwehr zugeordnet und produzieren hochspezifische Antikörper, die extrazelluläre Pathogene und Toxine bekämpfen. T-Zellen bilden die zellassozierte Immunantwort, die in der Lage ist, intrazelluläre Pathogene zu erkennen und zu eliminieren¹⁹ (Abbildung 1.3).

1.3.1 Die Entwicklung der Immunzellen

Die Entwicklung von Immunzellen des innaten und adaptiven Immunsystems findet im adulten Säugetier zum Großteil im Knochenmark statt²³. Nach ihrer Reifung emigrieren sie aus dem Knochenmark, um im Blutkreislauf oder im lymphatischen System zu patrouillieren. Aus der Zirkulation wandert ein Teil der Immunzellen in periphere Organe ein, wo sie als residente Wächterzellen fungieren und dort nach Pathogenen spähen¹⁹.

Die meisten Immunzellen haben ihren Ursprung im Knochenmark und differenzieren aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle. Diese Zelle ist in der Lage, sich in eine myeloische oder in eine lymphatische Vorläuferzelle zu differenzieren. Aus der myeloischen Vorläuferzelle entwickeln sich anschließend in weiteren Differenzierungsschritten Zellen des innaten Immunsystems: Monozyten, Dendritische Zellen, drei unterschiedliche Granulozyten – Arten (neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten) und Mastzellen. Zudem entwickeln sich aus diesem Zelltypen ebenfalls Thrombozyten (essentiell für die Blutgerinnung) und Erythrozyten (organisieren den Sauerstofftransport). Die Ausdifferenzierung erfolgt direkt im Knochenmark oder, wie im Fall der Mastzellen bzw. Monozyten, nach deren Einwanderung in peripheren Geweben^{24–27} (Abbildung 1.4). Aus der lymphatischen Vorläuferzelle dagegen entstehen Zellen des adaptiven Immunsystems, T- und B – Lymphozyten, und natürliche Killer (NK) – Zellen, die dem innaten System angehören. Auch hier findet die Differenzierung im Knochenmark oder in den Lymphknoten und dem Thymus statt¹⁹ (Abbildung 1.4).

In dieser Arbeit wird hauptsächlich das innate Immunsystem untersucht, daher werden nachfolgend lediglich die Prozesse des innaten Immunsystems beschrieben. Im Speziellen wird der Fokus auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten gelegt.

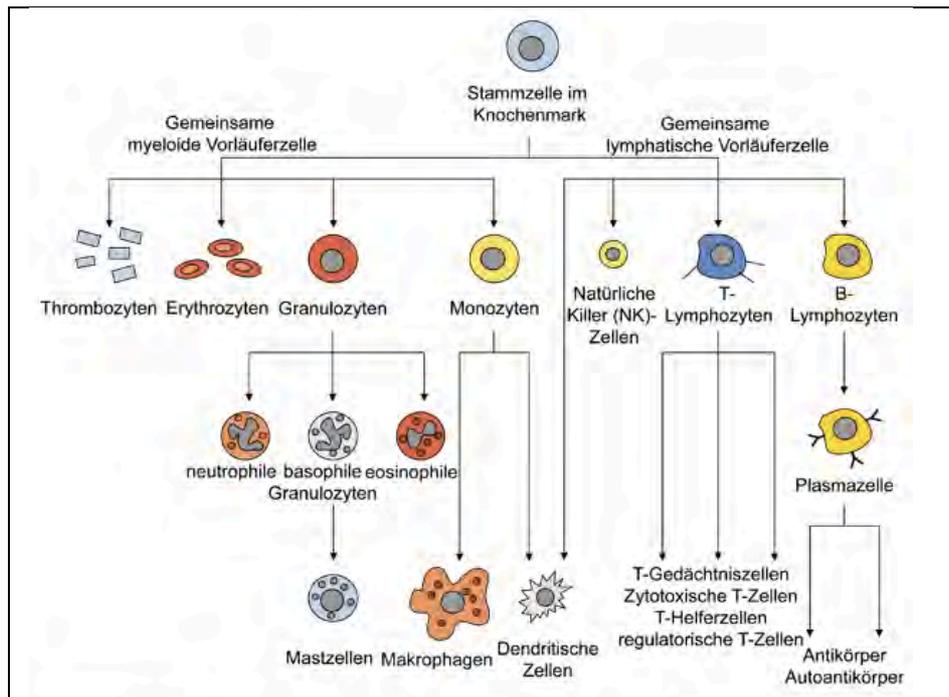


Abbildung 1.4: Entwicklung und Differenzierung von Immunzellen im Knochenmark

Aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark differenzieren zwei Typen von Vorläuferzellen aus, die myeloide und die lymphatische Stammzelle. Aus der myeloiden Stammzelle entwickeln sich hauptsächlich Immunzellen des innate Immunsystems, während sich aus der lymphatischen Stammzelle größtenteils Zellen des adaptiven Systems differenzieren. Trombozyten und Erythrozyten differenzieren ebenfalls im Knochenmark aus myeloiden Stammzellen (modifiziert nach Deutsches Krebsforschungszentrum).

1.3.2 Makrophagen

Makrophagen kommen in nahezu allen peripheren und lymphatischen Geweben vor²⁷. Sie reifen aus Monozyten, die im Blutkreislauf zirkulieren und während der Homöostase kontinuierlich in das Gewebe von Organen einmigrieren²⁷. Nach der Immigration der Monozyten differenzieren diese zu Makrophagen aus. Dabei wird zwischen zwei verschiedenen Makrophagentypen unterschieden, den patrollierenden und den inflammatorischen Makrophagen^{23,25,28}.

Diese beiden Makrophagentypen werden über die Expression des Markers Ly6C unterschieden. Ly6C negative patrollierende Makrophagen sind residente Wächterzellen innerhalb der peripheren Organe. Sie sind wesentlich bei der Induktion der innate Immunantwort beteiligt, indem sie körperfremde Mikroorganismen wahrnehmen und anschließend Signalproteine, wie Zytokine und Chemokine, sekretieren^{23,24,29}. Demzufolge sind sie für die frühe Rekrutierung von inflammatorischen Phagozyten in das infizierte

Gewebe zuständig²⁹⁻³⁴. Wie dendritische Zellen sind sie in der Lage intrazellulär aufgenommene Mikroorganismen oder deren Bestandteile zu prozessieren und sie an T – Lymphozyten des adaptiven Systems zu präsentieren. Die Aktivierung von naiven T – Zellen wird jedoch hauptsächlich von dendritischen Zellen durchgeführt. Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei Heilungsprozessen, wie bei der Narbenbildung oder der Angiogenese^{23,24,35}. Neben diesen Aufgaben sind sie ebenfalls für die Eliminierung von Zelltrümmern und apoptotische Zellen im Körper zuständig. Inflammatorische Makrophagen dagegen exprimieren den Marker Ly6C^{23,25} (Ly6C⁺ Makrophagen) und sind sehr plastisch²⁷: Während einer Inflammation werden sie von residenten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in das infizierte Gewebe rekrutiert²⁴, wo sie bei der Beseitigung von Mikroorganismen und anderen Substanzen beteiligt sind²⁷. In einigen Fällen sind sie zudem auch in der Lage Heilungsprozesse zu unterstützen^{27,36}.

1.3.3 Neutrophile Granulozyten

Während eosinophile und basophile Granulozyten zusammen mit den Mastzellen hauptsächlich bei der Immunabwehr von Parasiten eine wichtige Rolle spielen, sind neutrophile Granulozyten bei der Beseitigung von unterschiedlichen Mikroorganismen und inflammatorischen Substanzen entscheidend, indem sie unter anderem Pathogene aufspüren und sie in intrazellulären Vesikeln durch bakteriozide Substanzen eliminieren²⁴. Neutrophile Granulozyten stellen Zellen des innate Immunsystems dar, die 50 – 60% der Zellen im Knochenmark bzw. der Zirkulation ausmachen. Sie werden nach einer Infektion sehr effizient zum Infektionsort rekrutiert^{23,29}. Ein Merkmal der kurzlebigen neutrophilen Granulozyten ist ihr segmentierter Zellkern, der in drei bis vier Abschnitte gegliedert ist. Des Weiteren finden sich im Zytoplasma dieser Zellen sekretorische Vesikel und drei verschiedene Granula-Typen, die unterschiedliche proinflammatorische Proteine enthalten^{29,37}: Azurophile bzw. primäre Granula (enthalten z.B. Myeloperoxidasen (MPO) und Defensine), spezifische bzw. sekundäre Granula (enthalten z.B. Lactoferin und Cytochrom b558) und Gelatinase bzw. tertiäre Granula (enthalten z.B. Leukolysin und Matrixmetalloprotease 9 (MMP9)). Sekretorische Vesikel beinhalten vor allem Rezeptoren und Integrine, wie beispielsweise der Komplementrezeptor-1 (CR1) und CD18/CD11b. Nach einer Aktivierung des Granulozyten fusionieren diese Vesikel mit der Zellmembran

und ermöglichen somit einen schnellen Transport von essentiellen Molekülen an die Zelloberfläche^{29,37}.

Die primäre Aufgabe des neutrophilen Granulozyten während einer Infektion ist die Identifizierung und Eliminierung von Pathogenen²⁴: Nach der Phagozytose eines Erregers fusioniert das Phagosom mit den unterschiedlichen Granulatypen, wodurch das Pathogen mit Hilfe der darin befindlichen bakteriziden Substanzen eliminiert wird. Der Granulozyt ist ebenfalls in der Lage Bakterien und andere Mikroorganismen extrazellulär abzutöten, indem er den Inhalt seiner Granula in den extrazellulären Raum abgibt oder so genannte „NETs“ („neutrophil extracellular traps“) generiert. Bei der Ausbildung dieser „NETs“ setzt der Granulozyt Strukturen aus Chromatin DNA, Histonen und granulären Proteinen aus, die extrazellulär Bakterien binden, deren Verbreitung verhindern und sie gleichzeitig abtöten. Allerdings sterben neutrophile Granulozyten durch die Freisetzung dieser „NETs“^{29,38}.

1.4 Zytokine, Chemokine und Matrixmetalloproteasen

Die Migration von Immunzellen erfordert ein Netzwerk von verschiedenen Zytokinen, Chemokinen und Matrixmetalloproteasen. Welche von diesen im Speziellen benötigt werden, ist vom Stimulus bzw. der Infektionsart und vom Zelltypen abhängig.

1.4.1 Zytokine

Zytokine sind Polypeptide, die von Zellen des innatens- und adaptiven Immunsystems, sowie von Endothel- und Epithelzellen unter homöostatischen und inflammatorischen Situationen sezerniert werden³⁹. Diese können autokrin, parakrin und/oder endokrin auf Gewebe- und Immunzellen wirken. Zu den Zytokinen werden hauptsächlich Interleukine, Tumornekrosefaktoren, Wachstumsfaktoren und Interferone gezählt. Neben ihrer Funktion im Verlauf einer Infektion wirken sie zudem regulierend auf die Hämatopoese im Knochenmark. Hämatopoetische Zytokine wie GM-CSF („granulocyte/macrophages colony-stimulating factor“) fördern dort beispielsweise die Reifung von Vorläuferzellen in Monozyten und dendritische Zellen. Zudem sind Zytokine in der Lage die Proliferation, Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten zu stimulieren³⁹. Zytokine haben einen

weiten Funktionsbereich, der eine Vielzahl von pro- und anti – inflammatorischen Prozessen einschließt³⁹. Aus diesem Grund besitzen sie eine entscheidende Bedeutung in vielen Krankheitsbildern, wie rheumatischer Arthritis, Atherosclerosis, Krebs und einer Vielzahl von Infektionskrankheiten^{39,40}.

Zytokine werden in der Regel nach dem Stimulus neu synthetisiert und aufgrund ihrer Kurzlebigkeit zeitnah sezerniert. Die Aktivität dieser Moleküle ist pleiotrop und redundant, daher wirken sie auf verschiedene Zellarten in gleicher Weise. Die Bindung des Zytokins an seinem Rezeptor, ruft in der Zielzelle die Synthese und die Aktivierung anderer Zytokine und Moleküle hervor. Neben einer veränderten Genexpression, kann ein Zytokin gleichzeitig die Proliferation der Immunzelle auslösen³⁹. Die Rezeptoren, an denen Zytokine binden, können Typ-I-Zytokin-, Typ-II-Zytokin-, IL-1-, TNF- und G-Protein gekoppelte Rezeptoren sein.

Von besonderem Interesse ist in dieser Arbeit das Zytokin TNF α , welches als einer der wichtigsten Mediatoren während einer Entzündungsreaktion und einer Infektion durch Mikroorganismen gilt⁴¹. Es wird in der Regel von aktivierten Makrophagen produziert und bindet an die TNF Rezeptoren (TNFR-1 (55kDa) und TNFR-2 (75kDa)^{42,43}, welche anschließend zu einer veränderten Genexpression zu Differenzierung, Proliferation, dem Überleben von Zellen und der Apoptose führt⁴⁴. TNF α besitzt eine Vielzahl von Funktionen in unterschiedlichen Krankheitsmodellen: Bei einer Virus-induzierten Hepatitis beispielsweise wird das von Hepatozyten freigesetzte Antigen von sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) kreuzpräsentiert, welches anschließend zytotoxische T-Lymphozyten (CTL, „cytotoxic T – lymphocyte“) stimuliert und die Freisetzung von TNF α bewirkt. Das auf diese Weise freigesetzte TNF α wirkt direkt auf die infizierten Hepatozyten und induziert deren Zelltod. Somit ist TNF α an der Schädigung des Lebergewebes während einer Virusinfektion beteiligt⁴⁵. Des Weiteren kann das von Immunzellen produzierte TNF α eine reversible Rückenwicklung von Melanomen induzieren, die die Wahrnehmung dieser Zellen durch melanozyten-spezifische T-Zellen erschwert. Wie an diesen Beispielen und in anderen Veröffentlichungen zu erkennen ist, wirkt TNF α in der Regel lokal^{46,47}. Bei einer Sepsis hingegen wird das Zytokin von Makrophagen in der Milz, der Leber und anderen Organen systematisch in die Zirkulation freigesetzt¹⁹. In großen Mengen bewirkt TNF α im Blutkreislauf eine Erweiterung der Blutgefäße und eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität, woraufhin der Blutdruck abfällt und das Plasmavolumen verringert wird, was in den meisten Fällen zu einen

septischen Schock führt¹⁹. Zudem induziert TNF α während einer Sepsis die Blutgerinnung, was in einer Verstopfung von kleineren Blutgefäßen resultieren kann und im Anschluss in vielen Organen, wie der Leber, der Lunge, dem Herzen und den Nieren zu einem schweren Organschaden führen kann. Zudem besitzt TNF α eine Vielzahl von Funktionen in anderen Krankheitsmodellen, wie beispielsweise bei Alzheimer⁴⁸, der Depression⁴⁹ und Infektionskrankheiten⁴¹. Somit ist dieses proinflammatorische Zytokin ein essentielles Molekül in vielen unterschiedlichen Krankheitsbildern.

1.4.2 Chemokine

Chemokine sind 7-12 kDa schwere Polypeptide, die zusammen mit einigen chemotaktisch wirkenden Proteinen (Chemoattraktanzien) in vier Gruppen gegliedert werden: CC-, CXC-, XC- und CX₃C – Chemokine⁵⁰. Sie wirken chemotaktisch auf andere Zellen des Immunsystems und lösen daher eine Wanderung von Zellen im Körper aus. Ihre Nomenklatur basiert auf der Anzahl und Anordnung ihrer N-terminalen Zysteinreste^{51,52}. Die CC- Gruppe stellt die größte der Gruppen dar und wirkt vorwiegend auf Lymphozyten, Monozyten und basophile und eosinophile Granulozyten^{16,51}. Die CXC- Chemokingruppe dagegen mobilisiert in erster Linie neutrophile Granulozyten^{16,51}. In ihrer Gesamtheit binden alle Chemokine an G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die wie die Chemokine ebenfalls in vier große Gruppen unterteilt werden: CCR, CXCR, CR und CX₃CR^{51,52}. Chemokinrezeptoren sind hauptsächlich auf Immunzellen lokalisiert, allerdings werden sie ebenfalls auf Neuronen, Endothelzellen, Plazenta- und Leberzellen exprimiert^{51,52}. Sie besitzen ein weites Spektrum an Liganden, mit denen sie eine Bindung eingehen können. Diese Liganden bzw. Chemokine sind ebenfalls in der Lage, an eine Reihe von verschiedenen Rezeptoren zu binden und diese im Anschluss zu aktivieren⁵¹. Die Wirkungs- und Funktionsweise dieser multiplen Bindungsmöglichkeiten konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Es wird vermutet, dass es möglicherweise eine Hierarchie innerhalb der Chemokine und Chemoattraktoren gibt, die anhand der Bindungsaffinität an den jeweiligen Rezeptor definiert wird^{51,52}. Zusätzlich kann durch eine räumliche und temporal getrennte Expression der Chemokine im Körper eine jeweils andere Wirkungsweise hervorgerufen werden⁵².

1.4.3 Matrixmetalloproteasen

Der Familie der murinen Matrixmetalloproteasen (MMPs) gehören 23 verschiedene Mitglieder an (human: 24 Proteasen), von denen jede Protease die Spaltung von spezifischen Peptidbindungen in Proteinen reguliert⁵³ (Tabelle 1). Sie werden als inaktive Form exprimiert, bei der ein konservierter Cysteinrest die aktive Zink-Domäne der Protease blockiert und so die Katalyse des Substrates verhindert. Nach der Destabilisierung oder vollständigen Entfernung dieser Pro-Domäne durch andere Proteasen, ist die Matrixmetalloprotease in der Lage, an das entsprechende Substrat zu binden und dieses zu spalten⁵³.

Tabelle 1: MMP Familien, klassifiziert anhand ihrer Struktur und deren Substraten

Matrixmetalloproteasen – Typ	Nomenklatur
Kollagenasen	MMP-1, 8, 13, 18
Gelatinasen	MMP-2, 9
Stromelysins	MMP-3, 10
Matrilysins	MMP-7, 26
Membrangebundene MMPs	MMP-14, 15, 16, 17, 24, 25
Andere MMPs	MMP-12, 19, 20, 22, 23, 28

Die Hauptfunktion dieser Proteasen ist die Degradierung von Komponenten der extrazellulären Matrix, wie der Basalmembran^{16,53}. Allerdings konnte gezeigt werden, dass sie neben dieser Aufgabe weitere wichtige Funktionen ausüben. Beispielsweise spalten Matrixmetalloproteasen Teilsequenzen von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und (Matrixmetallo-) Proteasen ab, wodurch diese in ihrer Aktivität gesteigert werden^{53,54}. Die individuelle Rolle jeder einzelnen Protease ist allerdings noch unklar. Anhand von *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass viele MMPs überlappende Substrate besitzen und dass einige Proteasen, wie MMP2 und MMP9 für Kollagen IV, spezifischer bzw. effektiver schneiden als andere. Ob diese Redundanz auch im lebenden Organismus (*in vivo*) gilt, konnte bisher allerdings nicht aufgeklärt werden⁵³.

Matrixmetalloproteasen spielen bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Sie sind unter anderem beteiligt bei der Morphogenese, Wundheilung, Angiogenese oder beim Tumorwachstum. Neben der Tumorentwicklung und der Metastasenbildung scheinen sie ebenfalls einen Effekt während der rheumatischen Arthritis zu haben⁵³.

Die Matrixmetalloprotease 9 wird in der Regel in Thromboplasten, Osteoklasten und Leukozyten exprimiert. Die Protease MMP2 dagegen wird konstitutiv in einer Vielzahl von Zellen produziert und zur Wanderung in der Homöostase genutzt. Während die Expression von MMP2 relativ konstant ist, wird die Expression von MMP9 durch zahlreiche Mediatoren (z.B. Wachstumsfaktoren und Zytokine) reguliert. Sowohl MMP2 als auch MMP9 können in Vesikeln im Zytosol der Zelle gespeichert werden, allerdings ist die Zelle in der Lage, MMP9 in ihrer inaktiven- und aktiven Form anzusammeln, während MMP2 intrazellulär lediglich in der inaktiven Form vorkommen kann. Die Aktivierung aller MMPs ist ein komplexer Prozess, bei dem MMP-Inhibitoren (TIMPs – „tissue inhibitors of metalloproteinases“) und MMPs beteiligt sind. Für die Protease MMP9 scheint speziell das TIMP-1 sehr entscheidend zu sein⁵⁵.

TIMPs sind die natürlichen Inhibitoren von MMPs, die durch ihre Bindung an die Protease die Interaktion mit dem eigentlichen Substrat verhindern. Es existieren insgesamt 4 TIMPs, von denen jedes in der Lage ist jede MMP zu inhibieren⁵⁶. Allerdings scheinen einige Inhibitoren einige Proteasengruppen besser zu deaktivieren als andere.

1.5 Die innate Immunantwort

1.5.1 Die Wahrnehmung von Mikroorganismen durch das innate Immunsystem

Die Induktion der innaten Immunantwort erfolgt unter anderem durch den Kontakt von Pathogenen mit Epithelzellen^{1,2,5}. Epithelien stellen im Körper eine physikalische und chemische Barriere gegen den Eintritt von Bakterien und anderen Pathogenen dar und bilden somit die erste Instanz der innaten Immunabwehr^{1,5}. Mittels spezieller Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (z.B. TLR4¹), nehmen Epithelzellen Pathogene wahr und sind daraufhin in der Lage antimikrobielle Moleküle, wie beispielsweise Lektin und Laktoferrin, zu produzieren⁵. Nach der Sekretion solcher Moleküle binden diese an

Mikroben und eliminieren diese durch die Zerstörung ihrer Zellwände. Ein weiterer Abwehrmechanismus des Uroepithels ist die Abschilferung der obersten Zellschicht des Epithels wenige Stunden nach der Infektion. Auf diese Weise werden Epithelzellen, die mit invasiven intrazellulär gelegene Bakterien befallen sind, in den Urin abgesondert und somit aus der Blase entfernt^{2,5,57}. Des Weiteren erschweren Epithelien den Eintritt der Erreger in das dahinter liegende Gewebe, indem sie massiv anschwellen und eine für Pathogene schwer zu durchdringende Mukus-Schicht produzieren.

Durchbrechen Pathogen die epitheliale Barriere oder gelangen deren Zellbestandteile in das Innere des Gewebes, werden diese von residenten Immunzellen erkannt und eliminiert²⁹. Im Anschluss lösen diese Wächterzellen die eigentliche Immunantwort aus, indem sie inflammatorische Zytokine und Chemokine produzieren, die Phagozyten in das infizierte Gewebe rekrutieren^{24,29,58}. Um welche Immunzellen es sich bei den residenten Zellen handelt, ist stark vom Organ abhängig. In der Regel stellen Makrophagen die patrollierenden Zellen im Gewebe dar, allerdings können neben diesen ebenfalls Mastzellen, dendritische Zellen und in Ausnahmefällen, wie beispielsweise in der Lunge, auch Granulozyten residente Immunzellen darstellen²⁹. Diese Wächterzellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche eine Vielzahl von Rezeptoren, von denen jeder in der Lage ist spezifische mikrobielle Muster zu detektieren^{24,58,59}. Solche PRRs („pattern recognition receptors“) sind unter anderem „Toll like“ – Rezeptoren (TLRs), wie der TLR2 – Rezeptor, der Zellwandkomponenten von Gram-positiven Bakterien oder der TLR4 – Rezeptor, der Lipopolysaccharid (LPS) von Gram negativen Bakterien erkennen kann^{24,58,60}. Moleküle, die durch solche PRRs wahrgenommen werden, werden als pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs, „pathogen-associated molecular patterns“) bezeichnet^{24,60}. Bei ihnen handelt es sich hauptsächlich um bakterielle und virale Produkte, wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Oligonukleotide (CpG)²⁴. Bei sterilen Entzündungen dagegen werden sogenannte DAMPs („damage-associated molecular pattern molecules“) von PRRs detektiert. Dabei handelt es sich meistens um intrazellulär gelegene Moleküle, wie ATP, die aus zerstörten körpereigenen Zellen austreten. Sowohl PAMPs als auch DAMPs binden an PRR – Rezeptoren und aktivieren somit die residente Makrophagen, die daraufhin beginnen inflammatorische Zytokine (z.B. IL1 β und IL6) und Chemokine (z.B. CXCL1 und CCL2) zu produzieren^{24,29,58}. In der initialen Phase bewirkt diese Sekretion die Rekrutierung von Phagozyten aus dem Blutstrom hinein in das infizierte Gewebe. Deren

Aufgabe ist es im Anschluss bei der Auflösung der Infektion unterstützend mitzuwirken oder Pathogene aktiv zu eliminieren^{24,29}.

1.5.2 Die Rekrutierung und Extravasation von Phagozyten in das infizierte Gewebe

Als erste Phagozyten werden neutrophile Granulozyten in das infizierte Gewebe rekrutiert, die anschließend durch die Freisetzung von Chemokinen aus ihren Granula (z.B. Azurocidin, IL37 und Cathepsin G) Monozyten aus der Zirkulation mobilisieren^{24,29,58}. Diese inflammatorischen Monozyten differenzieren im Gewebe im Anschluss zu Makrophagen aus^{23,25,28}.

Die Extravasation der Phagozyten wird hauptsächlich durch residente Makrophagen gesteuert^{24,29}. Nachdem diese in Kontakt mit Pathogenen oder Pathogenbestandteilen gekommen sind, produzieren sie Histamine, Cysteinylleukotrine und Zytokine, die Endothelzellen im infizierten Gewebe aktivieren und so die Induktion von Adhäsionsmolekülen an deren Oberflächen bewirken²⁹. Binnen weniger Minuten transportieren Endothelien intrazellulär eingelagerte P-Selektine auf ihrer Zelloberfläche, die von zirkulierenden Immunzellen erkannt werden⁶¹. Zusätzlich wird die Neusynthese von E-Selektinen induziert, die allerdings erst einige Stunden nach der Aktivierung auf der endothelialen Oberfläche erscheinen⁶¹. Mit Hilfe dieser Adhäsionsmoleküle sind zirkulierende Granulozyten und Monozyten durch spezielle Glykoproteine auf ihrer Zelloberfläche in der Lage, an Endothelzellen zu binden und am Endothel entlang zu rollen, indem sie diese Verbindung immerzu eingehen und wieder auflösen^{29,61} (Abbildung 1.5). Neben Selektinen präsentieren Endothelzellen ebenfalls PAMPs, Wachstumsfaktoren oder von residenten Makrophagen produzierte Chemokine auf ihrer Zelloberfläche, die beim Rollvorgang der neutrophilen Granulozyten von speziellen Rezeptoren erkannt werden und die Zellen dadurch aktivieren^{29,62}. Eine besondere Rolle für Granulozyten und Monozyten spielt hierbei der CXCR2 – Rezeptor und seine CXC – Liganden (CXCL1, CXCL2, CXCL5 und MIF): Durch die Bindung der Liganden an G – Protein gekoppelten Chemokinrezeptoren wird auf der Zelloberfläche des Phagozyten ein Konformationswechsel von Integrinen wie LFA-1 (auch bekannt als $\alpha_L\beta_2$ oder CD11a:CD18) und Mac-1 (auch bekannt als $\alpha_M\beta_2$ oder CD11b:CD18) verursacht, der eine

verbesserte Affinität der Integrine zu deren Liganden ICAM-1 und ICAM-2 („intracellular adhesion molecule-1/2“) auf den Endothelien bewirkt^{58,61,63}. ICAM-2 ist ein Adhäsionsmolekül, das auch in der Homöostase auf Endothelien exprimiert und für Immigration von residenten Zellen genutzt wird. Nach einer Infektion werden diese vermehrt produziert, wobei gleichzeitig die Expression von ICAM-1, das unter anderem durch das von Makrophagen produzierte IL1 β induziert wird^{58,61}. Der Konformationswechsel der Integrine führt zu einer dauerhaften und festen Adhäsion des rollenden Granulozyten an das Endothel, die vom Phagozyten genutzt wird, um seine unmittelbare Umgebung zu scannen. Dieser Vorgang wird als „Kriechen“ bezeichnet, da der neutrophile Granulozyt durch seine feste Bindung langsam am Endothel entlang wandern und so die ideale Position zur Transmigration identifizieren kann²⁹ (Abbildung 1.5). Phagozyten wählen in der Regel Durchtrittsstellen, die die kürzeste Distanz vom Endothel zum infizierten Epithel darstellt. Zudem bevorzugen sie Regionen, an denen die endotheliale Basalmembran bis zu 60% weniger extrazelluläre Matrix-Moleküle beinhaltet (Abbildung 1.6). Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie konnte dargestellt werden, dass solche Regionen weniger Kollagen IV, Laminin 10, Nidogen 2 aber gleich viel Perlekan

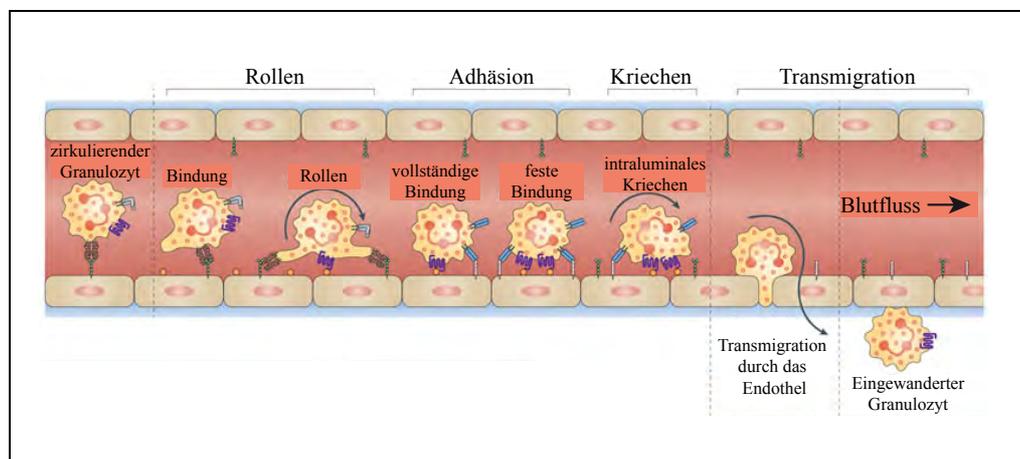


Abbildung 1.5 Transmigration von neutrophilen Granulozyten durch das Endothel

Die Extravasation von neutrophilen Granulozyten unterteilt sich in vier Teilabschnitte, dem Rollen, der Adhäsion, dem Kriechen und der Transmigration. Das Rollen der Zellen erfolgt mit Hilfe von Selektinen. Die Adhäsion und das Kriechen der neutrophilen Granulozyten entlang des Endothels werden dagegen zum Großteil mittels Integrininteraktionen vermittelt. Chemokine, die an der luminalen Seite des Endothels präsentiert werden, aktivieren die rollenden Zellen und bewirken ein Konformationswechsel der Integrine auf der Granulozytenoberfläche, so dass diese eine stärkere Verbindung mit den Endothelzellen eingehen können. Diese verbesserte Adhäsion ermöglicht anschließend die Transmigration der Zelle durch das Endothel und die Migration in das Gewebe (modifiziert nach Kolaczowska und Kubes, 2013).

enthalten^{29,64}. Weiterhin wird vermutet, dass Metallomatrixproteasen (MMP) und Serinproteasen (SP) an der Degradierung der endothelialen Basalmembran beteiligt sind. Allerdings konnte *in vivo* bislang kein eindeutiger Beweis für diese Hypothese erbracht werden^{29,65,66}. Da Granulozyten und Monozyten bevorzugt Kollagen IV – freie Areale für die Migration in das infizierte Gewebe nutzen, könnten für diese ebenfalls andere Moleküle als MMPs und SPs von den Phagozyten genutzt werden.

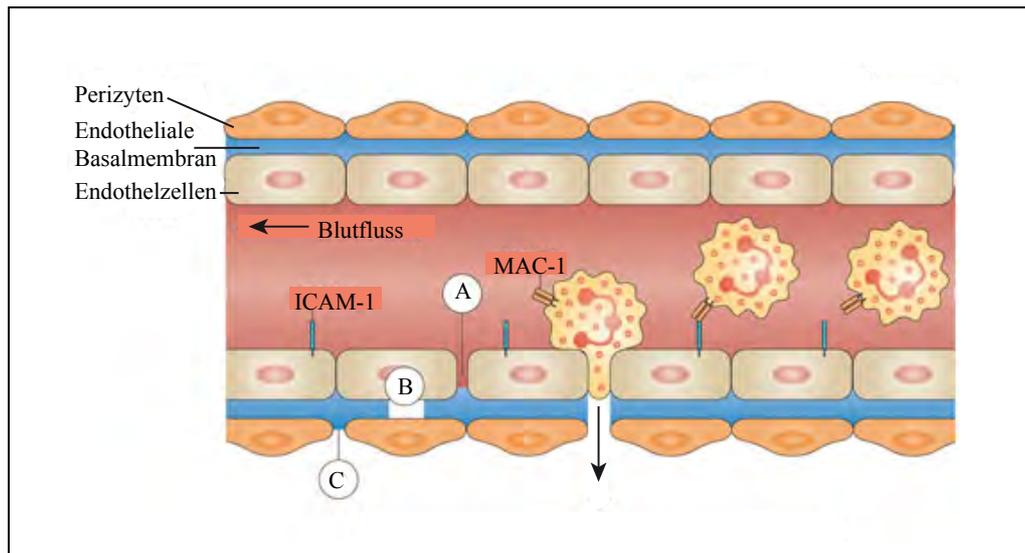


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung von präferentiellen Migrationsstellen von neutrophilen Granulozyten während der Transmigration durch das Endothel

Neutrophile Granulozyten durchqueren bei der Migration aus der Zirkulation in das Gewebe drei Bereiche des Endothels: Die Endothelzellschicht, die endotheliale Basalmembran und die Perizytenchicht. Hierzu nutzen sie Bereiche, in denen die Interaktionen zwischen den Zellen nicht mehr so stark sind. Zudem durchqueren sie die Basalmembran in Regionen, in denen die Membran eine geringe Menge an Matrixproteinen aufweist.

A: Endothelialer Zwischenraum

B: Endotheliale Basalmembranregion mit einer geringen Expression von Matrixproteinen

C: Freier Raum zwischen Perizyten

(modifiziert nach Kolaczowska und Kubes, 2013)

Bevor Leukozyten die Basalmembran allerdings degradieren können, müssen die Zellen zunächst die Endothelzellen passieren. Für diese Migration sind, neben ICAM-1 und -2, ebenfalls die Adhäsionsmoleküle PECAM und CD31 entscheidend^{29,61}. Beide werden sowohl auf Phagozyten als auch auf Endothelzellen exprimiert und deren Interaktion ermöglicht den Leukozyten zwischen den Endothelzellen durchzuwandern. Durchschnittlich benötigen Immunzellen zwei bis fünf Minuten für diese Transmigration²⁹.

Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass Immunzellen die Fähigkeit besitzen durch eine Endothelzelle zu wandern. Allerdings wird diese Wanderung nur in Ausnahmefällen durchgeführt, da sie 20 bis 30 Minuten in Anspruch nimmt²⁹. Nachdem die Leukozyten die Kollagen IV - reduzierten Regionen der Basalmembran erreicht haben, degradieren sie diese und wandern in das Gewebe des infizierten Organs ein. Über den Migrationsablauf des Phagozyten vom Endothel bis hin zum infizierten Epithel ist nahezu nichts bekannt. Es wird vermutet, dass chemotaktische Gradienten die Leukozyten zum Infektionsort leiten, wobei unklar ist, um welche Moleküle es sich dabei handelt^{16,29}.

1.5.3 Die Migration von Phagozyten zum Infektionsort

Neutrophile Granulozyten und Makrophagen müssen nach ihrem Eintritt in das Gewebe dem subluminalen Chemokingradienten, der für die Transmigration der Leukozyten durch das Endothel aufgebaut wird, überschreiben können, um nicht wieder zurück in die Zirkulation einzuwandern. Daher wird vermutet, dass anstelle von Chemokinen andere chemotaktisch aktive Substanzen die Wanderung bis zum Epithel formen^{16,29,58,67}. In Studien konnte aufgezeigt werden, dass solche Chemoattraktantien wie fLMP oder C5a stärkere chemotaktische Stimuli für neutrophile Granulozyten darstellen als Chemokine, wie CXCL8 und LTB4^{16,23,24,29}. Phagozyten würden in diesem Fall den subluminalen Chemokingradienten des Endothels ignorieren und dem neuen chemotaktischen Gradienten zum Infektionsort folgen. Es werden eine Vielzahl von Vermutungen angestellt, wie Phagozyten nach dem Eintritt in das infizierte Organ bis zum Infektionsort gelangen^{16,24,29,58}, allerdings ist diese Wanderung bis zum und in das Epithel bisher noch nicht vollständig verstanden.

1.6 Zielsetzung

Der Verlauf der innate Immunantwort während einer bakteriellen Infektion beruht auf der Kooperation von verschiedenen mobilen Phagozyten, löslichen Mediatoren und navigierenden Botenstoffen. Viele dieser Parameter sind bereits bekannt, beispielsweise sind Makrophagen und Granulozyten, die mittels Mediatoren, wie Zytokinen und Chemokinen miteinander interagieren, maßgeblich an der innate Immunantwort beteiligt. Teilprozesse der innate Immunantwort, wie z.B. die endotheliale Migration, konnte ebenfalls sehr detailliert aufgeschlüsselt werden. Andere Teilprozesse dagegen, wie die Regulation der Phagozyten innerhalb des infizierten Gewebes und deren Kommunikation untereinander, sind bislang nicht im Detail analysiert worden.

Um vertiefte Erkenntnisse über die Funktionsweise der innate Immunantwort innerhalb des infizierten Gewebes zu erhalten, ist das Ziel dieser Arbeit, zelluläre und molekulare Mechanismen bzw. Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Leukozytentypen während einer bakteriellen Infektion in der Harnblase zu analysieren. Im Fokus der Untersuchungen stehen insbesondere Ly6C⁻, Ly6C⁺ Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Zu diesem Zweck soll ein Modell genutzt werden, bei dem eine Zystitis durch die Injektion von uropathogenen *E.coli* in das Lumen der murinen Harnblase hervorgerufen wird.

Zunächst soll aufgeklärt werden, ob die drei Phagozyten – Typen im Verlauf einer Harnblaseninfektion miteinander interagieren und welche dieser Zellen die Migration von neutrophilen Granulozyten zum Infektionsort koordinieren. Die Wanderung der neutrophilen Granulozyten in das Uroepithel ist von äußerster Wichtigkeit, da sie dort auf die Pathogene treffen und sie eliminieren, wodurch die Infektion abgewehrt wird. Zudem sollen die für die Kommunikation und Koordination dieser Immunzellen besonders relevanten Mediatoren identifiziert werden. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Analyse des proinflammatorischen Zytokins TNF α . Es ist bekannt, dass dieses Zytokin an einer Vielzahl von Interaktionen zwischen Immunzellen und anderen Körperzellen beteiligt ist und bei zahlreichen Infektionsmodellen eine zentrale Rolle spielt. Aus diesem Grund soll überprüft werden, ob und auf welche Weise TNF α in regulierenden Prozessen während einer Zystitis relevant ist. Um diese immunologische Mechanismen und Mediatoren zu untersuchen, sollen entsprechende „knock out“ (KO) Mäuse mit WT Mäusen in unterschiedlichen Versuchsansätzen verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Avanti J-20 XP Zentrifuge	Beckman Coulter
Bechergläser, Messzylinder, Kolben	VWR
Begasungsanlage (Fluovac)	Havard Apparatus
Biofuge fresco	Heraeus
Durchflußcytometer (FACS)	Becton Dickinson
Durchlichtmikroskop	Leica
Einbettkassetten, weiss	Labomedic
ELISA – Leser (Sunrise)	TECAN
Entsorgungsbeutel	Sarstedt
Eppendorfgefäße	Sarstedt
FACS Röhrchen	Sarstedt
FACS Röhrchen (steril)	Becton – Dickinson
Falcon Röhrchen (15ml und 50ml)	Greiner Bio – One
Feinwaage	Ottaus
Fluoreszenzmikroskop IX71	Olympus
Gammabestrahlungsanlage	MCP (STS-GMBH)
Gefrierschrank (-20°C)	AEG
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific
Glasflaschen (200ml, 500ml und 1000ml)	Simax
Glaspipetten (5ml, 10ml und 20ml)	Hirschmann
Hand Dispenser	Integra Bioscience
Inkubator (HERA cell 240)	Heraeus
Kanülen (23G, 26G und 27G)	Braun
Kühlschrank (4°C)	Liebherr
Kryotom	Leica
MACS Multistand (Magnet, Quadro MACS)	Miltenyi Biotec

MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec
Mauskäfige	Allentown und Techniplast
Mikrotom	Leica
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Nitril Handschuhe (Micro touch)	Asell
Nylon Filter (blau)	Becton Dickinson
Objektträger und Deckgläser	Industrial Quality
Parafilm	Bemis
Petrieschalen	Sarstedt
pH Meter	Heidolph
Pipetten (1000µl, 200µl, 100µl, 20µl, 10µl und 2,5µl)	Eppendorf
Pipettenspitzen (blau, gelb und weiß)	Greiner Bio-One
Rotlichtlampe	Philips
Scanner	Canon LIDE Scanner
Schüttler	Edmund Bühler GmbH
Skalpell	Feather Saftey Razor
Spritzen (1ml)	Braun
Spritzen (2ml und 5ml)	Becton Dickinson
Sterilbank	Heraeus
Thermomixer compact	Eppendorf
Thermoschrank	Aqua Lytic
Tischwaage	Sartorius
Vasculon Plus	Becton Dickinson
Vortexer	VWR
Wasserbad	GFL
Zellkulturplatte (6-, 24- und 96- Well Platten)	TPP

2.1.2 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Reagenzien	Firma/Hersteller
Aceton	Roth
Acrylamid	Roth
Alexa Fluor 647 Phalloidin	Invitrogen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Anti-Biotin Microbeads	Milteny
Avertin (2,2,2 - Tribromoethanol)	Alderich
β - Mercaptoethanol	Gibco
Bepanthen	Bayer
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA
Brij – 35 (10%, peroxidasefrei)	AppliChem
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Alderich
Calibrate beads (APC)	Becton Dickinson
CFSE	eBioscience
Chlodronat – Liposomen	Fakultät für Zellbiologie und Immunologie, Amsterdam
Collagen II	Invitrogen
CPS3 – Select – Agarplatten	Biomerieux
Destilliertes Wasser	Braun
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Alderich
DNase I	Sigma-Alderich
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
FCS	PAA
Gelatine	Roth
Gentamicin	GIBCO
Glycin	Sigma-Alderich
Golgi Plug (Protein-Transport-Inhibitor)	Becton – Dickinson

Höchst 33342	Invitrogen
Immumount	Genetex
Instillgel	Farco Pharma
Isofloran (100%)	Abbott
Kollagenase D	Sigma-Alderich
LPS	InvivoGen
Methanol	Roth
n – Ethylmaleimide (NEM)	Sigma-Alderich
n – Hexan	NeoLab Migge Laborbedarf
Natrium Azid (NaN ₃)	Sigma-Alderich
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Page Ruler Plus Protein Ladder	Thermo Scientific
Paraformaldehyd	Sigma-Alderich
PBS – Tabletten	GIBCO
Penicillin/Streptomycin	PAA
Proteaseinhibitor	Roche
Rekombinantes TNF alpha Protein (Human)	eBioscience
Rekombinantes CXCL2 Protein (Maus)	AbD Serotec
RPMI (- Glutamin /+HEPES)	PAA
SDS ultra pure	Roth
Streptomycin	Sigma
TEMED	Roth
Tissue – Tek	Sakura
TrisBase	Sigma-Alderich
TrisHCl	Sigma-Alderich
TritonX – 100	Roth
Trockeneis	Cleanas
Xylol (Isomere)	Roth
Zink-Fix	Leica

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Klon	Firma
anti – CCL2	2H5	BD Bioscience
anti – CD11b	M1/70	BioLegend
anti – CD11c	N418	BD Bioscience
anti – CD45	30 – F11	BioLegend
anti – CD45.1	A20	BD Pharmingen
anti – CD45.2	104	eBioscience
anti – CD47	CC2C6	BioLegend
anti – CD54 (ICAM)	YN1/1.7.4	eBioscience
anti – CD68	FA – 11	AbD Serotec
anti – CXCL1	48415	R&D Systems
anti – CXCL2	40605	R&D Systems
anti – CXCL5	61905	R&D Systems
anti – CXCR2 (CD182)	TG11	BioLegend
anti – F4/80	CI:A3 – 1	BioLegend
anti – GR1	RB6 – 8C5	BioLegend
anti – IgG2A	54447	R&D Systems
anti – IgG2B	141945	R&D Systems
anti – Ly6C	HK1.4	eBioscience
anti – Ly6G	1A8	BD Pharmingen
anti – MIF	IIID9	Institut für Biochemie und Zellbiologie, RWTH Aachen
anti – MMP9	Polyclonal	Bioss
anti – MPO	2D4	Abcam
anti – Neutrophil elastase	M – 18	Santa Cruze Biotechnology
anti – TNF α	MP6 – XT22	BioLegend
anti – Timp1	CT	Bioss
Streptavidin – 488	–	Invitrogen
Streptavidin – 568	–	Invitrogen
Streptavidin – 647	–	Invitrogen

2.1.4 Verwendete Kits

Kit	Firma
Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit	Invitrogen
Avedin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories
Chemokine Flow Cytomix Multiplex Kit	eBioscience
Neutrophil Isolations Kit	Miltenyi Biotec
Th1/Th2 Flow Cytomix Multiplex Kit	eBioscience
Mouse CXCL2/MIP-2 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems
Mouse Total MMP-9 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems
Mouse TIMP-1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems

2.1.5 Verwendete Bakterienstämme

Bakterien	Genotyp
Uropathogener <i>E. coli</i> Stamm 536 (UPEC)	O6:K15:H31
GFP - Uropathogener <i>E. coli</i> Stamm 536	O6:K15:H31

2.1.6 Verwendete Mauslinien

Mauslinie	Herkunft
C57B6/J	Jackson oder Janvier
<i>CCR2</i> ^{-/-}	Jackson
CD45.1/2	Jackson
<i>CX₃CR1</i> ^{+/GFP}	Jackson
<i>CXCR2</i> ^{-/-}	U. Panzer
<i>MMP9</i> ^{-/-}	G. Opendakker
<i>TNFα</i> ^{-/-}	Jackson
<i>TNFR-1/2</i> ^{-/-}	H. Blüthmann

2.1.7 Verwendete Pufferlösungen und Medien

Lösungen	Zusammensetzung
0,1% BSA – Lösung	0,1% BSA in PBS
0,1% Bromphenolblau	0,1% Bromphenolblau in dH ₂ O
10 x Elektrophoresepuffer	144g Glycerin 29g TrisBase 10g SDS in 1L dH ₂ O
Entfärbelösung	50% Methanol 10% Essigsäure 40% dH ₂ O
10 x Entwicklungspuffer	12g TrisBase 63g TrisHCl 117g NaCl 7,4g CaCl ₂ 0,2% BriJ – 35 in 1L dH ₂ O
FACS - Puffer	0,1% FCS 0,1% NaN ₃ In PBS
Lysepuffer	50mM TrisHCl (pH 7,6) 150mM NaCl 5mM CaCl ₂ 0,05% BriJ – 35 0,02% NaN ₃ 0,1% TritonX – 100 in dH ₂ O pro 10ml Lysepuffer: 1 Tablette des Proteasehemmers 100 µg/ml Gentamicin

NEM	25mg N - ethylmaleimide 0,3ml Glycerin in 1ml dH ₂ O
10 x Renaturierungspuffer	25% TritonX – 100 in dH ₂ O
Zellkultur – Medium	500ml RPMI 1640 Medium 5ml L-Glutamin 5ml Penicillin/Streptavidin 50ml FCS 5,5ml β – Mercaptoethanol
Zellkultur – Medium (Hungermedium)	500ml RPMI 1640 Medium 5ml L-Glutamin 5ml Penicillin/Streptavidin 0,5ml FCS 5,5ml β – Mercaptoethanol

2.1.8 Verwendete Programme

Programme	Firma
Adobe Acrobat	Adobe
Adobe Illustrator CS5	Adobe
BD FACS Diva	BD Bioscience
EndNote	Tomson Reuters
FlowJo	Tree Star
Image J	NIH
Microsoft Office	Microsoft
Prism	Graph Pad

2.2 Methoden

2.2.1 Generierung einer Cystitis in Mäusen

2.2.1.1 Uropathogene *E. coli* (UPEC) – Kultivierung

Für die Herstellung der Bakteriensuspension zur Infektion von Mäusen werden Bakterienzellen einer Dauerkultur des Stammes Uropathogener *E. coli* 536 (O6:K15:H31) in 200ml LB – Medium angeimpft und über Nacht bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Zur Förderung der Typ-I-Pili-Expression auf der Oberfläche der Bakterien, wodurch eine verbesserte Infektionsstärke erreicht wird, wird die Bakterienkultur im Wärmeschrank ohne Rotation kultiviert. Am darauf folgenden Tag wird die Kultur für zehn Minuten bei 4000rpm (Avanti J-20 XP Zentrifuge) zentrifugiert und das entstandene Bakterienpellet in 2ml LB – Medium resuspendiert.

2.2.1.2 Infektion der Harnblase von Mäusen mit Uropathogenen *E. coli*

Die zu infizierenden Mäuse werden mit Hilfe eines Isofluran – Narkosegerätes (1,2% Isofluran, zwei atm Sauerstoffdruck) in Narkose versetzt und unter Verwendung eines Katheters (Plastikhülle einer 20G, BD Vasculon Plus Venenverweilkanüle) 100µl einer Bakteriensuspension (ca. 5×10^8 Bakterien, siehe 2.2.1.1) in die Harnblase der Maus injiziert. Um den Harnleiter beim Einführen des Katheters nicht zu verletzen wird Instillgel als Gleitmittel für den Infektionsvorgang verwendet. Nach Abschluss der Infektion mit den UPEC – Bakterien erwachen die Tiere anschließend aus der Narkose. Die Infektionsdauer ist vom Versuchsvorhaben abhängig und variiert zwischen 3, 6 oder 24 Stunden.

2.2.2 Entnahme von Vollblut, Mausserum, der Harnblase, Endpunkt- und Sammel – Urin aus uninfizierten und mit UPECs infizierten Mäusen

2.2.2.1 Gewinnung von Vollblut und Blutserum

Zur Gewinnung des Vollblutes wird die Maus zunächst mittels CO₂ – Begasung getötet, der Brustkorb geöffnet und das venöse Blut mittels einer 26G-Kanüle aus dem rechten Ventrikel des Herzens entnommen. Zur Analyse des Vollblutes wird dieses in 10µl EDTA

(0,5M) aufgenommen und weiter verarbeitet (siehe 2.2.3.2). Für die Herstellung von Blutserum dagegen wird das Vollblut ohne EDTA – Zusatz bei 10.000rpm für zehn Minuten zentrifugiert und der Serum enthaltende Überstand abgenommen.

2.2.2.2 Isolierung der Harnblase

Der Bauchraum der mit CO₂ getöteten Maus wird geöffnet und die Harnblase entnommen. Die Blase wird anschließend in zwei gleich Große Stücke geteilt und in RPMI – Medium mit darin enthaltenen Antibiotikum (Gentamicin, 100µg/ml) überführt.

2.2.2.3 Gewinnung von Endpunkturin

Zur Gewinnung von Endpunkturin wird die Maus mit der Hand fixiert und der Urin mittels sanften Drückens auf die Harnblase herausgeleitet und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Anschließend wird die Urinmenge bestimmt und je nach Versuchsvorhaben weiter verarbeitet (siehe 2.2.4 und 2.2.7). Die Zeitpunkte der Urinentnahme variieren zwischen 3, 6 und 24 Stunden.

2.2.2.4 Gewinnung von Sammelurin

Mit Hilfe von Stoffwechsellkäfigen kann der gesamte Urin der Maus über eine längere Zeitperioden gewonnen werden. Hierzu wird die Maus in dem Stoffwechsellkäfig über einen Zeitraum von 12 bis 24 Stunden gehalten und der im Käfig gesammelte Urin in regelmäßigen Abständen entnommen. Zu jedem Zeitpunkt wird die Urinmenge bestimmt und weiter nach Protokoll verarbeitet (siehe 2.2.4 und 2.2.7).

2.2.3 Generierung von Einzelzellsuspensionen aus Mausgewebe

2.2.3.1 Herstellung von Homogenat aus der Harnblase

Die isolierte Blase (siehe 2.2.2.2) wird in 500µl Lysepuffer, mit enthaltenem Antibiotikum (Gentamicin, 100µg/ml) und Proteasehemmer (eine Tablette in 10ml Puffer), gegeben und für 20 Minuten zur Eliminierung von extrazellulären Bakterien auf Eis gehalten. Im Anschluss wird die Blase mit Hilfe eines Ultra – Turrax T10 zerkleinert und die

unlöslichen Zellbestandteile bei 10.000rpm für zehn Minuten abzentrifugiert (Avanti J-20 XP Zentrifuge). Der Überstand mit dem darin befindlichen Homogenat wird sofort analysiert oder bei -20°C eingefroren.

2.2.3.2 Isolierung von Mauszellen aus dem Vollblut

Für die Isolierung der Immunzellen aus dem Vollblut der Maus ist es notwendig eine Lyse der Erythrozyten vorzunehmen: Hierzu werden 100µl des Blutes mit 2ml RCB - Lösung in FACS – Rörchen vermischt und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wird die Zelllösung mit 4ml PBS oder FACS – Puffer gewaschen und für fünf Minuten bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert. Die Erythrozytenlyse wird im Anschluss nochmals wiederholt.

2.2.3.3 Isolierung von Mauszellen aus der Harnblase

Nach Entnahme der Harnblase aus der Maus wird diese in 2ml Verdaumedium (PBS mit 2mg/ml Kollagenase, 100µg/ml DNase und 100µg/ml Gentamicin) für 45 Minuten bei 37°C und 30rpm in einer 6-Well-Platte inkubiert und anschließend mit einem Kolben einer 5ml Einwegspritze zerkleinert. Die Zellsuspension wird daraufhin in FACS-Rörchen überführt und bei 4°C und 1200rpm (Heraeus Multifuge 3 S-R) für fünf Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird für die Zelloberflächenmoleküle mit ausgewählten Antikörpern und anschließender durchflusszytometrischen Analyse (siehe 2.2.4) weiter verwendet.

2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung und durchflusszytometrische Analyse von Harnblasen- und Blutzellen

2.2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung von extrazellulären Molekülen

Um unspezifische Bindungen der Fluorochrom-gekoppelten-Antikörper zu vermeiden, werden die isolierten Zellen aus dem Vollblut und der Harnblase zunächst mit einem Antikörper inkubiert, der spezifisch an FC-Moleküle auf der Zelloberfläche bindet. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C werden die Zellen mit 1ml FACS – Puffer

gewaschen und bei 4°C, 1200rpm für fünf Minuten zentrifugiert (Heraeus Multifuge3S-R). Im Anschluss erfolgt die Oberflächenfärbung mit Hilfe der Fluorochrom-gekoppelten-Antikörper. Hierzu werden ausgewählten Antikörper (siehe 2.1.3) zu austitrierten Mengen zu den Zellen zugegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert, im Anschluss mit 1ml FACS – Puffer gewaschen und für fünf Minuten bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 200µl FACS – Puffer aufgenommen und für eine spätere Quantifizierung der Zellmenge mit jeweils 10.000 APC-Beads versetzt. Die nachfolgende Analyse der Proben erfolgt im Durchflußzytometer und wird des weiteren mit der Software Flowjo (Tree Star Inc.) ausgewertet.

2.2.4.2 Immunofluoreszenzfärbung von intrazellulären Molekülen

Für die intrazelluläre Färbung von Molekülen ist es notwendig die Zellen nach der Isolation (siehe 2.2.3) für vier Stunden mit Golgi-Plug zu inkubieren. Um daraufhin intrazellulär gelegene Moleküle mittels flourezierenden Antikörpern färben zu können, müssen die Zellen nach der Oberflächenfärbung (siehe 2.2.4.1) zunächst fixiert und permeabilisiert werden. Hierzu werden die Zellen für 20 Minuten bei 4°C in einer 4%-Formaldehydlösung gehalten und anschließend mit 1ml FACS – Puffer zwei Mal gewaschen. Daraufhin werden die Zellen für fünf Minuten bei 1200rpm zentrifugiert und das Pellet für zehn Minuten in 0,1% Triton aufgenommen. Im Anschluss werden die Zellen wiederum zwei Mal mit 1ml FACS – Puffer gewaschen, zentrifugiert und die Intrazellulärfärbung durchgeführt. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, werden Antikörper bzw. Phalloidin gegen die Moleküle CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL5 und F-Aktin verwendet, die direkt mit dem Fluorochrom gekoppelt sind. Diese werden in austitrierten Mengen zu den Zellen gegeben und die Zell-Antikörper-Lösung für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluss werden diese gewaschen, mit APC-Beads versetzt, des weiteren am Durchflußzytometer ausgewertet und mittels der Software Flowjo (Tree Star Inc.) analysiert.

2.2.4.3 Kopplung von Fluorochromen an Antikörper

Die Kopplung der Antikörper CXCL1, CXCL5, MIF und Neutrophil-Elastase mit Fluorochromen wird mit dem „Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit“ von Invitrogen durchgeführt.

2.2.5 Detektion und Quantifizierung von Chemokinen, Zytokinen und Proteasen in Blasenhomogenaten

2.2.5.1 Enzym – gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Die Detektion und Quantifizierung der Proteine CXCL2, MMP9, TIMP1 und TNF α im Blasenhomogenat werden mittels entsprechender ELISA der Firma R&D-Systems durchgeführt.

2.2.5.2 Multiplex Analyse mit „bead“ basierter Methode

Die Expression der Chemokine (GM-CSF, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 und CCL7) und der Cytokine (IFN γ , IL-1a, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17) in Homogenaten von infizierten Harnblase werden mit den „Th1/Th2-“, und „Chemokine Flow Cytomix Multiplex Kits“ von eBioscience ermittelt.

2.2.6 Gelatine Zymographie

Die Gelatin-Zymographie ist ein direkter Nachweis für die gelatinolytische Aktivität der Matrix Metalloproteinasen zwei und neun. Hierzu werden die Homogenate der Harnblase (siehe 2.2.3.1) oder die Zellüberstände aus *in vitro* Kulturen (siehe 2.2.11.2) mit Probepuffer vermennt, für 15 Minuten darin inkubiert und im Anschluss auf ein gelatinehaltiges SDS-Gel aufgetragen. Die Separation der Proteine, die unter denaturierenden aber nicht-reduzierenden Bedingungen stattfindet, erfolgt bei 125V für 120 Minuten. Nach der Elektrophorese erfolgt die Renaturierung der Proteine innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur unter Einsatz von Renaturierungspuffer. Nachfolgend wird das Gel mit den darin befindlichen Proteinen bei 37°C für 48 Stunden in Entwicklungspuffer inkubiert. Innerhalb dieser Zeit zersetzen die nach Größe aufgetrennten Matrix Metalloproteinasen zwei und neun die im Gel befindliche Gelatine. Im Anschluss erfolgt die Färbung des Geles mit 0,5% Comassie für 30 Minuten mit darauf folgender Entfärbung. Die Areale, in denen sich die beiden Proteasen befinden und die darin befindliche Gelatine zersetzt haben, sind ungefärbt. Das angefärbte Gel wird daraufhin mit Hilfe eines „Canon LIDE Scanners“ aufgenommen und die Lichtstärke der

ungefärbten Areale, die die Aktivität der Proteasen widerspiegelt, mit der Software "Image J" ermittelt.

2.2.7 Quantifizierung der Infektionsstärke

Die Quantifizierung der Infektionsstärke erfolgt durch den Ausstrich von Urin (siehe 2.2.2) bzw. Blasenhomogenaten (siehe 2.2.3) auf „CPS3-Select-Agarplatten“. Hierzu werden verschiedene Verdünnungen (1:20, 1:400, 1:8000 und 1:160.000) des Urins bzw. des Homogenates mit PBS hergestellt und ausgestrichen. Die Agarplatten mit dem Ausstrich werden über Nacht bei 37°C inkubiert und die darauf entstandenen Bakterienkolonien anschließend ausgezählt. Es werden ausschließlich die rot-braunen Kolonien berücksichtigt, da nur diese *E. coli* Bakterien darstellen. Kontaminationen, die durch andersfarbige Bakterienkolonien erkennbar werden, sind eine Seltenheit und treten in der Regel nur beim Ausstrich von Endpunkturin (siehe 2.2.2.3) auf. Die entsprechende Bakterienlast wird pro Milliliter Urin bzw. pro Blase angegeben.

2.2.8 *In vivo* Chemokinblockade, Makrophagendepletion und CXCL2 – Gabe

2.2.8.1 Blockade von Chemokinen

Mit Hilfe von blockierenden Antikörpern wird die Wirkung der Chemokine CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL5 und MIF *in vivo* aufgehoben. Hierzu wird der Maus jeweils einer der blockierender Antikörper in einer Konzentration von 5µg/g Körpergewicht intravenös verabreicht. Die Injektion der Antikörper erfolgt kurz vor der Infektion mit UPECs.

2.2.8.2 Depletion von Ly6C positiven Makrophagen mittels Clodronate Liposomen

Für die Depletion von Ly6C positiven Makrophagen werden der Maus sechs Stunden vor der Infektion 200µl Clodronat Liposomen in die Schwanzvene injiziert. Die Clodronat Liposomen werden verbrauchsfertig vom Hersteller geliefert und daher in unverdünnter

Form verwendet. Nach der Infektion der Maus mit UPECs hängt der weitere Verlauf vom Versuchsvorhaben ab.

2.2.8.3 Injektion von CXCL2 in das Lumen der Harnblase

Im ersten Schritt werden $TNF\alpha^{-/-}$ Mäuse mit UPECs infiziert (siehe 2.2.1) und 24h danach erfolgt die Chemokin-Gabe. Dies hat den Grund, dass die neutrophilen Granulozyten sich erstmals unter den Uroepithel ansammeln, bevor sie durch die CXCL2 - Injektion animiert werden sollen in das Epithel einzuwandern. Am darauf folgenden Tag wird den Mäusen zu den Zeitpunkten 24h, 26h und 30h nach Infektion, 2,5µg CXCL2 in einem Volumen von 100µl in das Lumen der Harnblase injiziert. Als Kontrolle dienen $TNF\alpha^{-/-}$ Mäuse, die kein Chemokin erhalten haben. Nach 33 Stunden wird die Harnblase herauspräpariert und in „Tissue-Tek“ eingebettet (siehe 2.2.10.2.1).

2.2.9 Generierung von Knochenmarks – Chimären

Für die Generierung von Knochenmarkschimären werden die Mäuse zunächst mit Avertin betäubt und mit dem Schmerzmittel Ketamin behandelt. Um das Austrocknen der Augen zu verhindern werden diese mit einer Fettsalbe bestrichen und die Mäuse anschließend mit 9 Gray bestrahlt. Am darauf folgenden Tag werden zwei Millionen Knochenmarkszellen (KM) einer ausgewählten Spendermaus in die Schwanzvene der bestrahlten Maus injiziert. Entsprechende Kombinationen sind: WT - KM in WT- bzw. $TNFR^{-/-}$ - Maus, $TNFR^{-/-}$ - KM in WT- bzw. $TNFR^{-/-}$ - Maus oder $TNF\alpha^{-/-}$ - KM in WT- bzw. $TNF\alpha^{-/-}$ - Maus. Für die Generierung von gemischten Knochenmarkschimären ($WT/TNFR^{-/-}$ - KM in WT- bzw. $TNFR^{-/-}$ - Mäuse) werden den bestrahlten Mäusen Knochenmarkszellen von WT- und $TNFR^{-/-}$ - Spendermäusen in einem Verhältnis von 50:50 injiziert. In einem Zeitraum von zwei bis drei Monaten findet der vollständige Austausch des Knochenmarks statt. Um den Knochenmarksaustausch zu kontrollieren wird den Mäusen in dieser Zeit regelmäßig Blut entnommen und die darin befindlichen Immunzellen nach speziellen Markern der Spender- bzw. Empfängermaus hin untersucht. Für WT Mäuse werden als Spender in der Regel CD45.1 – KO Mäuse verwendet, so dass nach dem Austausch alle Immunzellen im Blut und daher ebenso im Knochenmark diesen kongenen Marker aufweisen müssen. Soll $TNFR^{-/-}$ - oder $TNF\alpha^{-/-}$ - Knochenmark in eine WT Maus transferiert werden, so besitzt die

Empfängermaus diesen kongenen Marker (CD45.1). In diesem Fall sind die ausgetauschten Immunzellen negativ für den kongenen Marker. Allerdings sind diese immer noch für den regulärer Immunzellmarker CD45.2 positiv.

2.2.10 Immunohistochemische Methoden

2.2.10.1 Herstellung und Färbung von Paraffin – Gewebeschnitten

2.2.10.1.1 Fixierung und Paraffineinbettung von Harnblasengewebe

Nach der Entnahme der Harnblase wird diese zur Fixierung für fünf Stunden und bei 4°C in 10-prozentiger Zink-Fix-Lösung eingelegt. Im Anschluss erfolgt die Geweewässerung und die Einbettung der Harnblase in Paraffin, nach folgendem Protokoll:

	70% Ethanol	12 Stunden
	70% Ethanol	40 Minuten
	80% Ethanol	40 Minuten
	90% Ethanol	40 Minuten
2 x	absolut Ethanol	40 Minuten
2 x	50 : 50 Ethanol : Xylol	30 Minuten
2 x	Xylol	30 Minuten
3 x	Paraffin	25 Minuten

Am darauf folgenden Tag wird das Organ in eine Histokassette transferiert und mit 60°C heißem Paraffin übergossen. Nach dem Erkalten können die entstandenen Paraffinblöcke mit den darin enthaltenen Harnblasen am Mikrotom geschnitten werden.

2.2.10.1.2 Anfertigung von Schnittpräparaten am Mikrotom

Die Gewebeschnitten werden mit Hilfe eines Mikrotoms bei Raumtemperatur angefertigt. Hierzu werden 5µm dicke Schnitte hergestellt, die zur Entfaltung in ein 37°C warmes Wasser überführt werden. Die auf der Wasseroberfläche schwimmenden Schnittpräparate werden anschließend auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Nach dem Trocknungsvorgang werden die Schnitte unterschiedlichen Färbemethoden unterzogen (siehe 2.2.10.1.3 und 2.2.10.1.4).

2.2.10.1.3 Antikörperfärbung

Die Antikörperfärbung der in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte erfolgt im Labor von Professor Dr. Gröne (Experimentelle Pathologie) an der Universität von Heidelberg. Für die Färbung wird der für Granulozyten spezifische Antikörper Ly6G verwendet, der während des Färbeprozesses mit einer Peroxidase gekoppelt wird. Zur Visualisierung wird anschließend eine Peroxidasefärbung mit 2,3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) durchgeführt.

2.2.10.1.4 Hämatoxylin – Eosin – Färbung

Für die Hämatoxylin – Eosin – Färbung der Schnittpräparate wird das folgende Färbeprotokoll eingehalten:

3 x		Xylol	10 Minuten
		dH ₂ O	10 Sekunden
2 x	absolut	Ethanol	5 Minuten
	90%	Ethanol	5 Minuten
	70%	Ethanol	5 Minuten
		dH ₂ O	10 Sekunden
		Hämatoxylin	5 Sekunden
		dH ₂ O	2 Minuten
	0,2%	Eosin	5 Sekunden
		dH ₂ O	2 Minuten
	70%	Ethanol	5 Minuten
	90%	Ethanol	5 Minuten
2 x	absolut	Ethanol	5 Minuten
3 x		Xylol	10 Minuten

Im Anschluss werden die gefärbten Gewebeschnitte über Nacht getrocknet, mit Hilfe von Glycergel und Deckgläsern eingebettet und am Durchlichtmikroskop ausgewertet.

2.2.10.2 Herstellung und Färbung von Kryo – Gewebeschnitten

2.2.10.2.1 Anfertigung von Schnittpräparaten am Kryotom

Nach Entnahme der Harnblase, wird diese in Kryoschälchen mit „Tissue-Tek“ eingebettet und zum Gefrieren auf eine Mischung aus Trockeneis und n-Hexan gegeben. Mit Hilfe des Kryostaten werden bei einer Temperatur von 17°C 6µm dicken Gewebeschnitte hergestellt, die im Anschluss für eine Stunde bei RT getrocknet werden. Im nächsten

Schritt werden die Gewebeschnitten mit Antikörpern angefärbt oder bis zur Färbung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.10.2.2 Färbung der Kryoschnitte mit spezifischen Antikörpern

Zur Fixierung werden die Gewebeschnitte zunächst für zehn Minuten bei 70°C getrocknet und anschließend für zehn Minuten in Aceton gehalten. Nach dem Verdunsten des Acetons werden die Schnitte mit 1% BSA für eine Stunde geblockt. Im nächsten Schritt werden spezifisch die intrazellulär gelegenen Biotine mit einem „Avedin/Biotin-Blocking-Kit“ entsprechend des Herstellerprotokolls geblockt und danach mit 1% BSA gewaschen. Anschließend wird der Primärantikörper (Ly6G – Biotin) in einer Verdünnung von 1:200 auf die Gewebeschnitte gegeben und diese für 12h im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag werden die Schnitte wiederum mit 1% BSA gewaschen und mit dem Sekundärantikörper Streptavidin-AF488 bzw. -AF647 (1:1000) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Gewebeschnitte mit 1% BSA gewaschen und daraufhin mit 1µg/ml DAPI inkubiert. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Schnitte wiederum mit 1% BSA gewaschen, kurz in destilliertes Wasser geschwenkt und mit „Immunount“ eingedecklet. Nachdem trocken der Schnitte werden die angefärbten Gewebeschnitte am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.11 Isolation, adaptiver Transfer und *in vitro* Kulturen von neutrophilen

Granulozyten bzw. Ly6C positiven Makrophagen aus dem Knochenmark

2.2.11.1 Isolation von neutrophilen Granulozyten

Zur Isolierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark werden die Hinterbeine der Maus (Ober- und Unterschenkel) herauspräpariert und die Knochen vollständig von der Muskulatur getrennt. Die Beine werden mit PBS gesäubert und das Knochenmark mittels einer Kanüle (26G) mit eiskaltem PBS herausgespült. Die Knochenmarkszellen werden mit 40ml PBS gewaschen und bei 1200rpm und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Die Isolierung der neutrophilen Granulozyten erfolgt im Anschluss

mit Hilfe des „Neutrophil Isolation Kits“ von Milteny Biotec. Sämtliche Isolationsschritte finden hierzu unter sterilen Bedingungen statt.

2.2.11.2 *In vitro* Stimulation von neutrophilen Granulozyten

Nach der Isolierung der neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark (siehe 2.2.11.1) werden jeweils 200.000 Granulozyten mit RPMI – Medium (1% FCS und 1% Penicillin/Streptavidin) und entsprechenden Stimulanzen in einem „96-flach-Well“ kultiviert. Die Stimulation der Zellen erfolgt bei 37°C mit 10ng/ml TNF α und/oder 10ng/ml CXCL2 für sechs Stunden. Als Kontrolle dienen Granulozyten, die lediglich mit RPMI – Medium kultiviert werden. Nachfolgend wird die Zellsuspension für zehn Minuten bei 1200rpm zentrifugiert und der Überstand mit den sezernierten Proteinen abgenommen und bei -20°C eingefroren. Die Überstände werden im Anschluss nach ihrer MMP2/9- Aktivität durch die Gelatine Zymographie analysiert (siehe 2.2.6).

2.2.11.3 Adaptiver Transfer von neutrophilen Granulozyten

Die aus dem Knochenmark isolierten WT- (CD45.1) und *TNFR*^{-/-} (CD45.2) Granulozyten werden für zehn Minuten und 37°C mit 5 μ M CFSE inkubiert und die Reaktion nach Ablauf der Zeit mit 1% BSA abgestoppt. Die Granulozyten werden nochmals mit PBS gewaschen, bevor sie (2x10⁶Zellen/200 μ l) in die Schwanzvene der Maus injiziert werden. Die weitere Analyse der transferierten Granulozyten hängt vom Versuchsvorhaben ab. Die Rekrutierung der Zellen in die infizierte Harnblase bzw. in den Urin findet mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.2.4) statt. Dagegen wird die Position der transferierten Granulozyten innerhalb der Harnblase über histologische Methoden (siehe 2.2.10) ausgewertet.

2.2.11.4 Isolation von Ly6C positiven Makrophagen

Im ersten Schritt werden Knochenmarkszellen aus der Maus isoliert (siehe 2.2.11.1). Die aufgereinigten Knochenmarkszellen werden mit einem Antikörper (1:200), der spezifisch FC-Moleküle auf der Zelloberfläche bindet, für 30 Minuten bei 4°C inkubiert, mit 10ml MACS-Puffer gewaschen und für fünf Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in eine Färbelösung aufgenommen, die die Antikörper Ly6G-Biotin und

CD11c-Biotin in einer Konzentration von 1 zu 200 enthält. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C werden die Zellen wiederum mit 10ml MACS-Puffer gewaschen, für fünf Minuten bei 15000rpm zentrifugiert und in einem Milliliter MACS-Puffer aufgenommen. Es werden 50µl Anti-Biotin-MicroBeads zu der Zellsuspension zugegeben und diese für 15 Minuten bei 4°C in der Lösung inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen mit 10ml MACS-Puffer gewaschen, bei 15000rpm zentrifugiert und die Zellen in 3ml MACS-Puffer aufgenommen. Im nächsten Schritt wird die Separationssäule in einen magnetischen Träger eingesetzt und fünf Milliliter MACS-Puffer auf die Säule gegeben. Nachdem der Puffer durch die Säule durchgelaufen ist, wird die Zellsuspension auf die Säule gegeben und die durchgeflossenen Zellen, die keine Beads gebunden haben, aufgefangen. Um alle ungebundenen Zellen aus der Säule herauszuspülen, wird die Separationssäule zusätzlich drei Mal mit 3ml MACS-Puffer gewaschen. Nach dieser Separation wurden nun alle Zellen, die Ly6G (neutrophile Granulozyten) oder CD11c (dendritische Zellen) Marker aufweisen aus der Zellsuspension isoliert.

Um nun die Ly6C positiven Makrophagen aus der gewonnenen Zellsuspension zu isolieren, werden die Zellen für 30 Minuten bei 4°C mit dem Antikörper Ly6C-Biotin (1:200) inkubiert und der beschriebene Separationsvorgang wiederholt. Nachdem die Separationssäule allerdings drei Mal mit Puffer gewaschen wurde, wird die Säule vom magnetischen Träger getrennt und die Ly6C positiven Makrophagen aus der Säule aufgefangen. Um alle Zellen aus der Säule zu entfernen wird diese nochmals mit 5 Milliliter MACS-Puffer durchspült.

2.2.11.5 Adaptiver Transfer von Ly6C positiven Makrophagen

Die zu injizierenden Ly6C⁺ Makrophagen werden nach der Isolation (siehe 2.2.11.4) mit 20ml PBS gewaschen und für fünf Minuten zentrifugiert. Im Anschluss werden die Makrophagen entsprechen der Zellzahl in PBS aufgenommen (1×10^6 Zellen/200µl) und in die Schwanzvene von infizierten *TNFα*^{-/-} Mäuse injiziert. 24 Stunden nach der Infektion wird die Blase der KO – Tiere entnommen, Paraffinschnitte hergestellt, die Schnitte mit dem Antikörper Ly6G angefärbt und die Lage der neutrophilen Granulozyten analysiert.

2.2.12 Analyse der chemotaktischen Migration von neutrophilen Granulozyten *in vitro*

2.2.12.1 „Transwell“ – Migrationsanalyse von neutrophilen Granulozyten

Nach der Isolation der neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark von WT und *TNFR^{-/-}* Mäusen (siehe 2.2.11.1) werden diese mit dem Zytokin TNF α (10ng/ml) in 10ml RPMI – Medium mit 0,5% FCS für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Als Kontrolle dienen Zellen der beiden Maustypen, die lediglich mit dem Medium inkubiert werden. Nach der Stimulation werden die neutrophilen Granulozyten gezählt und 2×10^5 Zellen in 200 μ l RPMI – Medium mit 0,5% FCS in die obere Kammer eines „Transwells“ mit einer Porengröße von 3 μ m gegeben. In die untere Kammer werden ein Milliliter des selben Mediums mit unterschiedlichen Konzentrationen des Chemokins CXCL2 oder des Chemoattraktants C5a (0, 10, 20 und 200ng/ml) gegeben. Nach Beendigung der Inkubationszeit von 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ werden die verbliebenen Zellen in der oberen Kammer und die migrierten Zellen in der unteren Kammer entnommen, mit Hilfe des Antikörpers Ly6G (siehe 2.2.4) angefärbt und die Zellzahl am Durchflußzytometer bestimmt. Anhand der Zellzahlen in der oberen und unteren Kammer kann der Prozentsatz der migrierten Zellen in die untere Kammer des „Transwells“ ermittelt werden.

2.2.12.2 3D-Kollagen-Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten

Die isolierten wildtypischen neutrophilen Granulozyten werden zunächst mit 10ng/ml TNF α in 0,5% FCS-RPMI – Medium oder zur Kontrolle nur mit dem Medium für vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wird das im Medium enthaltene TNF α durch zwei maliges Waschen mit 0,5% FCS-RPMI – Medium entfernt und die Zellen im Medium auf Eis gehalten.

Im nächsten Schritt wird das 3D-Gel vorbereitet, indem Kollagen-1 mit 7,5%igem Natriumbicarbonat und 10 x MEM auf Eis und unter sterilen Bedingungen vorsichtig vermengt werden. Im Anschluss werden die neutrophilen Granulozyten mit einer Ratio von 2:1 (Kollagengel : Zellen) in den Mix zugegeben, so dass sich pro Ansatz letztendlich 2×10^5 Zellen in 150 μ l Gel befinden. Das Zell-Gel-Gemisch wird daraufhin in eine

Chemotaxis-Kammer gefüllt und zur Polymerisation des enthaltenen Kollagens für 90 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Nachdem das Gel auspolymerisiert ist, wird das Chemokin CXCL2 in einer Konzentration von 10ng/ml auf das Gel gegeben und mit Hilfe eines automatisierten TE Eclipse Mikroskop Zeitserien (ca. 10 Stunden) von motilen neutrophilen Granulozyten im 3D-Kollagen-1-Gel aufgenommen. Während der Aufnahmen herrscht eine Temperatur von 37°C, so dass die Zellen zur Migration eine optimale Umgebungstemperatur besitzen. Die Migrationsgeschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten und die Direktionalität der Zellmigration zum Chemokin wird mit dem Programm Image J ausgewertet.

2.2.13 Statistik

Die Signifikanzen wird mit Hilfe des ANOVA plus und zur Bestätigung zusätzlich mit dem Bonferroni Test berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Relevante Immunzellen in der Zystitis

Zur Analyse der in der Zystitis relevanten Immunzellen, wurde die Präsenz der Zellen vor und während einer Harnblaseninfektion mit uropathogenen *E.coli* durchflußzytometrisch untersucht. Mit Hilfe der in Abbildung 3.1A dargestellten FACS-Daten lassen sich nun in der uninfizierten und der infizierten Harnblase zwei unterschiedliche Makrophagentypen definieren, die beide den für Makrophagen typischen Zellmarker F4/80 aufweisen, sich allerdings in der Expression des Markers Ly6C unterscheiden (Ly6C⁻ und Ly6C⁺ Makrophagen). Des Weiteren erscheint nach der Infektion eine dritte Zellpopulation in der Harnblase, die aufgrund des fehlenden F4/80-Signals und der Ly6G⁻ (Daten sind nicht dargestellt) und Ly6C⁻ Expression als neutrophile Granulozyten identifiziert wurde. Im nächsten Schritt wurde die Anzahl dieser drei Zelltypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Infektion analysiert. Wie in Abbildung 3.1B zu sehen ist, steigt die Anzahl der Ly6C⁻ Makrophagen in einem Zeitraum von 48h nach der Infektion nur leicht bis gar nicht an. Die Zellanzahl der Ly6C⁺ Makrophagen, die auch als inflammatorische Makrophagen bezeichnet werden, dagegen steigt in einem Zeitraum von 24 Stunden stetig an, bis sie nach 48 Stunden wieder absinkt. Die Abnahme dieser Zellen könnte mit einer verbesserten Infektion im Zusammenhang stehen, da ein vergleichbar starker Abfall in der Zellzahl von neutrophilen Granulozyten zum gleichen Zeitpunkt stattfindet. Durch den Vergleich der Zellmenge der Ly6C⁺ Makrophagen mit der derjenigen neutrophilen Granulozyten wird deutlich, dass bedeutsam mehr Granulozyten als Makrophagen während einer UPEC-Infektion in die Harnblase rekrutiert werden.

Um potentielle Unterschiede in der Funktion der drei Immunzellen zu analysieren, wurde die Lage der Zellen im Gewebe mittels histologischer Schnitte von uninfizierten und infizierten Harnblasen untersucht (Abbildung 3.1C). Hierzu wurden CX3CR1^{+GFP}- Mäuse verwendet, in denen alle CX3CR1 positive Zellen, welche vornehmlich Makrophagen sind, den grünen Farbstoff GFP exprimieren. Zusätzlich wurden die Schnitte mit einem Fluorochrom gekoppelten Antikörpern gegen den Marker Ly6C angefärbt, so dass in den histologischen Schnitten Ly6C⁻ Makrophagen grün (CX3CR1^{+GFP} positiv), Ly6C⁺ Makrophagen gelb (CX3CR1^{+GFP} und Ly6C positiv) und neutrophile Granulozyten rot

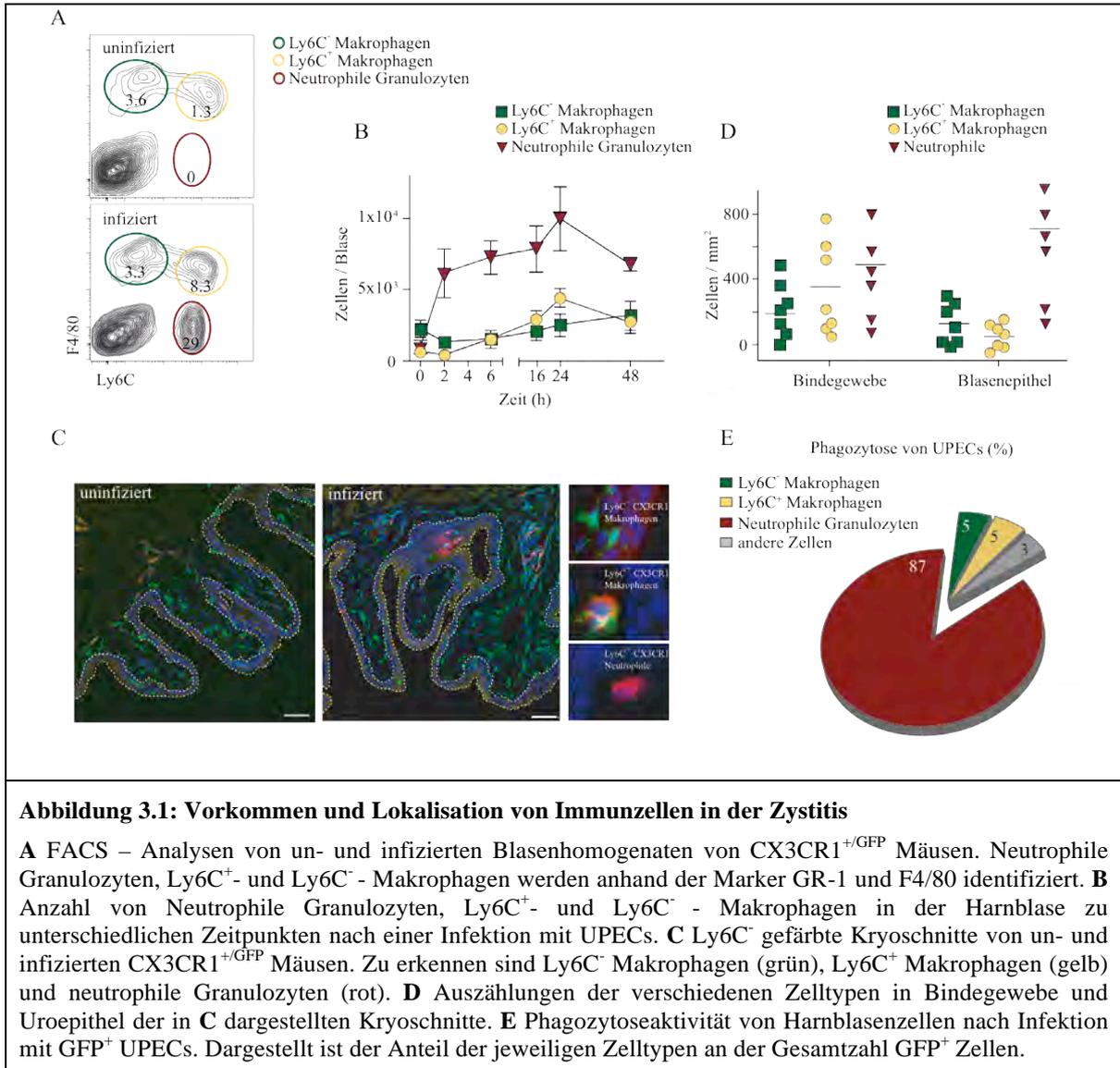


Abbildung 3.1: Vorkommen und Lokalisation von Immunzellen in der Zystitis

A FACS – Analysen von un- und infizierten Blasenhomogenaten von CX3CR1^{+/GFP} Mäusen. Neutrophile Granulozyten, Ly6C⁻ und Ly6C⁺ - Makrophagen werden anhand der Marker GR-1 und F4/80 identifiziert. **B** Anzahl von Neutrophile Granulozyten, Ly6C⁻ und Ly6C⁺ - Makrophagen in der Harnblase zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer Infektion mit UPECs. **C** Ly6C⁻ gefärbte Kryoschnitte von un- und infizierten CX3CR1^{+/GFP} Mäusen. Zu erkennen sind Ly6C⁻ Makrophagen (grün), Ly6C⁺ Makrophagen (gelb) und neutrophile Granulozyten (rot). **D** Auszählungen der verschiedenen Zelltypen in Bindegewebe und Uroepithel der in **C** dargestellten Kryoschnitte. **E** Phagozytoseaktivität von Harnblasenzellen nach Infektion mit GFP⁺ UPECs. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zelltypen an der Gesamtzahl GFP⁺ Zellen.

(Ly6C positiv) erscheinen (Abbildung 3.1C). In den histologischen Schnitten der uninfizierten Maus ist zu erkennen, dass sich die beiden Makrophagentypen hauptsächlich im Bindegewebe der Harnblase befinden und neutrophile Granulozyten nahezu abwesend sind. Zur genauen Analyse wurden die drei unterschiedlichen Zelltypen in den histologischen Schnitte der infizierten Mäuse ausgezählt. Die Auszählungen sind in Abbildung 3.1D wiedergegeben. Wie bereits in der uninfizierten Harnblase zu erkennen war, befinden sich Ly6C⁻ und Ly6C⁺ - Makrophagen vorwiegend im Bindegewebe, während sich die Hauptzahl der neutrophilen Granulozyten im Uroepithel wiederfindet.

Um aufzuklären, welche der drei Immunzellen für die Phagozytose von Bakterien innerhalb der Harnblase verantwortlich ist, wurden Wildtypmäuse mit GFP-exprimierenden UPECs infiziert und der Zelltyp ermittelt, der prozentual am meisten grün

fluoreszierende Bakterien aufgenommen hatte. Wie in Abbildung 3.1E verdeutlicht wird, phagozytieren neutrophile Granulozyten mit 87% den Großteil der Bakterien, während Ly6C⁻- und Ly6C⁺- Makrophagen mit jeweils 5% nur einen kleinen Prozentsatz der Phagozytose ausmachen. Zellen, die als CD45⁻ bezeichnet werden, sind Zellen des Blasengewebes und es ist zu vermuten, dass diese keine Phagozytose betreiben, sondern in diesem Fall mit GFP exprimierenden UPECs infiziert sind.

3.2 Chemokin- und Zytokinproduktion von Immun- und Gewebezellen während der Zystitis

Chemokine und Zytokine sind für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in das infizierte Gewebe notwendig. Zur Ermittlung des Zelltypen, der für die Produktion von rekrutierenden Chemokinen, wie beispielsweise CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL5 und MIF bzw. des Zytokins TNF α während der Zystitis verantwortlich ist, wurden diese Moleküle nach der Infektion der Harnblase intrazellulär angefärbt und durchflußzytometrische ausgewertet. In Abbildung 3.2A sind die entsprechenden Histogramme mit den dazugehörigen Isotypkontrollen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass eine Färbung für die oben erwähnten Chemokine ausschließlich bei den Ly6C⁻ Makrophagen zu beobachten ist. Dieser Zelltyp zeigt allerdings keinen Unterschied in der Expression von TNF α zum eingesetzten Kontroll-Isotypen. Makrophagen, die den Marker Ly6C exprimieren, zeigen dagegen ein zum Isotypen positives Signal für den Antikörper, der spezifisch für TNF α ist. Für neutrophile Granulozyten (Ly6G⁺) ist kein auffälliger Unterschied zwischen den eingesetzten Isotypen und den Antikörpern gegen die Chemokine und dem Zytokin TNF α zu erkennen. Des Weiteren wurde mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) *und der Zellanzahl* der Prozentsatz ermittelt, zu dem die Chemokine bzw. TNF α von den einzelnen Zelltypen innerhalb der Harnblase exprimiert werden (Abbildung 3.2B). Die entsprechenden prozentualen Angaben aus Abbildung 3.2B sind in Tabelle 2 nochmals aufgeführt. Wie bereits die Histogramme in Abbildung 3.2A verdeutlichen, erfolgt die Produktion der Chemokine MIF (75%), CXCL1 (85,5%), CXCL2 (73%) und CXCL5 (80,5%) sechs Stunden nach der Infektion hauptsächlich durch Ly6C⁻ Makrophagen. Ca. 20% der Produktion der beiden Chemokine CXCL2 und CXCL5 werden allerdings ebenfalls von Gewebezellen der Harnblase, wie

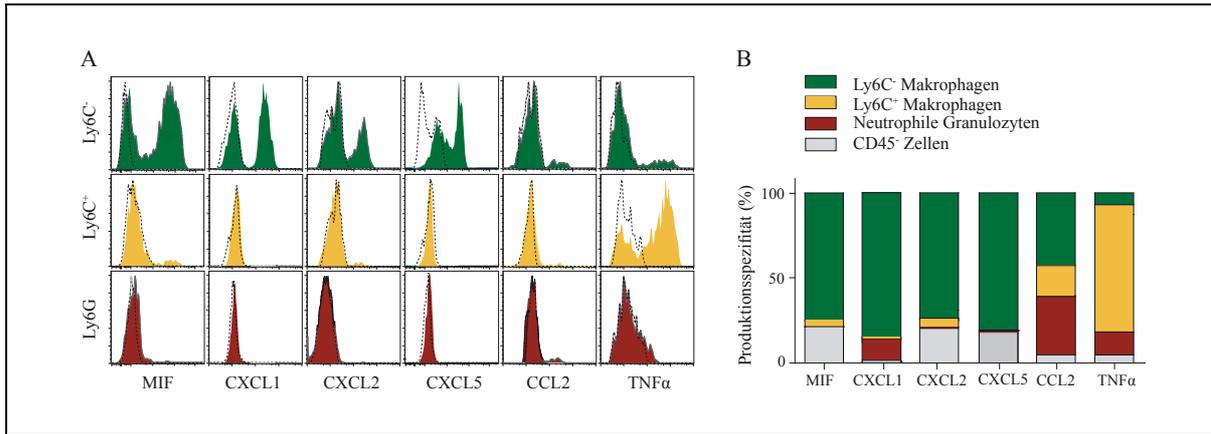


Abbildung 3.2: Chemokin- und Zytokin – Produktion durch neutrophilen Granulozyten, Ly6C⁺- und Ly6C⁻ Makrophagen während der Zystitis

A Durchflusszytometrische Analysen der zellspezifische Expression der Chemokinen MIF, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL2 und des Zytokins TNFα 6 Stunden nach der Infektion mit UPECs. **B** Die Gesamtmenge des entsprechenden Chemokins bzw. TNFα innerhalb der Blase wurde mit Hilfe der Formel: Zellzahl x MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) berechnet.

Tabelle 2: Chemokin- und Zytokinproduktion von Immun- und CD45⁻ Zellen während der Zystitis

%	Ly6C ⁻ Makrophagen	Ly6C ⁺ Makrophagen	Neutrophile Granulozyten	CD45 ⁻ Zellen
MIF	75	3,6	0,4	21
CXCL1	85,5	0,7	13	0,8
CXCL2	73	5,5	1,3	20,2
CXCL5	80,5	0,5	0,5	18,5
CCL2	18,5	42,5	34,5	4,5
TNFα	5,5	79	3,5	3,5

beispielsweise Epithelzellen, produziert. Dagegen wird das Chemokin CXCL1 zu 13% ebenso von neutrophilen Granulozyten produziert. Das Chemokin CCL2, das eine besondere Bedeutung für die Rekrutierung von Makrophagen in das infizierte Gewebe hat, wird anders als die bereits genannten Chemokine von allen dargestellten Immunzelltypen hergestellt: Zu 42% erfolgt die Produktion durch Ly6C⁺- und zu 18,5% durch Ly6C⁻ Makrophagen. Neutrophile Granulozyten tragen ebenfalls einen Teil zur Produktion dieses Chemokins bei (34,5%), wogegen CD45⁻ - Zellen mit 4,5% keine relevanten Mengen exprimieren. Sechs Stunden nach der Infektion wird das Zytokin TNFα wiederum hauptsächlich von einem einzelnen Zelltyp hergestellt: Mit 79% wird der Großteil von

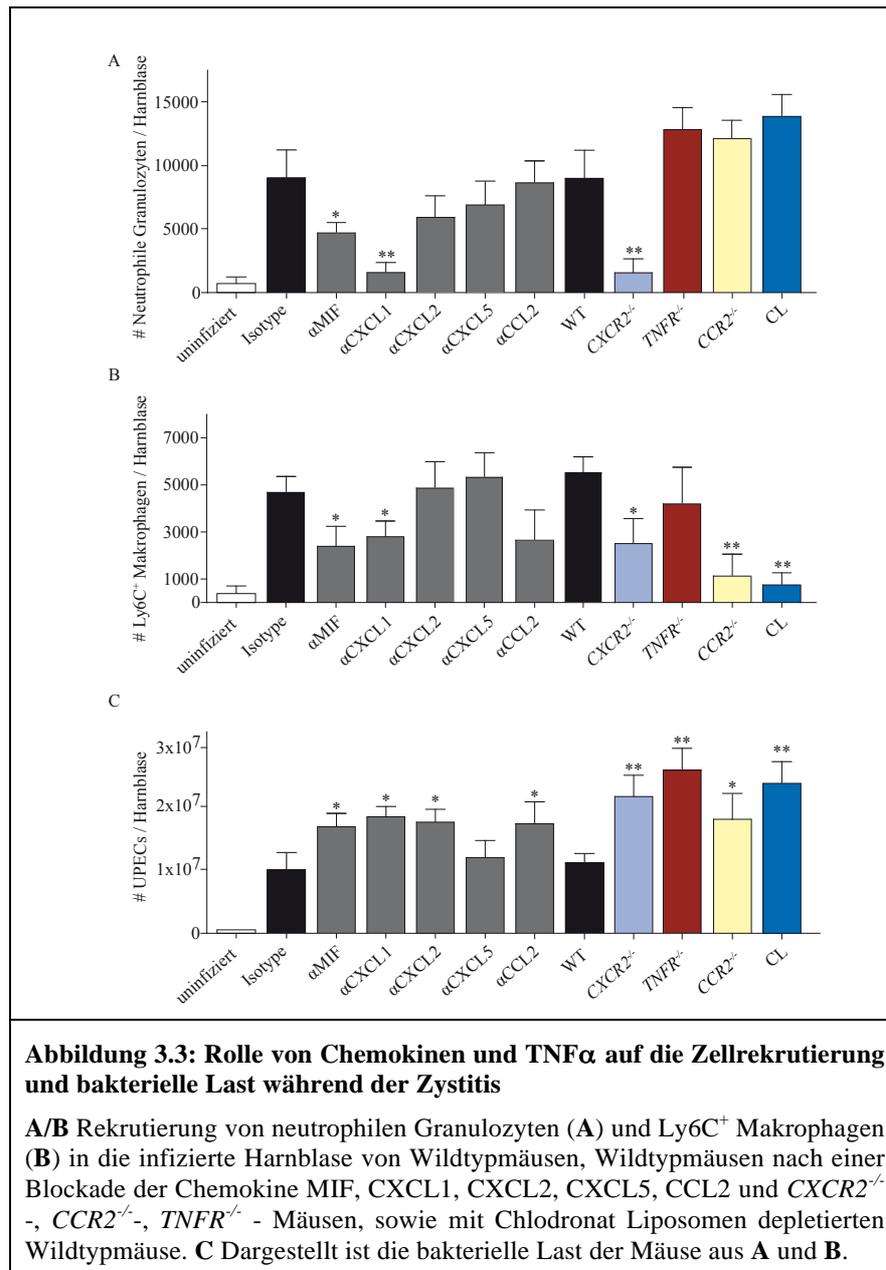
Ly6C⁺ Makrophagen produziert, Ly6C⁻ Makrophagen, neutrophile Granulozyten und CD45⁻ Zellen dagegen tragen lediglich mit 3-5% zur Produktion bei. Somit produzieren Ly6C⁻ Makrophagen hauptsächlich Chemokine, die chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken, und Ly6C⁺ Makrophagen dagegen das proinflammatorische TNF α .

3.3 Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten und Ly6C⁺ Makrophagen in die Harnblase und die Bakterienlast nach einer Chemokinblockade

Zur Analyse der Relevanz der untersuchten Chemokine und des Zytokins TNF α für die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten und der inflammatorischen Ly6C⁺ Makrophagen in die infizierte Harnblase, wurden die Chemokine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern *in vivo* blockiert oder ausgewählte KO – Tiere verwendet (Abbildung 3.3A).

In Abbildung 3.3A ist nach entsprechender Behandlung die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in die infizierte bzw. uninfizierte Harnblase dargestellt. Nach Blockade der Chemokine MIF und CXCL1 ist die Anzahl der neutrophilen Granulozyten zu denen des unbehandelten Wildtypen signifikant reduziert. Die Menge der Granulozyten nach Blockierung der Chemokine CCL2, CXCL2 und CXCL5 entspricht dagegen der Menge des Wildtypen. Fehlt der Rezeptor für die Chemokine CXCL1, CXCL2, CXCL5 und MIF (CXCR2), so ist auch in dieser Maus eine starke Reduktion der Neutrophilenanzahl im Vergleich zu derjenigen des Wildtypen zu erkennen. Der Vergleich zwischen dem Wildtypen und der *TNFR*^{-/-}, *CCR2*^{-/-} bzw. einer mit Chlodronat Liposomen (CL) behandelten Maus zeigt, dass die Zahl der Granulozyten in den KO- bzw. der CL – Mäusen stark erhöht ist.

Abbildung 3.3B zeigt nach der jeweiligen Behandlung der Maus die Rekrutierung der Ly6C⁺ Makrophagen in die infizierte Harnblase. Nach der Blockade der Chemokine CXCL2 und CXCL5 entspricht die Anzahl der Makrophagen derjenigen des Wildtypen. Zudem zeigt die *TNFR*^{-/-} Maus ähnliche Makrophagenmengen wie die Wildtypmaus. Die Infiltration der Ly6C⁺ Makrophagen ist allerdings nach der Blockade der Chemokine MIF, CXCL1 und CCL2 bzw. der Depletion der Makrophagen durch Chlodronat Liposomen im Vergleich zum Wildtypen erniedrigt. Eine solche Verminderung in der Zellzahl der Ly6C⁺



Makrophagen zum Wildtypen ist ebenfalls in den *CXCR2*^{-/-} und *CCR2*^{-/-} Mäusen zu erkennen.

Neben der Rekrutierung der inflammatorischen Immunzellen in die Harnblase, wurde die bakterielle Last in Wildtyp-, *CXCR2*^{-/-}, *TNFR*^{-/-}, *CCR2*^{-/-} – Mäusen nach Chemokinblockade oder nach der Depletion mit Chlodronat Liposomen ermittelt. Nach der Blockade der Chemokine MIF, CXCL1, CXCL2 und CCL2 ist in der Harnblase eine zum Wildtypen bzw. Isotypen erhöhte bakterielle Last zu erkennen, wogegen die Bakterienanzahl nach der Blockade des Chemokins CXCL5 derjenigen des Wildtypen

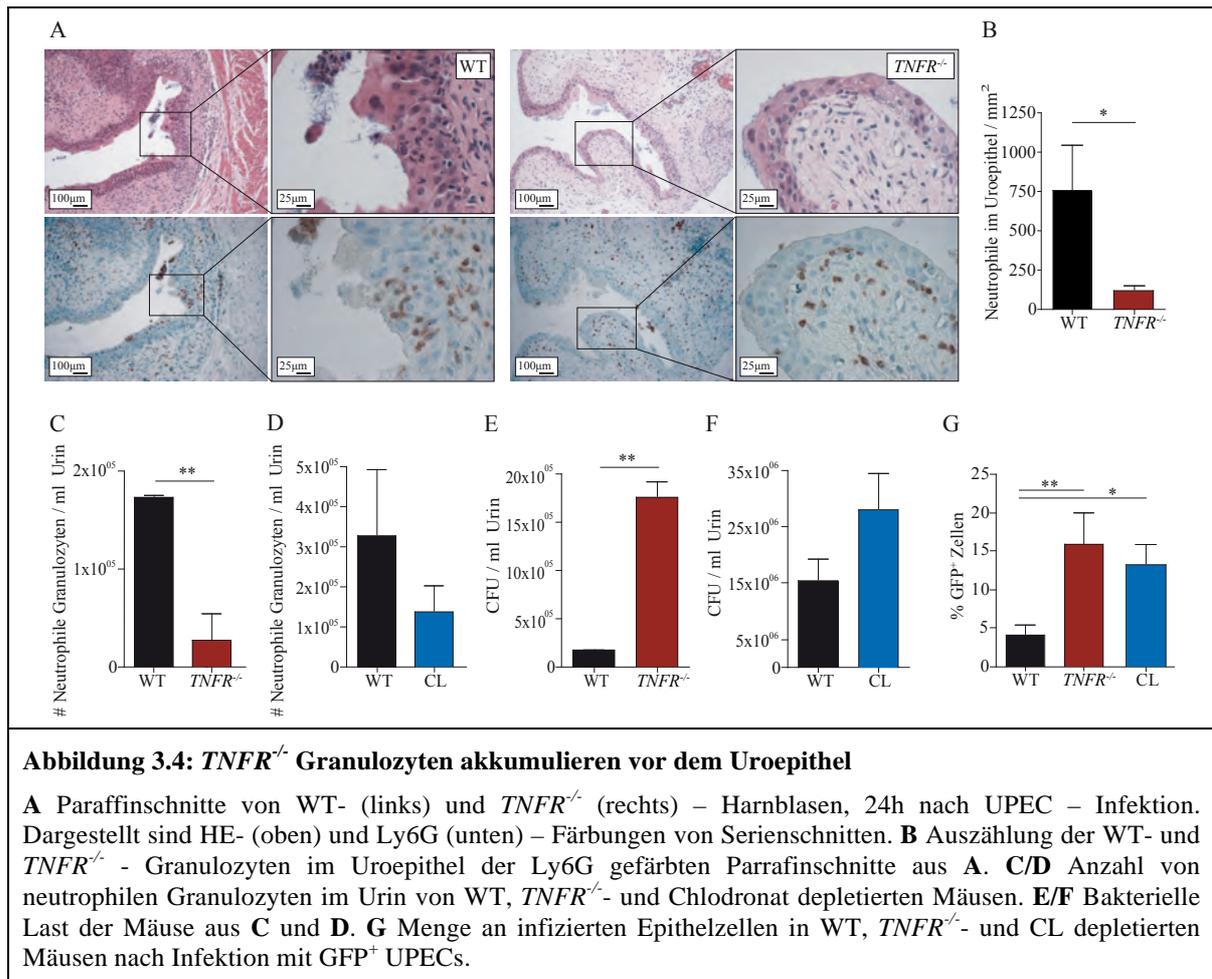
entspricht. Die Menge der Bakterien in der Harnblase aller KO – Mäusen ist zu derjenigen des Wildtypen signifikant erhöht.

Demzufolge sind die beiden Chemokine CXCL1 und MIF für die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten und CCL2 für die Rekrutierung von Monozyten während einer Zystitis verantwortlich. Weiterhin wird deutlich, dass die bakterielle Last in Mäusen, in denen die Anzahl von Granulozyten und Ly6C⁺ Makrophagen im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist, stark erhöht ist. Eine Ausnahme stellen *TNFR*^{-/-}- und CL depletierte Mäuse dar, denen TNF produzierende Makrophagen fehlen. Trotz einer erhöhten Anzahl von Granulozyten ist die bakterielle Last höher als diejenige von Wildtypmäusen.

3.4 Phänotyp der *TNFR*^{-/-} Maus

Um die genaue Position der neutrophilen Granulozyten innerhalb der Harnblase in An- und Abwesenheit der TNF α -Rezeptoren zu ermitteln, wurden Paraffinschnitte von infizierten WT- und *TNFR*^{-/-} – Harnblasen hergestellt und die Granulozyten mit Hilfe eines Ly6G spezifischen Antikörpers angefärbt (Abbildung 3.4A). Um eine ausreichende Menge und eine repräsentative Verteilung der Granulozyten in der Harnblase zu erhalten, wurde die Analyse zu einem späteren Zeitpunkt (24 Stunden nach der Infektion) durchgeführt.

Durch die Anfertigung von Serienschritte war es weiterhin möglich, denselben Bereich der Blase nicht nur mit dem oben genannten Antikörper, sondern gleichzeitig mit den Färbemittel Hämatoxilin – Eosin (HE) anzufärben. Wie in Abbildung 3.4A zu erkennen ist, kann mit Hilfe der HE-Färbung das lila gefärbte Epithel sehr gut vom hellrosa gefärbten Bindegewebe unterschieden werden. Der Vergleich der unterschiedlich gefärbten Schnitte ermöglicht daher eine genaue Analyse der Lokalisation der neutrophilen Granulozyten innerhalb der verschiedenen Gewebeabschnitte. Rechts (Abbildung 3.4A) sind Schnitte der Harnblase einer Wildtypmaus dargestellt. In der Übersicht und in der Vergrößerung der Schnitte ist zu erkennen, dass sich die hier in braun gefärbten neutrophilen Granulozyten sowohl im Epithel als auch im Bindegewebe befinden. Die Position der Zellen im Epithel wirkt des Weiteren nicht zufällig, da sie sich an bestimmten Bereichen zu akkumulieren scheinen. Die Bilder auf der linken Seite zeigen Harnblasen – Schnitte einer *TNFR*^{-/-} Maus. Die Übersicht und im Speziellen das vergrößerte Bild zeigen, dass sich die neutrophilen Granulozyten hauptsächlich im Bindegewebe aufhalten. Zudem machen diese Aufnahmen sichtbar, dass sich die Granulozyten in der *TNFR*^{-/-} Maus unmittelbar unter dem Epithel



ansammeln. In Abbildung 3.4B ist die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Epithel von WT- und *TNFR*^{-/-} – Mäusen gegenübergestellt. Es ist zu erkennen, dass die Menge der *TNFR*^{-/-} – Granulozyten im Epithel zu derjenigen des Wildtypen signifikant verringert ist.

Weiterhin wurde die Menge von neutrophilen Granulozyten im Urin von WT- (Abbildung 3.4C und 3.4D), *TNFR*^{-/-} – (Abbildung 3.4C) und Chlodronat Liposomen depletierten (CL) (Abbildung 3.4D) Mäusen analysiert. In Abbildung 3.4C und 3.4D ist zu erkennen, dass die Anzahl der *TNFR*^{-/-}- und die der Granulozyten aus CL – depletierten Mäusen zu derjenigen des Wildtypen stark vermindert ist.

Zur Ermittlung der Infektionsstärke wurde zum einen die Bakterienlast (CFU – „colony forming units“) im Urin und zum anderen der Infektionsgrad der CD45 negativen Zellen, die größtenteils Epithelzellen darstellen, ermittelt. Hierzu wurden wiederum WT-, *TNFR*^{-/-}- und CL – Mäuse untersucht. In Abbildung 3.4E und 3.4F ist die Bakterienlast der verschiedenen Mäuse dargestellt. Im Vergleich zu den Wildtypmäusen ist eine starke Reduktion der CFU im Urin von *TNFR*^{-/-}- und CL – zu erkennen. Für die Analyse des

Infektionsgrades der CD45 negativen Blasen­zellen wurden Mäuse zunächst mit GFP exprimierenden UPECs infiziert und im Anschluss der prozentuale Anteil der GFP – positiven Zellen ermittelt (Abbildung 3.4G). Es ist zu erkennen, dass *TNFR*^{-/-}- und Cl depletierte Mäuse ca. 10% mehr GFP positive Zellen als wildtypische Kontrollmäuse aufweisen.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass neutrophile Granulozyten in *TNFR*^{-/-}- und in Cl depletierte Mäusen vor dem Uroepithel akkumulieren und nicht in dieses einwandern können. Aus diesem Grund zeigen diese Mäuse im Vergleich zum Wildtypen eine verstärkte Infektion.

3.5 Phänotypische Analyse von Knochenmarkschimären und von *TNF* α ^{-/-} Mäusen mit transferierten Ly6C⁺ Makrophagen

Um der Frage nachzugehen ob residente Gewebezellen oder hematopoetische Zellen die fehlende Einwanderung der neutrophilen Granulozyten in das Uroepithel bewirken, wurden Knochenmarkschimären generiert. Hierzu wurde das Knochenmark einer wildtypischen Maus durch das Knochenmark einer *TNF* α ^{-/-} oder einer *TNFR*^{-/-} Maus ersetzt. In diesen Chimären sind alle knochenmarksabhängigen Immunzellen, wie neutrophile Granulozyten, Ly6C⁺- und Ly6C⁻ - Makrophagen, unfähig TNF α zu detektieren oder zu produzieren. Als Kontrolle diente eine Wildtypmaus, deren Knochenmark wiederum durch wildtypisches Knochenmark ausgetauscht wurde. Histologische Paraffinschnitte dieser chimären Mäuse, in denen neutrophilen Granulozyten angefärbt wurden, sind in Abbildung 3.5A dargestellt.

In der Histologie der wildtypische Kontrollchimäre ist zu erkennen, dass sich neutrophile Granulozyten im Epithel befinden. Die Histologien der Mäuse mit dem ausgetauschten KO – Knochenmark dagegen zeigen beispielhaft, dass sich die Granulozyten, wie in der *TNFR*^{-/-} Maus (siehe 3.4), unterhalb des Uroepithels aufhalten. Für eine Quantifizierung wurde in mehreren histologischen Schnitten die Anzahl der Granulozyten im Epithel analysiert. Diese sind in Abbildung 3.5B dargestellt. Die Auszählung ergab für die *TNFR*^{-/-}-KM Chimäre eine ca. 75%ige und für die *TNF* α ^{-/-}-KM Chimäre eine ca. 95%ige Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu der Granulozyten-Anzahl im Epithel der Kontroll-Chimäre.

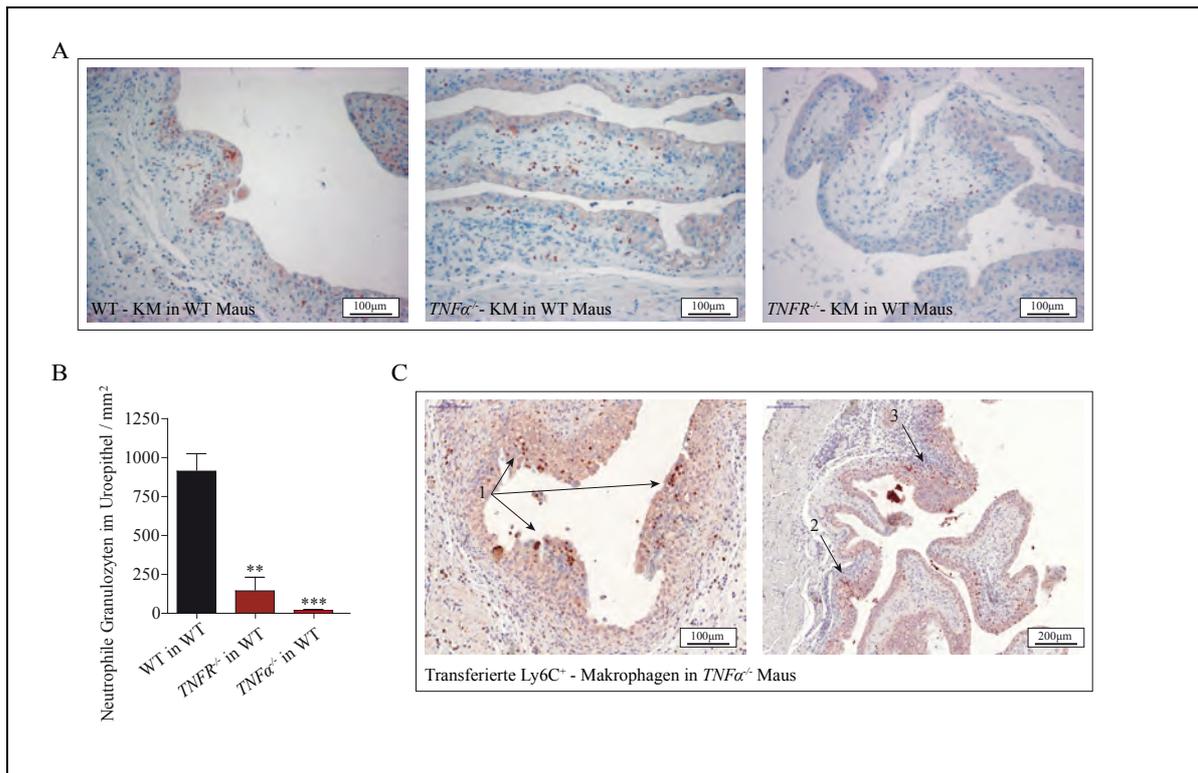


Abbildung 3.5: Hematopoetische Zellen vermitteln den Migrationsdefekt neutrophiler Granulozyten in chimären Mäusen

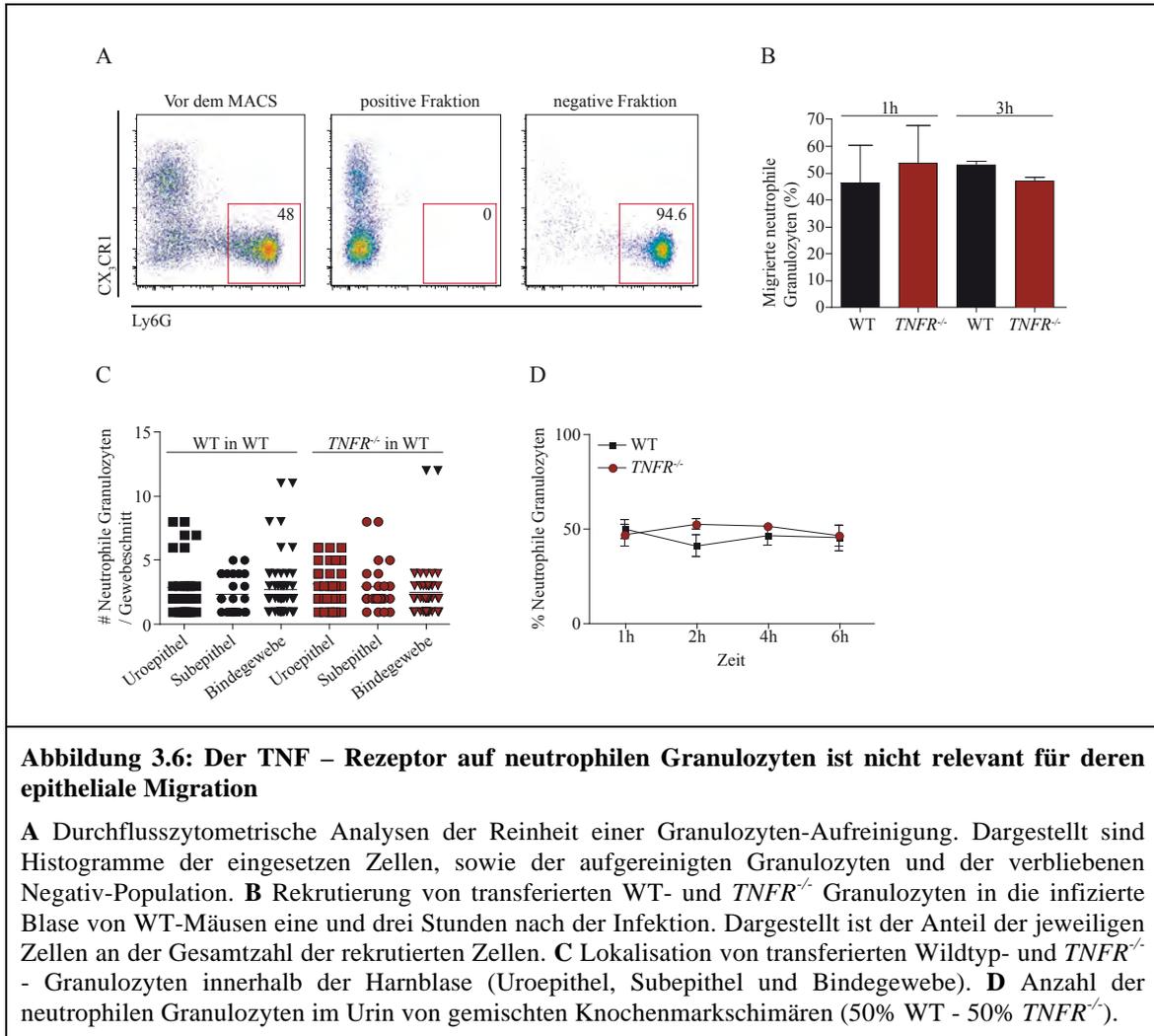
A Ly6G gefärbte Paraffinschnitte von Knochenmarkschimären (WT-KM in WT Maus, TNFα⁻-KM in WT Maus und TNFR⁻-KM in WT Maus) 24h nach der Infektion mit UPECs. **B** Auszählungen der neutrophilen Granulozyten im Uroepithel der Knochenmarkschimären aus **A**. **C** Lage von neutrophilen Granulozyten innerhalb der Blase von TNFα⁻ Mäusen nach Transfer von wildtypischen Ly6C⁺ - Makrophagen.

Des Weiteren wurde der Phänotyp von TNFα⁻ Tieren untersucht, nachdem wildtypische, TNFα produzierende Ly6C⁺ Makrophagen in die Mäuse injiziert wurden. Die Histologie dieser Mäuse ist in Abbildung 3.5C dargestellt und es lässt sich erkennen, dass sich neutrophile Granulozyten im Epithel der Maus finden lassen (Abbildung 3.5C, Pfeil 1,2). Allerdings können auch Bereiche gefunden werden, an denen das Epithel stark infiziert ist und neutrophile Granulozyten sich vor diesem ansammeln (Abbildung 3.5C, Pfeil 3). Während der Zystitis bewirkt somit ein hematopoetischer Zelltyp, Ly6C⁺ Makrophagen, die Akkumulation der Granulozyten unter dem Uroepithel.

3.6 Adaptiver Transfer von neutrophilen Granulozyten

Für den Transfer von neutrophilen Granulozyten in entsprechende Mäuse müssen diese zunächst aus dem Knochenmark einer Spendermaus isoliert und im Anschluss deren Reinheitsgrad überprüft werden. Die Reinheit ist essentiell, da sichergestellt werden muss, dass der entstandene Effekt nach der Injektion der isolierten Zellen nicht durch kontaminierende Zellen hervorgerufen wird. Die Isolation der Zellen erfolgt durch das Neutrophilen-Isolations-Kit, wodurch alle Knochenmarkszellen, die keine Granulozyten darstellen, mittels spezieller Antikörper herausgefiltert werden. In Abbildung 3.6A wurden die einzelnen Fraktionen des Isoliervorgangs mit einem für Granulozyten spezifischen Antikörper (Ly6G) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Da die Spendermaus im hier dargestellten Beispiel eine CX3CR1-GFP⁺-Maus war, befinden sich ebenfalls CX3CR1 positive Zellen im Knochenmark. Vor der Separation der Zellen aus dem Knochenmark sind Neutrophile zusammen mit anderen Ly6G negativen Zellen zu erkennen. Im Anschluss befinden sich in der positiven Fraktion diejenigen Zellen, die mittels unterschiedlicher Antikörper herausfiltriert wurden. Die negative Fraktion beinhaltet lediglich die Granulozyten. Es wird deutlich, dass die negative Fraktion nach der Isolation zu 94% neutrophile Granulozyten enthält und die transferierten Zellen daher eine hohe Reinheit aufweisen.

Um die Rolle des TNF α – Rezeptors auf neutrophilen Granulozyten zu studieren, wurden diverse Transferversuche mit aus dem Knochenmark isolierten Granulozyten durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die Rekrutierung der transferierten Zellen in die infizierte Harnblase analysiert, indem unterschiedlich gefärbte WT- und *TNFR*^{-/-} – Granulozyten gemeinsam und in gleicher Anzahl in eine Wildtypmaus injiziert wurden. Wie in Abbildung 3.6B zu sehen ist, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion die gleiche Menge an WT- und *TNFR*^{-/-} – Granulozyten in die Harnblase rekrutiert. Des Weiteren wurden CFSE markierte *TNFR*^{-/-} - bzw. als Kontrolle WT – Granulozyten einzeln in wildtypische Mäuse transferiert und deren Lage 24 Stunden nach der Infektion innerhalb der Harnblase analysiert. Die Auszählung der Granulozyten ergab, dass WT- und *TNFR*^{-/-} - Zellen in den Gewebeabschnitten Uroepithel, Subepithel und Bindegewebe in vergleichbare Menge vorhanden waren (Abbildung 3.6C).



Im nächsten Schritt wurden gemischte Knochenmarkschimären generiert, deren ausgetauschtes Knochenmark zu 50% aus WT und 50% *TNFR*^{-/-} Zellen bestand. Als Empfänger dienten WT Mäuse, so dass die Harnblasenzellen wildtypischen Ursprungs waren. Nach der Infektion dieser Mäuse wurde der prozentuale Anteil von WT- und *TNFR*^{-/-} – Granulozyten im Urin ermittelt. Aus der Auswertung in Abbildung 3.6D geht hervor, dass die Zellen zu den analysierten Zeitpunkten im Durchschnitt jeweils zu 50% in den Urin eingewandert sind. Es wird deutlich, dass beide TNF α -Rezeptoren weder für die endotheliale, noch für die epitheliale Migration der Granulozyten benötigt werden.

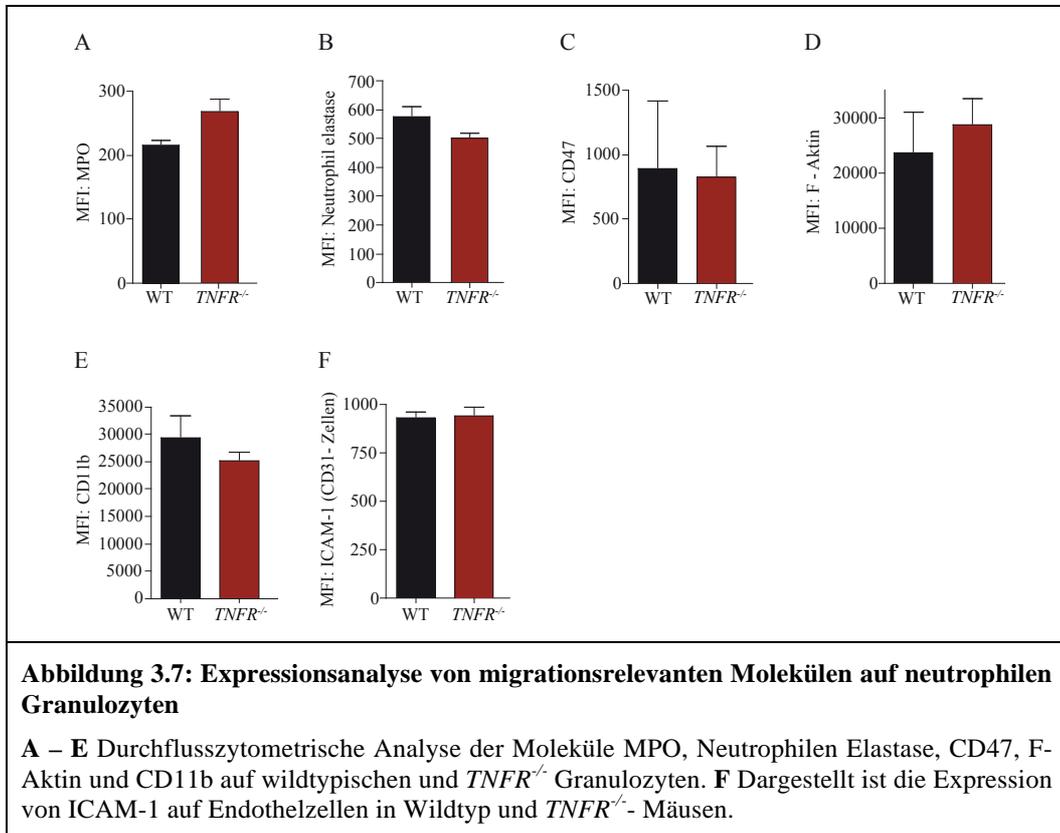
3.7 Analysen der Migrationsmechanismen von neutrophilen Granulozyten

Zur Analyse des beobachteten Migrationsdefektes von neutrophilen Granulozyten in der *TNFR*^{-/-} Maus wurden unterschiedliche Moleküle, die für die Migration dieser Zellen essentiell sind, untersucht. Um einen potenziellen Organschaden oder Defekte in der Eliminierung von phagozytierten Bakterien durch die beiden Proteine Myeloperoxidase (MPO) und der Neutrophilen Elastase (NE) zu überprüfen, wurde deren Expression in neutrophilen Granulozyten in WT- und *TNFR*^{-/-} – Mäusen sechs Stunden nach der gesetzten Infektion analysiert. Wie in Abbildung 3.7A und 3.7B zu erkennen ist, werden diese in beiden Maustypen vergleichbar stark exprimiert. Anschließend wurde die Expression des Membranproteins CD47, das eine wichtige Rolle bei der Freisetzung des intrazellulären Calciums spielt, untersucht. Das so freigesetzte Calcium wiederum ist essenziell für die Modulation des Aktin – Zytosketts und daher für die chemotaktische Wanderung des Granulozyten notwendig. Aus diesem Grund wurde neben der Expression von CD47 zusätzlich die Menge des polymerisierten F-Aktins gemessen. Sechs Stunden nach der Infektion ergaben sich jedoch keine Unterschied in der CD47-Expression bzw. der Polymerisation von F-Aktin in beiden Zelltypen (Abbildung 3.7C und 3.7D).

Des Weiteren wurde die Expression des Integrins CD11b auf neutrophilen Granulozyten und dessen Ligand ICAM-1, der hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert wird, untersucht. Beide Moleküle sind relevant für die Adhäsion von Zellen des innate Immunsystems an Endothelzellen und daher unentbehrlich für die Migration von Granulozyten. Es zeigten sich allerdings keine Unterschiede zwischen der WT- und der *TNFR*^{-/-} - Maus hinsichtlich der Expression von CD11b und ICAM (Abbildung 3.7E und 3.7F).

Um die Ursache für den Migrationsdefekt der *TNFR*^{-/-} Granulozyten festzustellen, wurde zusätzlich die Konzentrationen der Zytokine GM-CSF, INF γ , IL1, IL4, IL5, IL6, IL10, IL17 und der Chemokine CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7 innerhalb der Harnblase von uninfizierten und infizierten WT bzw. *TNFR*^{-/-} Mäusen ermittelt. Wie in Abbildung 3.8A-M dargestellt, lassen sich jedoch zwischen den beiden Maustypen vor und nach der Infektion von sechs Stunden keine Unterschiede ermitteln. Eine Ausnahme stellt das Zytokin IL10 dar, dessen Produktion in der *TNFR*^{-/-} Maus im Vergleich zur WT Maus signifikant erhöht ist. Es konnten somit keine Unterschiede in der Expression von MPO, NE, CD47, F-Aktin, CD11b, ICAM-1, GM-CSF, INF γ , IL1, IL4, IL5, IL6, IL10, IL17,

CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 und CCL7 zwischen Wildtyp- und *TNFR*^{-/-} - Mäusen identifiziert werden.



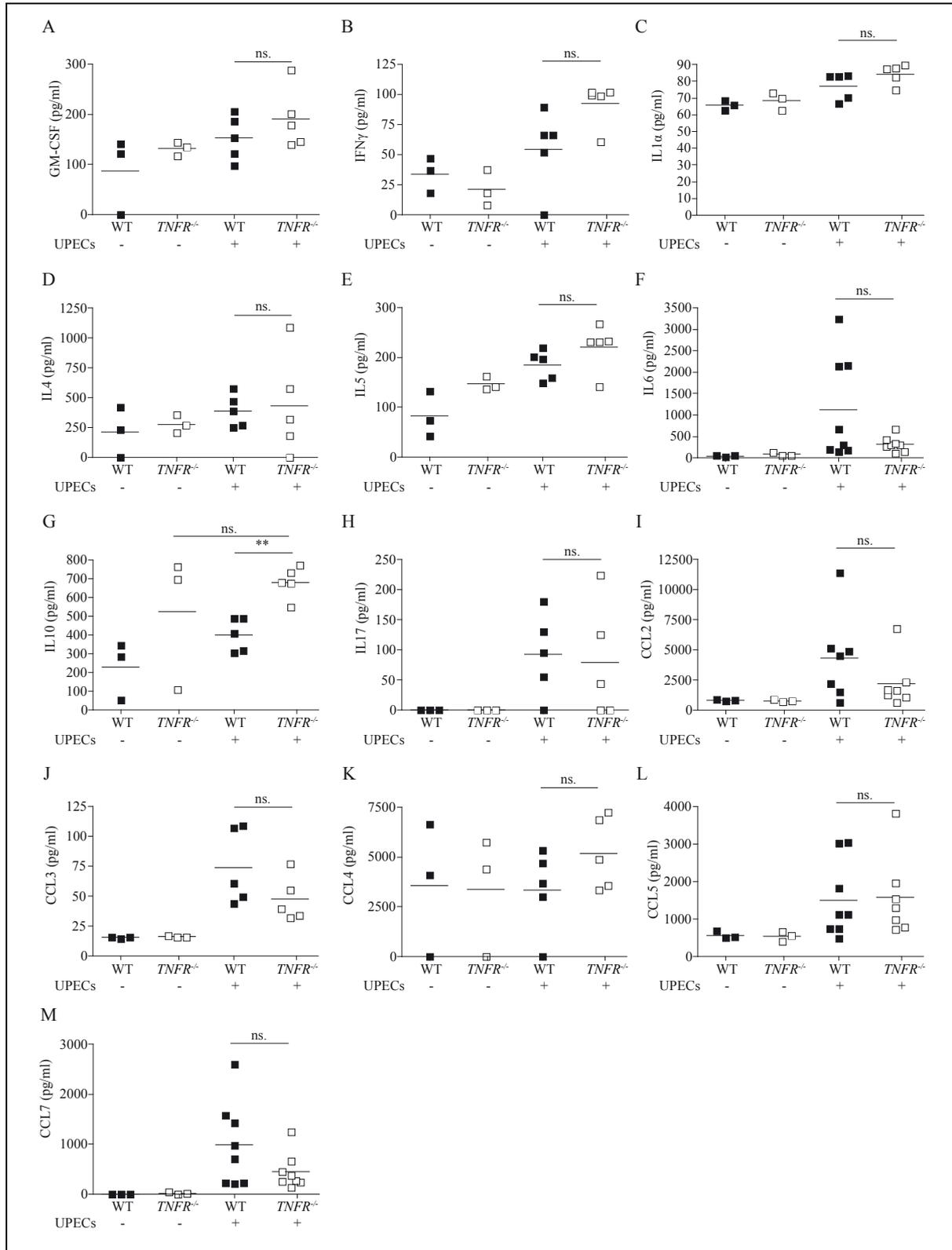


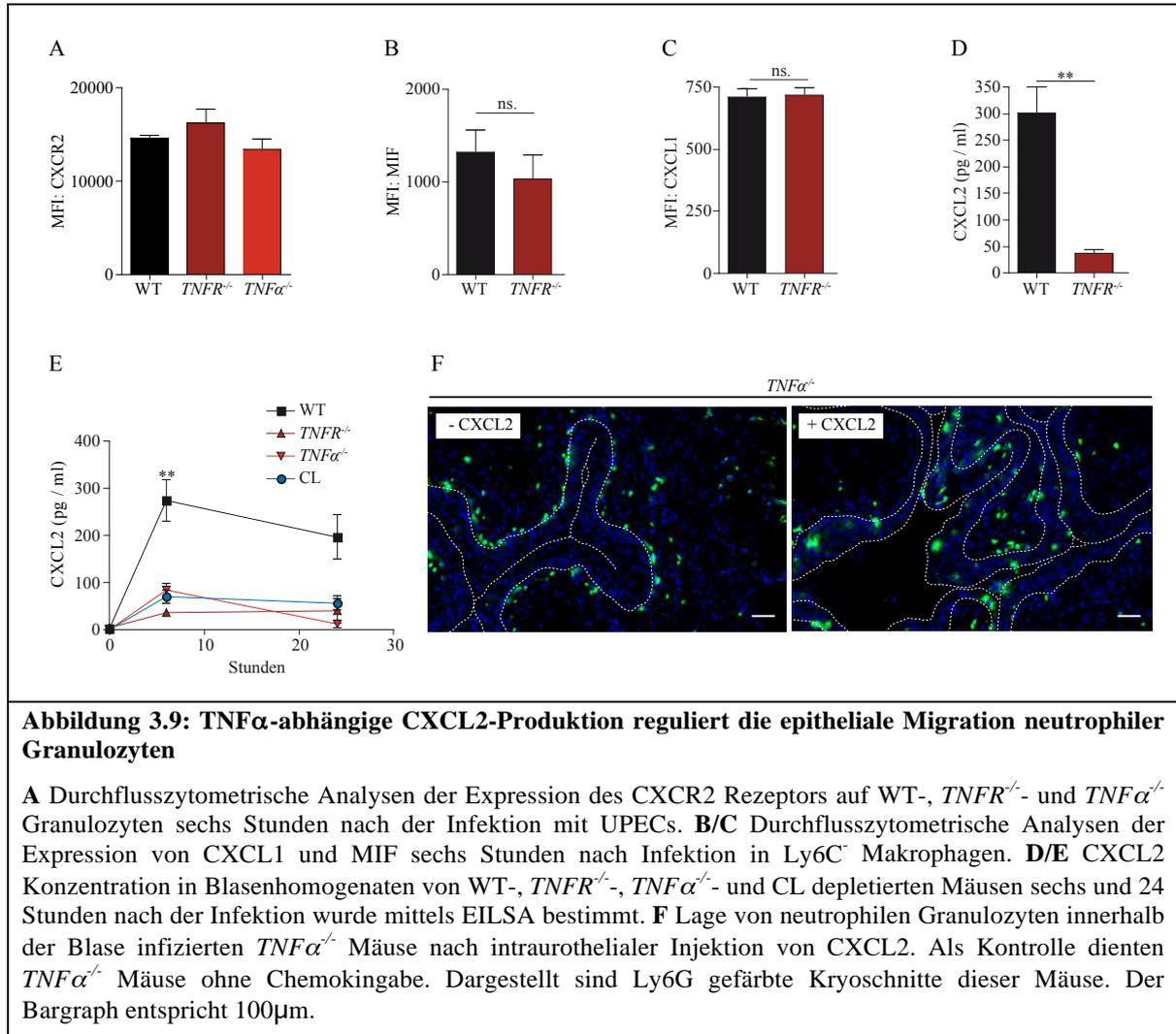
Abbildung 3.8: Chemokin- und Zytokin – Produktion in Wildtyp und *TNFR*^{-/-} Mäusen

A – M Konzentration von GM-CSF, IFN γ , IL1 α , IL4, IL5, IL6, IL10, IL17, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 sowie CCL7 in Blasenhomogenaten von un- und infizierten Wildtyp und *TNFR*^{-/-} Mäusen.

3.8 TNF α – abhängige CXCL2 – Sekretion ermöglicht die epitheliale Migration von TNF α -KO Granulozyten

Für die gerichtete Migration von neutrophilen Granulozyten sind Chemokinrezeptoren und deren Liganden zwingend erforderlich. Wie bereits erwähnt, ist einer der bedeutsamsten Chemokinrezeptoren von Granulozyten der CXCR2-Rezeptor. Folglich wurde die Expression dieses Rezeptors auf WT-, *TNFR*^{-/-}- und *TNF α* ^{-/-} – Granulozyten während der Zystitis analysiert. In Abbildung 3.9A ist die Expression des CXCR2-Rezeptors sechs Stunden nach Beginn der Infektion dargestellt. Die Daten machen deutlich, dass keine Unterschiede in der Expression des Rezeptors zwischen den drei untersuchten Granulozytentypen existieren. Infolgedessen wurde das Vorkommen der CXCR2 – Liganden MIF, CXCL1 und CXCL2 ebenfalls sechs Stunden nach der Infektion untersucht. Zwischen WT- und *TNFR*^{-/-} – Mäusen zeigten sich keine Differenzen in der Expression von MIF und CXCL1 (Abbildung 3.9B und 3.9C), die Menge des Chemokins CXCL2 hingegen war in *TNFR*^{-/-} Mäusen signifikant reduziert (Abbildung 3.9E). In weiteren Analysen wurde die CXCL2 – Konzentration nach einer Infektionsdauer von 0, 6 und 24 Stunden in Blasenhomogenaten beider Maustypen gemessen (Abbildung 3.9E). Die Daten machen deutlich, dass die CXCL2 – Konzentration in der wildtypischen Maus nach sechs Stunden drastisch ansteigt und nach 24 Stunden wieder leicht absinkt. Die CXCL2 – Konzentration in der *TNFR*^{-/-} Maus dagegen steigt nach der Infektion nur minimal an und verändert sich im Laufe der Zeit nur geringfügig. Gleichzeitig wird deutlich, dass zu beiden Zeitpunkten die CXCL2 – Produktion in der *TNFR*^{-/-} Maus, im Vergleich zur wildtypischen Maus, signifikant verringert ist.

Zusätzlich wurde die CXCL2 – Konzentration in *TNF α* ^{-/-} - und in CL depletierten Wildtyp – Mäusen bestimmt. In beiden Fällen wird in der infizierten Harnblase kein TNF α produziert, da es prinzipiell nicht exprimiert wird (*TNF α* ^{-/-}) oder die TNF α – produzierenden Makrophagen depletiert wurden (CL). Wie in Abbildung 3.9E zu sehen ist, wird ebenfalls in *TNF α* ^{-/-}- und CL – Mäusen nach sechs und 24 Stunden kein bis wenig CXCL2 produziert. Zusammenfassend kann daher angenommen werden, dass alle Maustypen, die nicht in der Lage sind TNF α zu detektieren oder zu produzieren, gleichzeitig einen Defekt in der CXCL2 Produktion aufweisen.



Vor diesem Hintergrund wurde das Fehlen von CXCL2 als potentielle Ursache für das Unvermögen der Granulozyten in das Epithel einzuwandern, angesehen. Um die Rolle dieses Chemokins für die Granulozytenmigration genauer zu analysieren, wurde CXCL2 in das Lumen einer 24 Stunden zuvor infizierte *TNF α* ^{-/-} Maus injiziert und die Migration der Granulozyten in das Epithel untersucht. Als Kontrolle diente eine infizierte *TNF α* ^{-/-} Maus, die weder TNF α noch CXCL2 exprimiert und der kein CXCL2 injiziert wurde.

Harnblasenschnitte dieser Mäuse, die mit dem Granulozytenmarker Ly6G und dem Zellkernmarker DAPI angefärbt wurden, sind in Abbildung 3.9F dargestellt. Die gestrichelte Linie in den Abbildungen verdeutlicht die Grenze des Epithels. Links ist die Histologie der *TNF α* ^{-/-} Kontrollmaus dargestellt. Wie bereits in Histologieschnitten von Harnblasen aus *TNFR*^{-/-} Mäusen zu sehen war (siehe 3.4), befinden sich ebenfalls in der *TNF α* ^{-/-} Maus keine neutrophilen Granulozyten im Uroepithel. Die Zellen befinden sich im

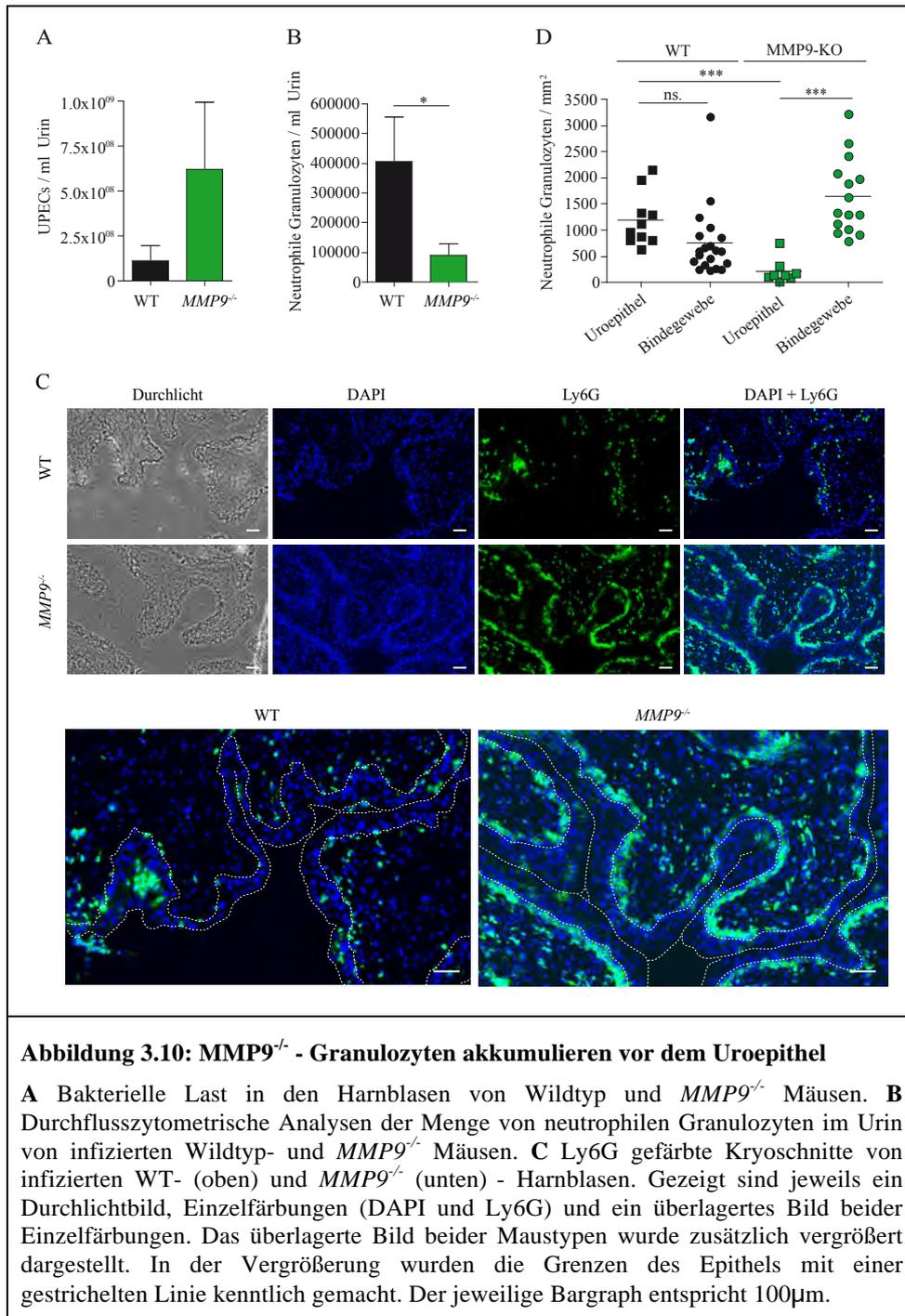
Bindegewebe und sammeln sich an der Grenze zum Epithel an. Die Histologie rechts zeigt die Situation in der Harnblase nach der Injektion von CXCL2 ins Blasenlumen. Es ist deutlich zu erkennen, dass neutrophile Granulozyten nach der Applikation von CXCL2 in das Epithel der Harnblase eingewandert sind. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein fehlendes TNF α -Signal zu einer ausbleibenden CXCL2-Expression führt und dass das CXCL2 die Migration von Granulozyten in das Uroepithel ermöglicht.

3.9 Phänotyp der *MMP9*^{-/-} Maus

Die Analyse der Histologien von den infizierten Harnblasen der *TNFR*^{-/-}- bzw. der *TNF α* ^{-/-} – Maus zeigen eine Ansammlung von neutrophilen Granulozyten unmittelbar unter dem Blasenepithel. Bevor Granulozyten in das Epithel einwandern können, müssen diese zunächst die Basalmembran durchqueren. Bei der Degradation dieser Membran spielen Proteasen, wie beispielsweise die Metallomatrixprotease 9 (MMP9), eine bedeutsame Rolle. Folglich wurden im nächsten Schritt *MMP9*^{-/-} Mäuse infiziert und deren Phänotyp bezüglich der Infektionsstärke, der Einwanderung von Granulozyten in den Urin und deren Lage im Harnblasengewebe untersucht.

Eine Gegenüberstellung der Bakterienmenge pro Milliliter Urin von WT und *MMP9*^{-/-} – Mäusen, sechs Stunden nach der Infektion, ist in Abbildung 3.10A dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass *MMP9*^{-/-} Mäuse eine höhere bakterielle Last als wildtypische Mäuse aufweisen. Des Weiteren wurde die Menge an neutrophilen Granulozyten im Urin von WT- und *TNFR*^{-/-} – Mäusen analysiert. Die Auszählung der Zellmenge zeigt, dass die Anzahl der *MMP9*^{-/-} Granulozyten zu derjenigen des Wildtypen sechs Stunden nach der Infektion signifikant reduziert ist (Abbildung 3.10B).

Um die Lage der neutrophilen Granulozyten im Gewebe zu ermitteln, wurden Kryoschnitte von infizierten WT- und *MMP9*^{-/-} – Mäusen hergestellt und die Granulozyten mittels des Antikörpers Ly6G angefärbt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hilfe des Farbstoffes DAPI gefärbt. In Abbildung 3.10C sind ein Durchlichtbild, Einzelfärbungen und das überlagerte Bild beider Einzelfärbungen dargestellt. Ein Ausschnitt der überlagerten Bilder beider Maustypen wurde vergrößert und der Bereich des Epithel mit Hilfe einer gestrichelten Linie kenntlich gemacht. Die Bilder der wildtypischen Maus zeigen, dass sich neutrophile Granulozyten sowohl im Bindegewebe als auch im Epithel befinden. In der *MMP9*^{-/-} Maus dagegen finden sich Granulozyten lediglich im Bindegewebe, die sich



zudem an der Grenze zum Epithel ansammeln. In Abbildung 3.10D ist die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Uroepithel und im Bindegewebe der WT- und $MMP9^{-/-}$ -Mäuse dargestellt. In wildtypischen Mäusen finden sich mehr neutrophile Granulozyten im Epithel als im Bindegewebe. In $MMP9^{-/-}$ Mäusen dagegen sind die meisten Zellen im Bindegewebe zu detektieren. Auch absolut befinden sich weniger Granulozyten im Epithel von $MMP9^{-/-}$ - als von Wildtyp – Mäusen. Die Histologie der $MMP9^{-/-}$ Maus zeigt einen

identischen Phänotyp bezüglich der Granulozyten-Lokalisation wie die *TNFR*^{-/-} (siehe 3.4) und der *TNFα*^{-/-} (siehe 3.8) – Maus. Daher scheint MMP9 bei der epithelialen Migration von neutrophilen Granulozyten beteiligt zu sein.

3.10 Autokrin produziertes MMP9 reguliert die epitheliale Migration von neutrophilen Granulozyten

Der starke Phänotyp hinsichtlich der Position der neutrophilen Granulozyten im Blasengewebe von *MMP9*^{-/-} Mäusen, ließ die Frage aufkommen, welche Immunzellen während der Zystitis die Hauptproduzenten der Protease MMP9 sind. Durchflußzytometrische Untersuchungen zeigten, dass in der wildtypischen Maus zu ca. 90% neutrophile Granulozyten diese Protease herstellen (Abbildung 3.11A). Um festzustellen, ob das von den Granulozyten produzierte MMP9 tatsächlich für die Migration der Zellen in das Uroepithel verantwortlich ist, wurden wildtypische, MMP9 exprimierende neutrophile Granulozyten isoliert und in infizierte *MMP9*^{-/-} Mäuse transferiert. In diesem Fall können ausschließlich die transferierten Granulozyten die Protease MMP9 herstellen, endogene Zellen dagegen nicht. In Abbildung 3.11C ist die Histologie einer solchen Maus dargestellt, die zusätzlich mit einem Ly6G – Antikörper gefärbt wurde. Daher erscheinen die injizierten, CFSE gefärbten Granulozyten in grün/gelb und die endogenen Granulozyten, aufgrund der Antikörperfärbung, rot. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hilfe des Farbstoffes DAPI gefärbt. Das Durchlichtbild, die Einzelfärbungen und das überlagerte Bild sind in Abbildung 3.11C wiedergegeben. Zusätzlich wurde ein Ausschnitt des überlagerten Bildes vergrößert und der Bereich des Uroepithels mit Hilfe einer gestrichelten Linie kenntlich gemacht. Die transferierten, wildtypischen neutrophilen Granulozyten sind im Uroepithel lokalisiert, während sich die endogenen Granulozyten, wie bereits in der *MMP9*^{-/-} Maus (siehe 3.9), im Bindegewebe direkt unter dem Uroepithel befinden.

Um potentielle Unterschiede in der Expression der Protease MMP9 zu detektieren, wurden infizierte WT- und *TNFR*^{-/-} – Granulozyten innerhalb der Harnblase hinsichtlich der MMP9-Produktion durchflußzytometrisch untersucht. In Abbildung 3.11A und 3.11B ist zu erkennen, dass MMP9 in beiden Zellen in vergleichbaren Mengen produziert wird. Zusätzlich wurde die Gesamtmenge von MMP9 im Blasenhomogenat von uninfizierten

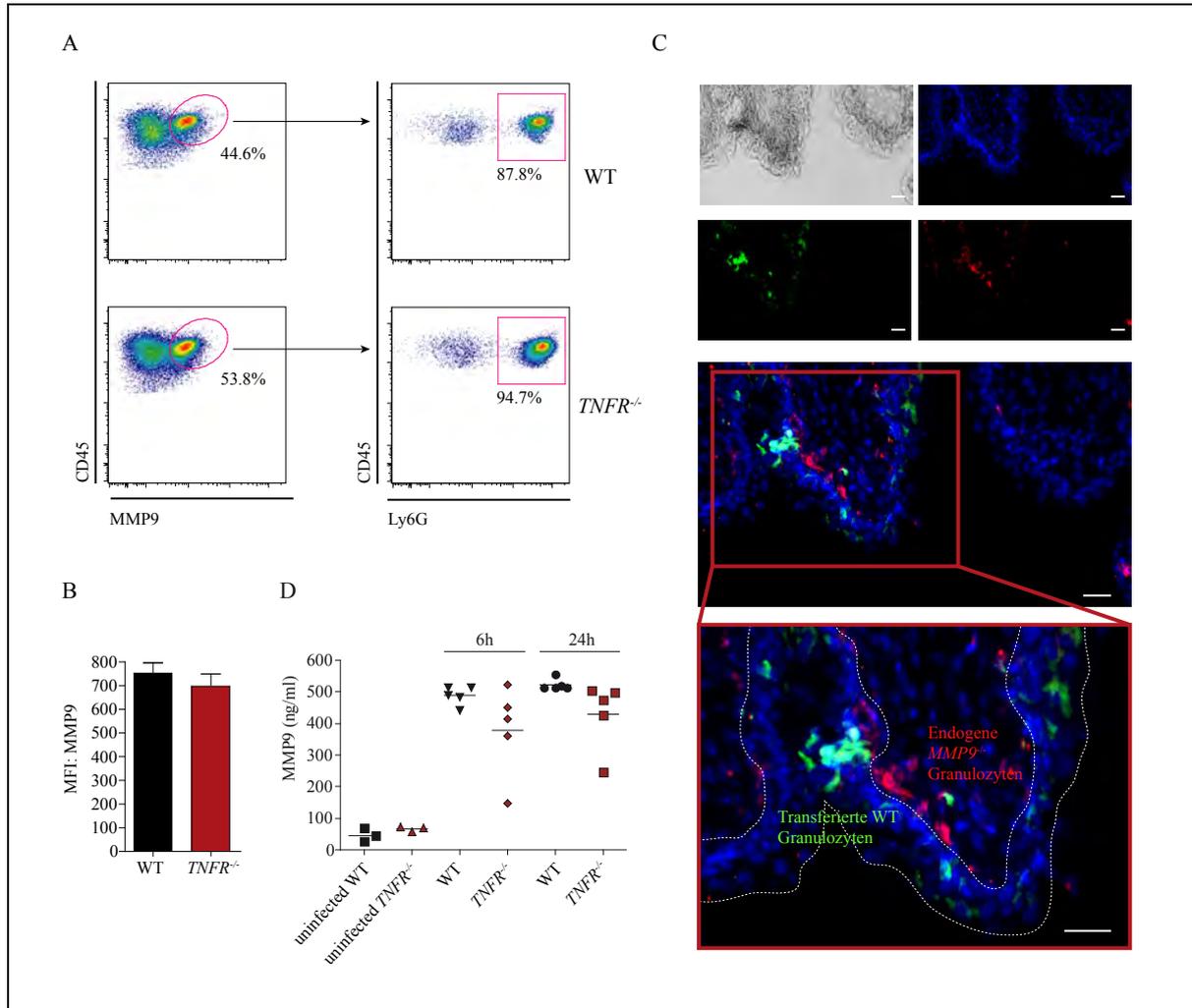


Abbildung 3.11: Autokrin produziertes MMP9 reguliert die epitheliale Migration von neutrophilen Granulozyten

A/B Durchflusszytometrischer Analysen der MMP9-Produktion in infizierten Harnblasen. In **A** sind exemplarisch Durchflusszytometrische – Analysen von WT- und *TNFR*^{-/-} - Mäusen und in **B** die entsprechenden MMP9-MFI dargestellt. **C** Konzentration der Protease MMP9 in Blasenhomogenaten von un- und infizierten WT und *TNFR*^{-/-} - Mäusen wurden mittels eines ELISAs ermittelt. **C** CFSE-gefärbte wildtypische Granulozyten wurden in infizierte *MMP9*^{-/-} Mäusen transferiert und deren Position innerhalb der Blase in Ly6G gefärbten Kryoschnitten analysiert. Dargestellt sind ein Durchlichtbild, Einzelfärbungen (DAPI und Ly6G) und das überlagerte Bild beider Einzelfärbungen. Die Grenzen des Uroepithels sind mit einer gestrichelten Linie verdeutlicht. Zusätzlich wurde ein Ausschnitt aus dem überlagerten Bild vergrößert. Der Bargraph entspricht 100µm.

und infizierten (6h und 24h nach der Infektion) WT bzw. *TNFR*^{-/-} Mäusen bestimmt. In den infizierten *TNFR*^{-/-} Mäusen ist lediglich eine kleine Reduktion in der produzierten Menge von MMP9 im Vergleich zu derjenigen des Wildtypen zu detektieren. Zusätzlich wird deutlich, dass die MMP9-Produktion in der Infektion eine besondere Rolle zu spielen scheint, da die diese nach der Harnblaseninfektion um das 4-5fache ansteigt.

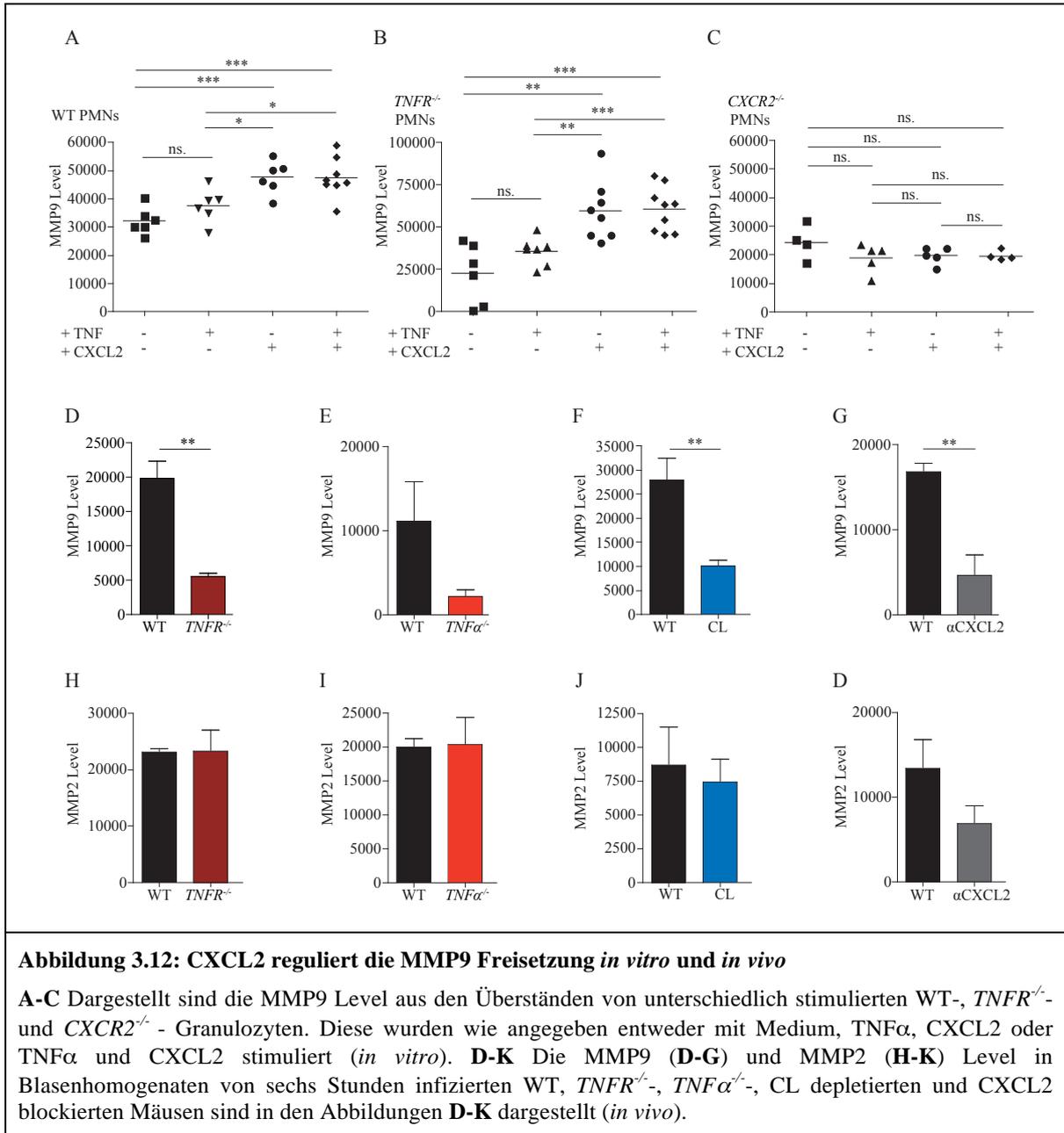
Somit kann zusammenfassend dargestellt werden, dass die epitheliale Granulozytenmigration von dem MMP9 abhängig ist, dass neutrophile Granulozyten selbst produzieren.

3.11 Die Aktivität von MMP9, aber nicht von MMP2, wird *in vitro* und *in vivo* von TNF α reguliert

Metallomatrixproteasen, wie MMP9, werden als inaktive Pro-Form sekretiert und im extrazellulären Raum wiederum von verschiedenen Proteasen in einen aktiven Zustand gespalten. Der hier verwendete ELISA zur Messung der MMP9-Konzentration im Blasenhomogenat der Maus, detektiert sowohl die inaktive als auch die aktive Form von MMP9. Aus diesem Grund wurde die katalytische Aktivität der MMP9 – Protease mit Hilfe eines Gelatine – Zymograms gemessen.

Um zu analysieren, ob das Zytokin TNF α oder das Chemokin CXCL2 eine Auswirkung auf die katalytische Aktivität von MMP9 haben, wurden neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark von WT-, *TNFR*^{-/-}- und *CXCR2*^{-/-} – Mäusen isoliert und diese für vier Stunden *in vitro* mit TNF α , CXCL2, TNF α und CXCL2 oder als Kontrolle mit Medium inkubiert. Die Ergebnisse der katalytischen Aktivitätsmessung von MMP9 im Überstand der verschiedenen Kulturen sind in Abbildung 3.12A (WT Granulozyten), 3.12B (*TNFR*^{-/-} Granulozyten) und 3.12C (*CXCR2*^{-/-} Granulozyten) dargestellt. Die MMP9-Level der wildtypischen Granulozyten, die sowohl TNF α als auch CXCL2 detektieren können, zeigen nach der TNF α - Stimulation einen leicht erhöhten Anstieg im Vergleich zu Granulozyten, die lediglich mit Medium inkubiert wurden. Durch den Vergleich dieser beiden Gruppen mit dem MMP9-Level der Granulozyten, die mit dem Chemokin CXCL2 stimuliert wurden, wird deutlich, dass die größte katalytische Aktivität der Protease durch CXCL2 gemessen werden konnte. Eine Inkubation der Granulozyten mit CXCL2 und TNF α zusammen resultiert nicht in einem synergistischen Effekt.

Die Messung der katalytischen MMP9-Aktivität in den Überständen von *TNFR*^{-/-} Granulozyten, die ausschließlich CXCL2 und nicht TNF α detektieren können, zeigt vergleichbare Resultate: Im Vergleich zur Kontrolle ist eine leichte Erhöhung der MMP9-Level nach TNF α - Stimulation zu beobachten, während die Level nach der Stimulation mit CXCL2 allein und in der Kombination mit TNF α am höchsten ansteigen.



Die MMP9-Level in den Überständen von *CXCR2*^{-/-} Granulozyten, die allein das Zytokin TNFα und nicht das Chemokin CXCL2 wahrnehmen können, zeigen im Vergleich zur Kontrolle in keinem der angewandten Versuchsansätze eine veränderte katalytische Aktivität.

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe der gleichen Technik die MMP9-Level sechs Stunden nach der Infektion in Blasenhomogenaten von WT-, *TNFR*^{-/-}, *TNFα*^{-/-} und CL - depletierten Wildtyp – Mäusen gemessen. Zusätzlich wurde mit Hilfe eines blockierenden Antikörpers das Chemokin CXCL2 in wildtypischen Mäusen inhibiert und die aktive MMP9-Menge analysiert. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den Abbildungen

3.12D – G (3.12D *TNFR*^{-/-} Mäuse, 3.12E *TNF* α ^{-/-} Mäuse, 3.12F Chlodronat depletierte WT Mäuse und 3.12G CXCL2 blockierte WT Mäuse) dargestellt. Daher wird deutlich, dass die MMP9-Level in der Harnblase von *TNFR*^{-/-}, *TNF* α ^{-/-}, mit CL depletierten oder mit Antikörpern blockierten Mäusen, zu denen des Wildtypen signifikant reduziert sind.

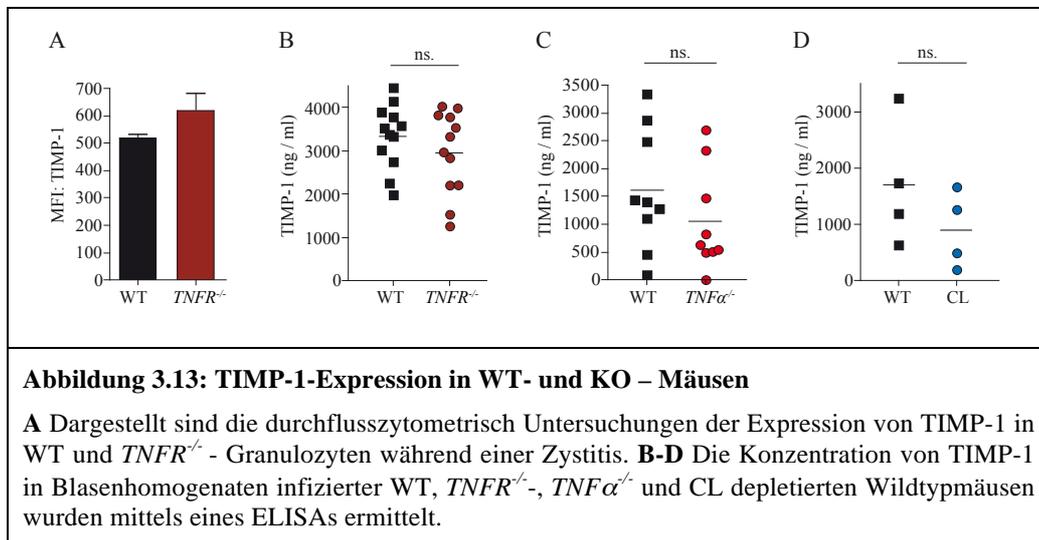
Neben der Messung der MMP9-Level war es mit Hilfe des Zymogrammes ebenfalls möglich, die Menge der Protease MMP2 zu messen. Hierzu wurden wie zuvor die Blasenhomogenate der oben genannten Mäuse untersucht. Die entsprechenden MMP2-Level sind in Abbildung 3.12A – D dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich sechs Stunden nach der Harnblaseninfektion keine Unterschiede zwischen den *TNFR*^{-/-}, den *TNF* α ^{-/-}, CL- und den WT Mäusen ergeben. Des Weiteren sind zwischen den MMP2-Level der wildtypischen und der CXCL2-blockierten Maus ebenfalls keine Unterschiede zu erkennen. Folglich lassen sich Unterschiede in der katalytischen Aktivität von MMP9, aber nicht von MMP2 detektieren.

Somit kann aufgezeigt werden, dass das Chemokin CXCL2 und nicht TNF α die Sekretion von MMP9 aus den Granula der neutrophilen Granulozyten induziert. Weiterhin scheint MMP2, im Gegensatz zu MMP9, keine Rolle in der epithelialen Migration von Granulozyten zu spielen.

3.12 TIMP-1: Einer der natürlichen Inhibitoren von Metallomatrixproteasen

Die natürlich vorkommenden Inhibitoren von Metallomatrixproteasen sind so genannte TIMPs („tissue inhibitors of metalloproteinases“). Für die Inhibition der Protease MMP9 spielt TIMP-1 eine besondere Rolle, da beide Moleküle einen Komplex bilden können, der im Anschluss die Proteasefunktion von MMP9 hemmen kann. Aufgrund dessen wurde die Expression von TIMP-1 in WT und *TNFR*^{-/-} Granulozyten während einer Zystitis durchflusszytometrisch analysiert. In Abbildung 3.13A sind die MFIs des TIMP-1 Signals beider Granulozytentypen gegenübergestellt. Sechs Stunden nach der Harnblaseninfektion mit UPECs ist eine im Vergleich zum Wildtypen minimale Erhöhung des TIMP-1 – Signals in den *TNFR*^{-/-} Granulozyten zu erkennen. Des Weiteren wurde die Gesamtmenge des TIMP-1 Moleküles im Blasenhomogenat von sechs Stunden infizierten WT, *TNFR*^{-/-}, *TNF* α ^{-/-} und CL depletierten – Mäusen bestimmt, die entsprechenden Daten sind in Abbildung 3.13B – D dargestellt. In den Abbildungen 3.13B bis 3.13D ist zu erkennen, dass keine signifikanten Unterschiede in der detektierbaren TIMP-1 – Menge zwischen den

WT Mäusen, den $TNFR^{-/-}$, $TNF\alpha^{-/-}$ und den mit CL depletierten Tieren existieren. Aus diesem Grund, scheint TIMP-1 keine Auswirkungen auf die MMP9 abhängige epitheliale Migration von Granulozyten zu haben.



3.13 Analyse von direkten $TNF\alpha$ - Effekten auf neutrophile Granulozyten *in vitro*

Neutrophile Granulozyten exprimieren die $TNF\alpha$ – Rezeptoren 1 und 2, daher stellte sich die Frage, ob die Bindung von $TNF\alpha$ an den TNFR von Granulozyten Auswirkungen auf die Migration der Zellen hat. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden an Knochenmarks Granulozyten *in vitro* chemotaktische Untersuchungen mit Hilfe von Transwell – und 3D-Kollagen-Chemotaxis – Methoden durchgeführt.

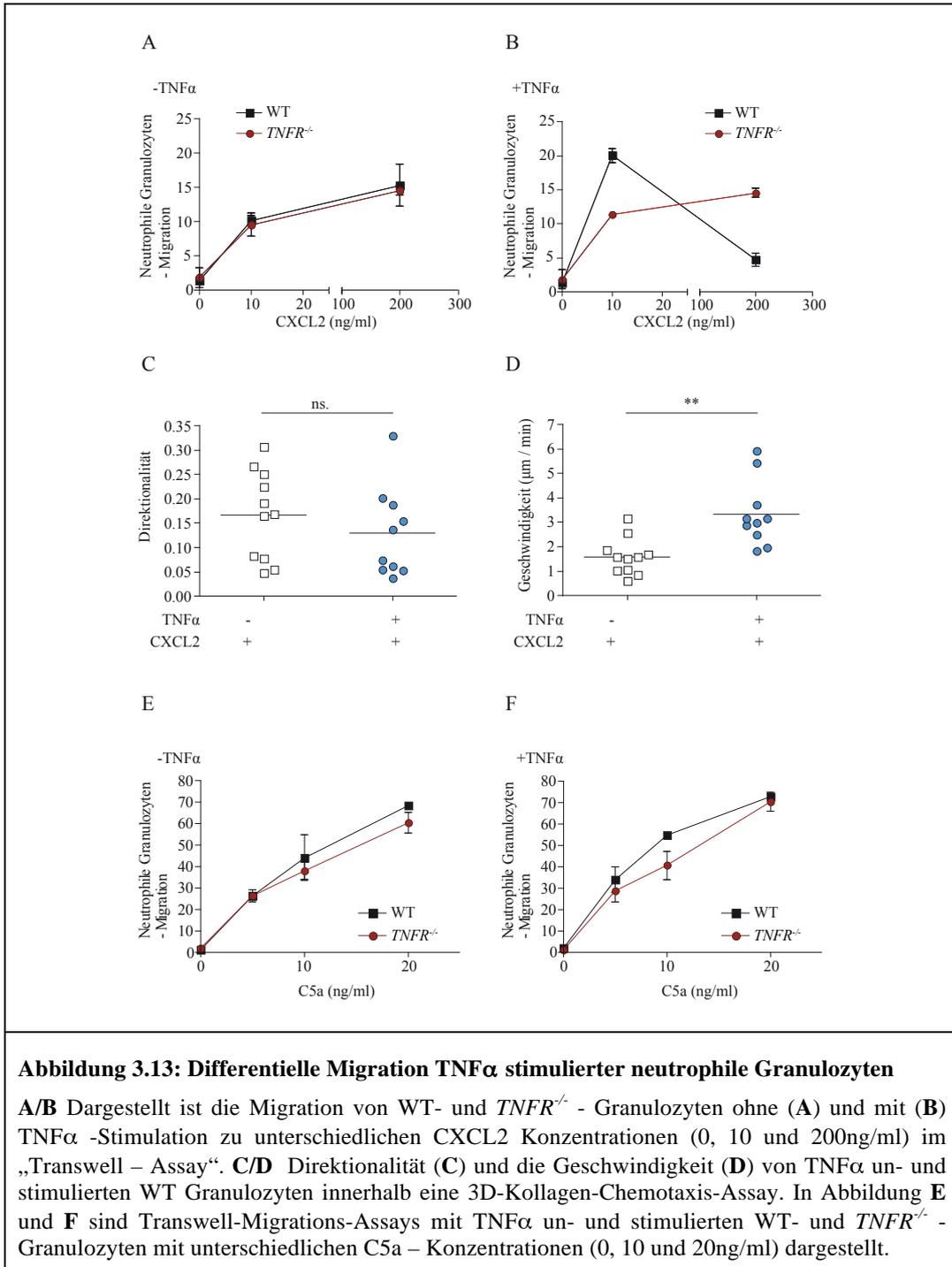
In „Transwell“ – Versuchen wurden neutrophile Granulozyten von WT- und $TNFR^{-/-}$ – Mäusen unstimuliert (Abbildung 3.14A) oder mit $TNF\alpha$ (Abbildung 3.14A) stimuliert, in die obere Kammer eines „Transwells“ gegeben und deren Migration in die untere Kammer bei unterschiedlichen CXCL2 – Konzentrationen (0, 10 und 200ng/ml) analysiert. Im un- bzw. stimulierten Zustand und ohne Chemokinstimulus wandern lediglich 1-2% der Granulozyten beider Zelltypen (WT und $TNFR^{-/-}$) in die untere Kammer (Abbildung 3.14A und 14B). Nach Zugabe des Chemokins ist eine ähnliche Einwanderung von unstimulierten WT- und $TNFR^{-/-}$ – Granulozyten in die untere Kammer zu beobachten: Bei einer Chemokinkonzentration von 10ng/ml wandern ca. 10% und bei einer CXCL2-

Konzentration von 200ng/ml ca. 15% der WT- und *TNFR*^{-/-} – Granulozyten in die untere Kammer ein (Abbildung 3.14A).

Nach der Stimulation der Granulozyten mit TNF α hingegen, wandern bei einer CXCL2-Konzentration von 10ng/ml ca. 20% der wildtypischen Granulozyten und nur ca. 10% der *TNFR*^{-/-} Granulozyten ein. Bei dieser Chemokinkonzentration wandern daher doppelt so viele WT- wie *TNFR*^{-/-} Granulozyten. Durch die Erhöhung der CXCL2-Konzentration auf 200ng/ml wandern nun ca. 15% der *TNFR*^{-/-}- und lediglich 4-5% der WT – Granulozyten in die unteren Kammer. Die Migration der stimulierten *TNFR*^{-/-}Granulozyten entspricht in etwa derjenigen der unstimulierten WT- und *TNFR*^{-/-} – Granulozyten und zwar für beide CXCL2-Konzentrationen. Das Migrationsverhalten der stimulierten WT Granulozyten dagegen unterscheidet sich gravierend von demjenigen der unstimulierten Granulozyten.

Im nächsten Schritt konnte mittels der 3D-Kollagen-Chemotaxis-Methode die Direktionalität der gewanderten Granulozyten in Richtung des Chemokins CXCL2 und deren Migrationsgeschwindigkeit dargestellt werden. Aufgrund des unterschiedlichen Migrationsverhaltens von unstimulierten und TNF α behandelten WT Granulozyten bei einer CXCL2 – Konzentration von 10ng/ml (Abbildung 3.14A und 3.14B), wurde zunächst diese Gruppe analysiert. In Abbildung 3.14C ist zu erkennen, dass die Direktionalität der gewanderten Zellen unabhängig vom TNF α -Stimulus ist, da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der unstimulierten und der TNF α behandelten Gruppe ergaben. Die Analyse der durchschnittlichen Geschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten zeigt dagegen, dass Granulozyten, die mit TNF α -stimuliert wurden, signifikant schneller migrieren als unstimulierte Zellen (Abbildung 3.14D).

Um festzustellen, ob dieses Migrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten nach der Stimulation mit TNF α allgemein gültig ist oder nur im Zusammenhang mit dem Chemokin CXCL2 von Bedeutung ist, wurde ebenfalls das Chemoattraktant C5a mittels der „Transwell-Methode“ untersucht. Hierzu wurden WT- und *TNFR*^{-/-} – Granulozyten mit oder ohne TNF α stimuliert und deren Migration bei unterschiedlichen C5A-Konzentrationen (0, 10 und 20ng/ml) analysiert. In Abbildung 3.14E und 3.14F ist zu sehen, dass unstimulierte bzw. TNF α behandelte WT- und *TNFR*^{-/-} – Granulozyten bei allen C5a – Konzentrationen ähnlich migrieren: Ohne Chemokin wandern in etwa 2% der Zellen, nach der Zugabe des Chemoattraktants mit einer Konzentration von 10ng/ml wandern ca. 30% und bei einer C5a – Konzentration von 200ng/ml wandern ca. 60-70% aller Zellen. Die Daten machen somit deutlich, dass die Granulozytenmigration mit



zunehmender C5a – Konzentration stetig ansteigt und nicht durch die Zugabe von TNF α verändert wird.

Des Weiteren wird deutlich, dass bei niedrigeren C5a – Konzentrationen prozentual mehr Granulozyten migrieren als es bei dem Chemokin CXCL2 der Fall ist (Abbildung 3.14A, 3.14B, 3.14E und 3.14F).

Es konnte nun ermittelt werden, dass TNF α stimulierte Granulozyten bei niedrigen CXCL2 Konzentrationen besser als unstimulierte oder *TNFR*^{-/-} Zellen migrieren und bei hohen Chemokinkonzentrationen dagegen schlechter wandern. Des Weiteren wurde demonstriert, dass nicht die Direktionalität, sondern die Geschwindigkeit durch TNF α beeinflusst wird. Zudem kommt dieser TNF α -Effekt nur in Kombination mit CXCL2 und nicht mit C5a vor.

4 Diskussion

4.1 Neutrophile Granulozyten, Ly6C⁻- und Ly6C⁺- Makrophagen besitzen unterschiedliche Funktionen während der Zystitis

Die Induktion einer Zystitis mittels uropathogener *E.coli* in Mäusen hat zur Folge, dass Immunzellen aus dem Blutkreislauf in die Harnblase einwandern. Dabei handelt es sich um inflammatorische Ly6C positive (Ly6C⁺) Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Des Weiteren befinden sich in der Harnblase bereits im nicht infizierten Zustand residente Ly6C negative (Ly6C⁻) Makrophagen, deren Zellzahl sich nach einer UPEC-Infektion kaum verändert. Diese drei verschiedenen Phagozyten stellen die essenziellen Immunzellen während einer bakteriellen Infektion in der Harnblase dar und sind wesentlich für die Beseitigung der Infektion.

Die unterschiedliche Anzahl und die distinkte Lokalisation der drei Zelltypen innerhalb der infizierten Harnblase lassen vermuten, dass die Zellen unterschiedliche Funktionen bei der Bekämpfung der bakteriellen Infektion haben. Die dominierenden Zellen sind neutrophile Granulozyten, die überwiegend im Epithel der Blase lokalisiert sind und deren hauptsächliche Funktion die Phagozytose der im Uroepithel befindlichen UPECs ist.

Ly6C⁻- und Ly6C⁺ – Makrophagen dagegen befinden sich vorwiegend innerhalb des Bindegewebes, nur wenige Zellen sind im Uroepithel lokalisiert. Sie spielen eine sehr geringe Rolle bei der Phagozytose von bakteriellen Erregern. Daher stellt sich die Frage, welche Funktion sie während der Zystitis ausüben.

Da die Eliminierung von UPECs die Hauptaufgabe von neutrophilen Granulozyten ist, kann eine potenzielle Funktion der Makrophagen möglicherweise die Regulation bzw. Koordination der Granulozyten innerhalb der infizierten Harnblase mittels spezieller Mediatoren, wie Chemokine und Zytokine, sein. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden alle Phagozyten auf ihre Chemokinproduktion untersucht. Vor allem wurden Chemokine analysiert, welche für die Granulozytenmigration relevant sind, wie MIF, CXCL1, CXCL2 und CXCL5⁵⁸. Es stellte sich heraus, dass lediglich Ly6C⁻ Makrophagen während einer Zystitis in der Lage waren diese Chemokine zu produzieren. Das Chemokin CCL2, welches für die Rekrutierung von inflammatorischen Makrophagen in das infizierte Gewebe verantwortlich ist²³, wurde wiederum größtenteils von Ly6C⁻-, aber ebenfalls von Ly6C⁺- Makrophagen und neutrophilen Granulozyten produziert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass hauptsächlich Ly6C⁻ Makrophagen neutrophile Granulozyten

in die infizierte Harnblase mobilisieren, während die Rekrutierung von inflammatorischen Makrophagen von mehreren Phagozyten induziert werden kann. In der Literatur werden residente Makrophagen ebenfalls als Hauptproduzenten von Chemokinen beschrieben, die Granulozyten und Ly6C⁺ Makrophagen in das infizierte Gewebe rekrutieren⁵⁸. Zudem wurde beobachtet, dass Granulozyten nach ihrem Eintritt in das infizierte Organ Chemokine ausschütten, die Makrophagen aus der Zirkulation rekrutieren^{24,29,58}. Die hier erhobenen Daten stimmen somit mit den Beobachtungen in der Literatur überein.

In sämtlichen bakteriellen Infektionen spielt das Zytokin TNF α eine essentielle Rolle⁴¹. Daher wurde neben den beschriebenen Chemokinen ebenfalls der Zelltyp bestimmt, der für die Produktion dieses Zytokins verantwortlich ist. Es konnte beobachtet werden, dass Ly6C⁺ Makrophagen die Hauptproduzenten von TNF α innerhalb der Harnblase sind. Dies lässt vermuten, dass Ly6C⁻ und Ly6C⁺ – Makrophagen durch die unterschiedliche Expression von spezifischen Botenstoffen verschiedene regulatorische Aufgaben innerhalb der Zystitis übernehmen. Demzufolge sind neutrophile Granulozyten hauptsächlich für die Phagozytose von UPECs, Ly6C⁺ Makrophagen für die Produktion von proinflammatorischen Molekülen, wie TNF α , und Ly6C⁻ Makrophagen zur Expression von rekrutierenden Chemokinen innerhalb der Harnblase verantwortlich.

Ly6C⁻ Makrophagen sind die Hauptproduzenten der Chemokine, die chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und auf Ly6C⁺ Makrophagen wirken. Da es sich um residente Zellen handelt, die ebenfalls in der uninfizierten Blase vorkommen²³, lässt sich vermuten, dass sie durch die Produktion von Chemokinen Phagozyten in die infizierte Harnblase rekrutieren^{23,29}. Um dieser potentiellen Funktion von Ly6C⁻ Makrophagen in der Harnblase nachzugehen, sollten diese Zellen depletiert und die Rekrutierung der Phagozyten in die Harnblase analysiert werden. Allerdings existiert bislang keine Methode, mit der dieser Makrophagentyp depletiert werden kann. Die Behandlung mittels Chlodronat Liposomen erlaubt lediglich die Depletion von inflammatorischen Ly6C⁺ Makrophagen, residente Makrophagen innerhalb der Harnblase bleiben dagegen unberührt (siehe Anhang). Aus diesem Grund wurden alternativ dazu, die von Ly6C⁻ Makrophagen produzierten Chemokine MIF, CXCL1, CXCL2, CXCL5 und CCL2 mit Hilfe von blockierenden Antikörpern inhibiert und die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Ly6C⁺ Makrophagen untersucht. Bereits die Blockade der Chemokine MIF und CXCL1 führt zu einer erheblichen Reduktion der Granulozyten- und Makrophagenanzahl in der Harnblase. Die Blockade des Chemokins CCL2 dagegen vermindert nur die Zellzahl der Ly6C⁺

Makrophagen. Die Inhibition der beiden Chemokine CXCL2 und CXCL5 hingegen zeigt, dass diese nicht für die Rekrutierung der Phagozyten verantwortlich sind, da sich nach deren Blockaden keine Reduktionen in der Phagozytenzellzahlen ergaben. Dies steht im Widerspruch zu einigen Veröffentlichungen, die eine rekrutierende Wirkung von CXCL2 und CXCL5 auf Granulozyten in Erkrankungen, wie dem respiratorischen Distresssyndrom^{58,68} und der Pyelonephritis⁶⁹, beschreiben. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wäre, dass unterschiedliche Gewebetypen nach einer Infektion zur Rekrutierung von Phagozyten verschiedene Chemokine nutzen. Jacobs et. al konnte weiterhin demonstrieren, dass Chemokine und deren Rezeptoren überlappende Funktionen aufweisen⁷⁰ und demzufolge nicht nur ein Chemokin, sondern eine Vielzahl von Chemokinen und anderen chemotaktisch wirkenden Molekülen, wie Lipid-Mediatoren und Komplement Fragmente, zusammen die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten in das infizierte Gewebe bewirken⁷¹. Anhand dieser Daten erscheint eine gewebespezifische Chemokinrekrutierung als wahrscheinlich. Da die beiden Chemokine CXCL2 und CXCL5 zu diesem Zeitpunkt keine rekrutierende Wirkung zeigten, besitzen sie eventuell andere Funktionen innerhalb der Harnblase.

Um zu bestätigen, dass die untersuchten Chemokine eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung der Phagozyten in die infizierte Harnblase spielen, wurden ebenfalls *CXCR2*^{-/-}- und *CCR2*^{-/-} - Mäuse untersucht, denen der Rezeptor für die Chemokine MIF, CXCL1, CXCL2 und CXCL5⁷¹⁻⁷³ bzw. *CCL2*^{23,51,73} fehlt. Da in diesem Fall nicht einzelne Liganden, sondern der entsprechende Rezeptor fehlt, war zu erwarten, dass die Reduktion der entsprechenden Phagozyten, im Vergleich zu Mäusen mit einer Chemokinblockade, am stärksten sein sollte, da keines der Chemokine an den Rezeptor binden und ein Signal auslösen kann. Diese Annahme konnte anhand der erhobenen Daten bestätigt werden.

Aufgrund dieser Daten kann geschlussfolgert werden, dass der *CXCR2* Rezeptor zusammen mit den Chemokinen CXCL1 und MIF für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Ly6C⁺ Makrophagen verantwortlich ist. Des Weiteren spielen der *CCR2*-Rezeptor und das Chemokin *CCL2* eine bedeutsame Rolle bei der Rekrutierung von Makrophagen²³.

Um zu untersuchen, welche Funktion TNF α produzierende Ly6C⁺ Makrophagen bei der Rekrutierung von Phagozyten in die infizierte Harnblase haben, wurden zusätzlich *TNFR*^{-/-} - Mäuse untersucht. Da TNF α keine chemotaktische Wirkung besitzt, sollte es keine Unterschiede in der Zellzahl von neutrophilen Granulozyten und Ly6C⁺ Makrophagen in

TNFR^{-/-}- und Wildtypmäusen geben. Im Fall der rekrutierten Makrophagen bestätigte sich diese Annahme. Überraschenderweise befanden sich in den infizierten Blasen von *TNFR*^{-/-} Mäusen jedoch deutlich mehr Granulozyten als in denen von Wildtypmäusen. Um der Frage nachzugehen, ob Ly6C⁺ Zellen für dieses Phänomen verantwortlich sind und diese erhöhte Granulozyten-Rekrutierung nicht durch andersartige Effekte begründet ist, wurden Wildtypmäuse mit Chlodronat Liposomen behandelt. In diesem Versuchsansatz werden Ly6C⁺ Zellen depletiert, was zu einer Reduktion der TNF α Produktion in der Harnblase führt. Nach der Makrophagen-Depletion war zu erwarten, dass weniger Ly6C⁺ Makrophagen in die Harnblase rekrutiert werden, da sie durch die Chlodronat Liposomen im Blutkreislauf eliminiert werden. Diese Annahme bestätigte sich und es stellte sich weiterhin heraus, dass in CL depletierten Mäusen, genau wie in den *TNFR*^{-/-} Tieren, mehr neutrophile Granulozyten in der Harnblase vorhanden waren als in Wildtypmäusen. Aus diesem Grund kann vermuten werden, dass das von Ly6C⁺ Makrophagen produzierte TNF α eine spezielle Rolle bei der Migration von neutrophilen Granulozyten zu haben scheint.

Auch andere Arbeitsgruppen haben Effekte von TNF α auf die Migration von neutrophilen Granulozyten ermitteln können. Diese stehen jedoch im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten⁷⁴⁻⁷⁶. Es wird beschrieben, dass eine Blockade von TNF α die Rekrutierung von Granulozyten minimiert. Beobachtungen von Natarajan et al. dagegen zeigen, dass TNF α keine Auswirkungen auf die Migration von Granulozyten hat⁷⁷. In dieser Arbeit dagegen wird das Phänomen beschrieben, dass das Fehlen von TNF α zu einer erhöhten Anzahl von neutrophilen Granulozyten während einer bakteriellen Infektion führt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass hier eine bisher unbekannte Funktion von TNF α auf die Granulozytenmigration beschrieben wird. Die Diskrepanz zwischen den hier erhobenen Daten und denen aus der Literatur kann vermutlich auf die unterschiedlichen Krankheitsmodelle zurückzuführen sein, die unterschiedliche Signalmechanismen auslösen.

4.2 Die Migration von neutrophilen Granulozyten in das Uroepithel während einer Zystitis wird durch $TNF\alpha$, CXCL2 und MMP9 reguliert

4.2.1 In $TNFR^{-/-}$ Mäusen ist die Migration von neutrophilen Granulozyten in das infizierte Uroepithel defekt

Um zu überprüfen, ob die reduzierte Anzahl von neutrophilen Granulozyten oder $Ly6C^{+}$ Makrophagen Auswirkungen auf die Infektionsstärke haben, wurde die bakterielle Last in den Harnblasen der oben beschriebenen Mäuse (WT, aMIF, aCXCL1, aCXCL2, aCXCL5, aCCL2, $CXCR2^{-/-}$, $CCR2^{-/-}$ und $TNFR^{-/-}$) ermittelt. Bei einer verminderten Menge von Granulozyten und Makrophagen, ausgelöst durch die Blockade der Chemokine MIF, CXCL1 und CCL2 oder in $CXCR2^{-/-}$ - und $CCR2^{-/-}$ - Mäusen, war eine erhöhte Bakterienrate im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. Durch die geringere Anzahl von neutrophilen Granulozyten und $Ly6C^{+}$ Makrophagen werden vermutlich deutlich weniger Bakterien durch Phagozytose beseitigt, was die erhöhte bakterielle Last in den entsprechenden Mäusen erklärt. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch Crosara-Alberto et. al und Craciun et al., die innerhalb von verschiedenen Sepsis Modellen ebenfalls eine erhöhte Bakterienanzahl nach einer verminderten bzw. eine verbesserte Infektion nach einer stärkeren Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten festgestellt haben^{78,79}. Ist lediglich die Anzahl der $Ly6C^{+}$ Makrophagen vermindert und nicht diejenige der Granulozyten, wie beispielsweise nach der Blockade des Chemokins CCL2, so ist ebenfalls eine erhöhte bakterielle Last in der Harnblase dieser Mäuse zu erkennen. Anhand dieser Daten kann geschlussfolgert werden, dass sowohl Makrophagen, als auch neutrophile Granulozyten für die Abwehr von Bakterien essentiell sind.

Erstaunlicherweise zeigen $TNFR^{-/-}$ Mäuse, die von allen untersuchten Tieren die größte Menge an neutrophilen Granulozyten in der Harnblase aufwiesen, die stärkste Infektion. Die Analyse der $CCR2^{-/-}$ - und der CL depletierten – Mäuse, in denen die $TNF\alpha$ produzierenden Makrophagen fehlen, besitzen ebenfalls mehr Granulozyten und zeigen ebenfalls eine im Vergleich zum WT stark erhöhte bakterielle Last. Aufgrund der großen Mengen an neutrophilen Granulozyten in diesen Mäusen wäre eine geringere bakterielle Last zu erwarten gewesen⁷⁹. Dieser Umstand trifft jedoch nicht zu. Ähnliche Ergebnisse konnten in Infektionen mit *Listeria monocytogenes* und *Pseudomonas aeruginosa* beobachtet werden, bei denen in $TNFR-1^{-/-}$ und $TNFR^{-/-}$ Mäusen, trotz gleicher

Granulozytenanzahl, eine erhöhte bakterielle Last gemessen werden konnte^{80,81}. Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp wäre, dass das von Ly6C⁺ Makrophagen produzierte TNF α eine kontrollierende Wirkung auf neutrophile Granulozyten während der Zystitis besitzt. Das Zytokin könnte eventuell Auswirkungen auf die Apoptoserate, die Phagozytose oder die Migration innerhalb des Gewebes von neutrophilen Granulozyten haben. Beispielsweise konnte in einem murinen Meningitis-Model aufgezeigt werden, dass die Inhibition von TNF α die Apoptose von Granulozyten minimiert⁸². Diese Befunde konnten zudem von Salamone et al. in *in vitro* Studien bestätigt werden⁸³. Andere Literaturdaten zeigen weiterhin, dass die Phagozytose des Erregers *Staphylococcus aureus* durch neutrophile Granulozyten nach der Stimulation von TNF α und Chemokinen deutlich verbessert ist⁸⁴. Weiterhin konnte Lokuta et. al in *in vitro* Studien demonstrieren, dass TNF α die Polarisation und Migration durch die Regulation der MAP-Kinase p38 reguliert⁸⁵. Welcher genaue Mechanismus zu einer vermehrten Menge von neutrophilen Granulozyten und zu einer erhöhten bakteriellen Last in *TNFR*^{-/-} Mäusen führt, soll nachfolgend demonstriert werden.

Um dem Grund nachzugehen, wie eine vermehrte Anzahl von neutrophilen Granulozyten zu einer Verschlechterung der Infektion führen kann, wurde die Lage der Granulozyten innerhalb der Blase von WT- und *TNFR*^{-/-} – Tieren mittels histologischer Schnitte analysiert. Während die wildtypischen Granulozyten hauptsächlich am Infektionsort, im Uroepithel, akkumulieren, sammeln sich *TNFR*^{-/-} Granulozyten direkt unter dem Epithel der Harnblase an. Anscheinend können *TNFR*^{-/-} Granulozyten bis hin zum Uroepithel wandern und stoppen direkt vor der Basalmembran. Das Unvermögen der Granulozyten in das Uroepithel einzuwandern und die daraus resultierende Unfähigkeit der Zellen die darin befindlichen Bakterien abzutöten, erklärt nun die verstärkte bakterielle Last in *TNFR*^{-/-} Mäusen.

Statistische Auswertungen ergaben, dass im Vergleich zu WT – Mäusen ca. 70% weniger neutrophile Granulozyten im Uroepithel von *TNFR*^{-/-} Mäuse lokalisiert waren. Um diesem Phänomen nachzugehen, wurde im Anschluss die Zellmenge im Urin von *TNFR*^{-/-}- und CL – Mäusen analysiert. Aufgrund des fehlenden Durchtritts der Granulozyten durch das Uroepithel, war eine geringere Menge an Granulozyten im Urin dieser Maustypen zu erwarten. Es stellte sich heraus, dass diese Annahme zutreffend war und sich eine signifikante Reduktion in der Granulozytenmenge im Urin im Vergleich zum WT ergab. Auch während einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* konnte eine verminderte

Menge an neutrophilen Granulozyten im Lumen der Lunge identifiziert werden⁸¹. Diese Befunde unterstützen somit die Beobachtung, dass neutrophile Granulozyten in *TNFR*^{-/-}- und in CL depletierten – Mäusen kaum in das Epithel der Harnblase einwandern können. Diese Ergebnisse schließen zwar nicht aus, dass die Apoptose und Phagozytose der neutrophilen Granulozyten in *TNFR*^{-/-} Mäusen verändert sind, allerdings unterstützen sie die Beobachtungen von Lokuta et. al, die einen Einfluss von TNF α auf die Granulozytenmigration aufzeigen⁸⁵.

Die im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Infektion von Epithelzellen und die verminderte Zellzahl der Granulozyten im Urin von mit Chlodronat depletierten Mäusen ist identisch zu dem Phänotyp der *TNFR*^{-/-} Maus. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass TNF α produzierende Ly6C⁺ Makrophagen für den Migrationsdefekt von Granulozyten verantwortlich sind.

Um festzustellen, ob ein hämatopoetischer Zelltyp, wie beispielsweise Ly6C⁺ Makrophagen oder residente Gewebezellen, in der Harnblase für die fehlende Einwanderung der Granulozyten in das Uroepithel verantwortlich sind, wurden Knochenmarkschimäre Mäuse generiert, in denen wildtypisches durch *TNFR*^{-/-}- oder *TNF α* ^{-/-} – Knochenmark ausgetauscht wurde. Die Analyse der Lokalisation von neutrophilen Granulozyten in den Chimären zeigt deutlich, dass hämatopoetische Zellen für den Migrationsdefekt verantwortlich sein müssen, da das fehlende Vermögen von Immunzellen TNF α zu detektieren oder zu produzieren, in einer Ansammlung von neutrophilen Granulozyten direkt vor dem Epithel resultiert.

Da festgestellt werden konnte, dass der Migrationsdefekt von knochenmarksabhängigen Zellen verursacht wird, sollte im nächsten Schritt die Immunzelle identifiziert werden, die diesen Phänotyp verursacht. Zu diesem Zweck wurden wildtypische Ly6C⁺ Makrophagen in *TNF α* ^{-/-} Mäuse transferiert und die Migration der Granulozyten während einer Zystitis analysiert. Es stellte sich heraus, dass das von transferierten Makrophagen produzierte TNF α die Migration von neutrophilen Granulozyten in das Uroepithel wieder ermöglichte. Der Defekt wurde allerdings nicht vollständig aufgehoben, da sich in einigen stark infizierten Bereichen immer noch Granulozyten vor dem Epithel ansammelten. Eine mögliche Erklärung hierfür kann die zu geringe Menge an transferierten Makrophagen sein. Dies hat zur Folge, dass nicht genügend TNF α produziert wird, um allen Granulozyten die Migration in das Epithel zu ermöglichen. In Zukunft sollen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen eine höhere Anzahl an Makrophagen

transferiert werden soll, um zu überprüfen, ob eine höhere TNF α Konzentration den Migrationsdefekt der Granulozyten vollständig aufheben kann.

Somit konnte dargestellt werden, dass allein hematopoetische Zellen und im Speziellen Ly6C⁺ Makrophagen den Defekt in der epithelialen Granulozytenmigration bedingen. Dieser regulierende Effekt von Makrophagen auf neutrophile Granulozyten ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden und stellt somit eine neue Funktion von Ly6C⁺ Makrophagen dar.

Nachdem aufgeklärt werden konnte, dass Ly6C⁺ Makrophagen für die Produktion von TNF α zuständig sind, wurde weiterhin analysiert, ob beide TNF α – Rezeptoren 1 und 2 auf neutrophilen Granulozyten essentiell für deren Migration in das Uroepithel sind.

Zunächst wurde die Abhängigkeit der endothelialen Migration von neutrophilen Granulozyten durch die beiden TNF α – Rezeptoren mit Hilfe eines kompetitiven Transfers von WT- und *TNFR*^{-/-} – Granulozyten ausgeschlossen. Dies war von besonderer Bedeutung, da eine ungleiche Rekrutierung zu einer unterschiedlichen Anzahl von Granulozyten innerhalb der Harnblase führen würde, die eine Beurteilung der Anzahl der gewanderten Granulozyten aus dem Bindegewebe in das Uroepithel erschweren würde.

Für die Untersuchung des Migrationsverhaltens von Granulozyten in das Uroepithel, wurde die Position von transferierten *TNFR*^{-/-}- bzw. WT – Granulozyten in wildtypische Mäuse analysiert. Obwohl transferierten *TNFR*^{-/-} Granulozyten nicht in der Lage waren das in der wildtypischen Maus produzierte TNF α zu detektieren, wanderten sie in gleicher Zahl wie die transferierten WT Granulozyten in das Epithel der Harnblase ein. Um diese Beobachtungen zu stützen, wurden zusätzlich gemischte Knochenmarkschimäre generiert, deren Knochenmark letztendlich zu 50% aus WT- und zu 50% aus *TNFR*^{-/-} – Knochenmark bestand. Nach der Infektion dieser Mäuse konnten ebenfalls gleich viele Mengen an *TNFR*^{-/-}- und WT – Granulozyten im Urin gefunden werden. Aus diesem Grund waren vermutlich beide Zelltypen in gleicher Weiser in der Lage das Uroepithel zu durchwandern.

Anhand dieser Daten konnte nun belegt werden, dass die TNF α – Rezeptoren 1 und 2 auf neutrophilen Granulozyten weder für die endotheliale, noch für die epitheliale Migration von Granulozyten direkt benötigt werden.

4.2.2 Durch TNF α induziertes CXCL2 reguliert die Migration von neutrophilen Granulozyten in das Uroepithel

Da die Bindung von TNF α an die TNF α – Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten nicht für die Migration der Granulozyten essentiell ist, wurden im nächsten Schritt Moleküle analysiert, deren fehlerhafte Regulation den Migrationsdefekt auslösen könnten. Die extrazelluläre Expression der Membranproteine CD47^{86,87} und CD11b^{61,63} auf neutrophilen Granulozyten und die Expression von ICAM-1 auf Endothelien in WT- und *TNFR*^{-/-} Mäusen zeigten allerdings keine Unterschiede zueinander. Des Weiteren wurde die intrazelluläre Modulation des Aktin – Zytoskeletts^{41,88} (F-Aktin Konzentration) in Granulozyten auf eine potentielle Veränderung untersucht. Um zusätzlich einen Organschaden oder einen generellen Defekt in der Eliminierung von phagozytierten Bakterien aufzuklären, wurden zudem die beiden Proteine Myeloperoxidase (MPO) und der Neutrophilen Elastase (NE) in Granulozyten untersucht⁸⁹⁻⁹². Es ergaben sich jedoch keine Unterschiede zwischen den WT- und *TNFR*^{-/-} - Mäusen hinsichtlich der Expression bzw. Modulation dieser Moleküle. Somit ist weder die Polymerisierung des F-Aktins bzw. die Expression der Moleküle CD47, CD11b und ICAM-1, noch die intrazelluläre Eliminierung von Bakterien durch die Proteine MPO und Neutrophilen Elastase von dem Zytokin TNF α abhängig.

Um einen möglichen Effekt von TNF α auf die Chemokin- und Zytokinproduktion zu untersuchen, wurden die Konzentrationen der Zytokine GM-CSF, INF γ , IL1, IL4, IL5, IL6, IL10, IL17 und der Chemokine CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7 innerhalb der Harnblase von uninfizierten und infizierten WT- und *TNFR*^{-/-} – Mäusen ermittelt. Von speziellem Interesse waren die Chemokine CCL3, CCL4 und CCL5. Diese sind Liganden des CCR1-Rezeptors^{71,93}, der neben dem CXCR2 Rezeptor, als einer der wichtigsten Chemokinrezeptoren für die Migration von neutrophilen Granulozyten gilt^{70,71}. Die Konzentration dieser Chemokine war in *TNFR*^{-/-} Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, allerdings unverändert. Daher kann davon ausgegangen werden, dass TNF α keinen Einfluss auf die Sekretion dieser drei Chemokine hat. Auch die Konzentrationen der anderen getesteten Chemokine und Zytokine waren in Wildtyp und *TNFR*^{-/-} Mäusen identisch. Somit ist es wahrscheinlich, dass der beobachtete Migrationsdefekt nicht durch eine veränderte Produktion dieser Zytokine und Chemokine verursacht wird. Eine Ausnahme stellt das Zytokin IL10 dar, welches in Blasenhomogenaten sowohl von

infizierten als auch in uninfizierten *TNFR*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu entsprechenden Wildtypmäusen stark erhöht ist. Dieser Unterschied verändert sich allerdings durch die Infektion nicht. Da in *TNFR*^{-/-} Mäusen die Konzentrationen proinflammatorischer Moleküle, wie beispielsweise IL6 oder die Aktivierungsmarker auf Granulozyten, im Vergleich zu Wildtypmäusen nicht verringert sind, ist es unwahrscheinlich, dass die erhöhten IL10-Konzentrationen einen Einfluss auf den Verlauf der Zystitis haben.

Wie bereits geschildert, wird der CXCR2-Rezeptor in der Literatur als einer der wichtigsten Chemokinrezeptoren für neutrophile Granulozyten und deren Migration beschrieben^{70,71,94}. Aus diesem Grund wurde die Expression dieses Rezeptors auf der Zelloberfläche von WT-, *TNFR*^{-/-}- und *TNFα*^{-/-} – Granulozyten und die Produktion dessen Liganden MIF, CXCL1 und CXCL2^{71,93} durch Ly6C⁻ Makrophagen analysiert. Für den Rezeptor und die Chemokine MIF und CXCL1 konnte jedoch keine veränderte Expression ermittelt werden. Die Konzentration des Chemokins CXCL2 dagegen war in den *TNFR*^{-/-}- und *TNFα*^{-/-} Mäusen stark reduziert. Weiterhin konnte nach der Depletion der TNFα produzierenden Makrophagen eine signifikante Reduktion in der CXCL2 – Konzentration ermittelt werden. Diese Daten decken sich mit Beobachtungen aus der Literatur, die zeigen, dass TNFα sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* die CXCL2-Produktion induzieren kann⁹⁵⁻⁹⁸. Weiterhin wurde sehr häufig beschrieben, dass Makrophagen im Kontext von bakteriellen Infektionen große Mengen des Zytokins TNFα produzieren^{44,99}. Die publizierten Studien, zusammen mit den hier erhobenen Daten legen somit nahe, dass das von Ly6C⁺ Makrophagen produzierte TNFα die CXCL2 – Produktion in Ly6C⁻ Makrophagen stimuliert.

Neben dem fehlenden TNFα – Signal konnte eine starke Reduktion der CXCL2 - Konzentration in *TNFR*^{-/-}- bzw. *TNFα*^{-/-} – Mäusen festgestellt werden. Da bereits nachgewiesen werden konnte, dass TNFα nicht direkt auf Granulozyten wirkt, stellte sich die Frage, ob die Reduktion der CXCL2 - Konzentration für die defekte Migration der Granulozyten verantwortlich ist. Nach der Injektion des Chemokins in das Lumen der Harnblase von *TNFα*^{-/-} Mäusen, stellte sich heraus, dass neutrophile Granulozyten durch das CXCL2 wieder in der Lage waren in das Uroepithel einzuwandern. Aufgrund dieses Befundes kann im Zusammenhang aller bisher erhobenen Daten geschlussfolgert werden, dass das von Ly6C⁺ Makrophagen produzierte TNFα auf Ly6C⁻ Makrophagen wirkt und in diesen die CXCL2-Produktion reguliert.

Diese Annahme wird von den Versuchsergebnissen von Godaly et al. unterstützt. Sie konnten beobachten, dass die Migration von neutrophilen Granulozyten während einer Zystitis in *CXCR2*^{-/-} Mäusen, genauso wie in dieser Arbeit in *TNFR*^{-/-}- und *TNFα*^{-/-} – Mäusen, vor dem Uroepithel zum stoppen kommen und nicht in den Urin einwandern⁹⁴. Daher muss ein Ligand dieses Rezeptors für die epitheliale Migration entscheidend sein. Wie diese fehlerhafte epitheliale Migration der Granulozyten zustande kommt, konnte von der Gruppe um Godaly allerdings nicht aufgeklärt werden⁹⁴.

4.2.3 Die durch CXCL2 freigesetzte Metallomatrixprotease MMP9 ist für Migration von neutrophilen Granulozyten in das Uroepithel essentiell

Bevor neutrophile Granulozyten in das Uroepithel einwandern können, müssen diese zunächst die Basalmembran passieren, die hauptsächlich aus der Komponente Kollagen IV besteht¹⁷. Um diese durchqueren zu können, müssen Granulozyten zunächst das Kollagen IV mittels der Proteasen NE und MMP8 aufbrechen¹⁰⁰. Im Anschluss werden die entstandenen Fragmente final durch die Metallomatrixprotease MMP9 degradiert und so dem Granulozyten der Durchtritt in das Epithel der Harnblase ermöglicht^{101,102}. Aus diesem Grund wurde der Phänotyp der *MMP9*^{-/-} Maus untersucht. Wie *TNFR*^{-/-} Mäuse zeigen *MMP9*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Mäusen eine höhere bakterielle Last im Urin. Dies zeigt, dass die Infektion in diesen Mäusen deutlich verstärkt ist. Zusätzlich ist die Menge der neutrophilen Granulozyten im Urin im Vergleich zu Wildtypmäusen stark reduziert. Wie bereits in *TNFR*^{-/-} Mäusen aufgezeigt werden konnte, deutet dieses Phänomen auf eine defekte Einwanderung von Granulozyten in das Uroepithel hin. Histologische Untersuchungen zeigten weiterhin, dass *MMP9*^{-/-}-, genauso wie *TNFR*^{-/-} – Granulozyten direkt vor dem Uroepithel akkumulieren und nicht in dieses einwandern. Es konnte somit dargestellt werden, dass *MMP9*^{-/-}- und die *TNFR*^{-/-} – Mäuse denselben Phänotyp aufweisen. Daher kann angenommen werden, dass die Matrixmetalloprotease MMP9 ein wichtiges Glied in der TNFα vermittelten Kaskade ist, die letztendlich zur Migration der Granulozyten in das Uroepithel führt. Corry et al. konnten innerhalb eines allergischen Asthma – Modells ebenfalls aufzeigen, dass sich neutrophile und eosinophile Granulozyten in *MMP9*^{-/-} und *MMP9*^{-/-}/*MMP2*^{-/-} -Doppel-KO – Mäusen im Parenchym der Lunge ansammeln¹⁰³. Gleichzeitig beobachteten sie eine Clusterbildung dieser beiden Zelltypen um die Bronchiolen herum. Eine verstärkte Rekrutierung der Immunzellen in die

Lunge konnte von der Arbeitsgruppe ausgeschlossen werden. Allerdings stellten sie in *MMP9*^{-/-}, aber nicht in *MMP2*^{-/-} - Mäusen fest, dass weniger neutrophile und eosinophile Granulozyten in das Lungenlumen eingewandert waren als in Wildtypmäusen. Auch in diesem Modell konnte eine zum Wildtypen deutlich verstärkte Inflammation in *MMP9*^{-/-}- und *MMP9*^{-/-}/*MMP2*^{-/-}-Doppel-KO – Mäusen festgestellt werden¹⁰³. Dieser Phänotyp stimmt mit dem in der Zystitis dargestellten Phänotypen von *MMP9*^{-/-} -, *TNFα*^{-/-}- und *TNFR*^{-/-} Mäusen überein. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass der hier dargestellte Mechanismus der epithelialen Migration ebenfalls in anderen Krankheitsmodellen und Geweben Gültigkeit hat.

Aufgrund des identischen Phänotyps von *MMP9*^{-/-}- und *TNFR*^{-/-} - Mäusen, wurde angenommen, dass eine fehlerhafte Regulation der Metallomatrixprotease MMP9 die Ursache für den Migrationsdefekt der Granulozyten in *TNFR*^{-/-} - Mäusen darstellt. Während der Zystitis konnten neutrophile Granulozyten als Hauptproduzenten von MMP9 identifiziert werden. Literaturdaten zeigen auf, dass dieser Zustand ein generelles Phänomen ist und in mehreren Infektionsmodellen beobachtet wird^{104,105}.

Der Transfer von MMP9-produzierenden wildtypischen Granulozyten in infizierte *MMP9*^{-/-} Mäuse, zeigt deutlich, dass die Produktion von MMP9 durch neutrophile Granulozyten notwendig für dessen eigene epitheliale Migration ist, da lediglich die transferierten und nicht die endogenen *MMP9*^{-/-} – Zellen in der Lage waren in das Uroepithel einzuwandern. Im Vorfeld wurde vermutet, dass die wildtypischen Granulozyten den endogenen *MMP9*^{-/-} Zellen, aufgrund der Degradation der Basalmembran, die Migration in das Epithel ermöglichen. Diese Annahme traf allerdings nicht zu. Mit Hilfe von *in vitro* Studien konnte Rowe et. al aufzeigen, dass die Basalmembran nach dem Durchtritt von neutrophilen Granulozyten intakt bleibt⁵⁴. Daher kann vermutet werden, dass Granulozyten nach ihrer Durchwanderung die Basalmembran wiederherstellen. Somit müsste jeder Granulozyt selbstständig die Basalmembran degradieren und anschließend wieder schließen. Auf diese Weise würde das hinter dem Epithel liegende Gewebe ebenfalls von Bakterien geschützt werden, die solche offenen Bereiche ansonsten zur Infektion tiefer liegender Zellen nutzen könnten.

Es konnte demonstriert werden, dass das von neutrophilen Granulozyten produzierte MMP9 notwendig für die Einwanderung der Granulozyten in das Epithel der infizierten Harnblase ist. Die durchflusszytometrische Analyse des intrazellulären MMP9-Gehaltes in WT- und *TNFR*^{-/-} – Granulozyten verdeutlichte, dass die MMP9-Menge in den Granula

von $TNFR^{-/-}$ Granulozyten leicht erhöht ist. Diese geringen Unterschiede deuten auf eine verringerte Sekretion der Protease in $TNFR^{-/-}$ Mäusen hin. Die ermittelte absolute Menge von MMP9 in Blasenhomogenaten war im Vergleich zum Wildtyp in $TNFR^{-/-}$ – Mäusen verringert. Diese Reduktion ist jedoch nicht ausreichend, um den starken Phänotypen der drei KO – Mäuse ($TNFR^{-/-}$, $TNF\alpha^{-/-}$ und $MMP9^{-/-}$) zu erklären. Mit Hilfe der ELISA – Daten können allerdings keine Aussagen über die sekretierte MMP9-Menge getroffen werden: Aufgrund des Protokolls der Proteinaufreinigung, befinden sich im Blasenhomogenat sowohl extrazelluläres als auch intrazelluläres MMP9. Metallomatrixproteinasen, wie MMP9, werden von neutrophilen Granulozyten als inaktive Pro-Form in den extrazellulären Raum sekretiert, indem sie durch andere Proteasen in einen aktiven Zustand gespalten werden⁵³. Somit gibt ein MMP9 ELISA keine Auskunft über die Menge von extrazellulärem, katalytisch aktivem MMP9, welches in der Lage ist das Kollagen der Basalmembran zu degradieren, da er nicht zwischen extra- und intrazellulärem Protein unterscheiden kann. Um diesen Parameter zu untersuchen, wurde daher das Gelatine – Zymogram genutzt. Es stellte sich heraus, dass die katalytische Aktivität bzw. der Level an sekretierten MMP9 in $TNFR^{-/-}$ -, $TNF\alpha^{-/-}$ - und CL depletierten – Mäusen im Vergleich zum Wildtypen um 70 bis 80% verringert ist. Somit ist die Sekretion der Protease durch Granulozyten in diesen Mäusen gestört, wodurch neutrophile Granulozyten nicht mehr in der Lage sind die Basalmembran zu degradieren und in das Uroepithel einzuwandern. In *in vitro* Experimenten, in denen WT-, $TNFR^{-/-}$ und $CXCR2^{-/-}$ – Granulozyten mit $TNF\alpha$ und/oder mit CXCL2 stimuliert wurden, konnte weiterhin aufgeklärt werden, dass lediglich CXCL2 und nicht $TNF\alpha$ eine erhöhte MMP9-Sekretion induziert. Es konnte zwar ebenfalls eine leichte Zunahme der MMP9-Aktivität in den WT – Proben nach der Stimulation mit $TNF\alpha$ detektiert werden, diese ist jedoch unspezifisch, da eine vergleichbare Erhöhung nach der Stimulation von $TNFR^{-/-}$ Granulozyten, die $TNF\alpha$ nicht detektieren können, ebenfalls zu erkennen war. Einen eindeutigen Beweis für die stimulierende Wirkung von CXCL2 auf die MMP9 – Sekretion stellen die *in vitro* Ergebnisse der stimulierten $CXCR2^{-/-}$ – Granulozyten dar. Sie waren weder nach der Stimulation mit $TNF\alpha$, noch mit CXCL2 in der Lage MMP9 zu sekretieren. Dies demonstriert sehr deutlich, dass der CXCR2-Rezeptor und dessen Ligand CXCL2 für die Ausschüttung von MMP9 aus den Granula der Granulozyten verantwortlich sind. Daten von anderen Arbeitsgruppen bestätigen diese Befunde. Es konnte nachgewiesen werden, dass humane Granulozyten nach der Stimulation des CXCR2 – Rezeptors durch IL8 *in*

in vitro die Ausschüttung von MMP9 aus den tertiären Granula bewirkt^{105,106}. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese MMP9-Sezenerierung durch die MAP-Kinasen ERK 1/2¹⁰⁵, die Protein Kinase C oder von Src - Kinasen¹⁰⁶ gesteuert wird. Diese Befunde lassen vermuten, dass die CXCL2 vermittelte Freisetzung von MMP9 in murinen Zellen eventuell ebenfalls von diesen Kinasen gesteuert wird.

Chakrabarti et al. zeigen dagegen, dass die Stimulation mit TNF α neutrophile Granulozyten dazu stimuliert, *in vitro* MMP9 zu sezenerieren. Allerdings konnten diese Befunde in dieser Promotionsarbeit und von anderen Gruppen nicht bestätigt werden¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Die hier ermittelten *in vitro* Befunde konnten zudem *in vivo* bestätigt werden. Nach der Inhibition von CXCL2 mittels eines blockierenden Antikörpers, konnte im Vergleich zu unbehandelten WT Mäusen, eine signifikante Reduktion in der katalytische Aktivität der sekretierten Proteasen beobachtet werden. Um zu demonstrieren, dass MMP9 und nicht MMP2, das ebenfalls in der Lage ist Kollagen IV zu degradieren, die Granulozytenmigration in das Epithel ermöglicht, wurden als Kontrolle zudem die Level der Metallomatrixprotease MMP2 in WT-, *TNFR*^{-/-}-, *TNF α* ^{-/-}-, CL depletierten- und mit antiCXCL2 behandelten – Mäusen ermittelt und miteinander verglichen. Es ergaben sich in keiner der Mäuse Unterschiede zueinander. Demzufolge degradiert MMP9, aber nicht MMP2 die epithelialen Basalmembran während einer Zystitis. Dieser Befund deckt sich mit Beobachtungen von Corry et al., die in einem murinen Asthma-Modell ebenfalls keine veränderte Migration der neutrophilen Granulozyten in *MMP2*^{-/-} Mäusen nachweisen konnten. In *MMP9*^{-/-} Mäusen dagegen war die Granulozytenmigration erheblich verändert¹⁰³. Mit Hilfe dieser *in vitro* und *in vivo* erhobenen Daten kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass das Chemokin CXCL2 die Sekretion von MMP9 in neutrophile Granulozyten reguliert, während die Sekretion der Protease MMP2 unabhängig von diesem Chemokin ist.

Um zu untersuchen, ob die Sekretion und nicht die Aktivierung der Protease MMP9 von CXCL2 reguliert wird, wurde das Vorkommen des natürlichen Inhibitors von MMP9 analysiert. Insgesamt existieren vier verschiedene Inhibitoren, TIMP 1 bis 4, die zusammen mit Metallomatrixproteasen Komplexe binden und deren Aktivität auf diese Weise hemmen können⁵⁵. Für die Inhibition von MMP9 wird im speziellen TIMP-1 als besonders relevant beschrieben⁵⁵. Die Gesamtmenge des Inhibitors in Blasenhomogenaten von WT-, *TNFR*^{-/-}-, *TNF α* ^{-/-}- und CL depletierten – Mäusen zeigte keine Unterschiede

zueinander, daher scheint TNF α und CXCL2 hier keinen Einfluss auf die Inhibition der MMP9-Aktivität zu haben.

4.3 Die Regulation der transepithelialen Migration von neutrophilen Granulozyten im Überblick

Anhand der Untersuchungsergebnisse ist der folgende Ablauf von Ereignissen während einer Zystitis sehr wahrscheinlich (Abbildung 4.1): (1) Residente Ly6C⁻ Makrophagen nehmen die UPEC – Infektion wahr und beginnen daraufhin Chemokine, wie CCL2, MIF und CXCL1, zu produzieren, die neutrophile Granulozyten und Ly6C⁺ Makrophagen rekrutieren. (2) Nach dem Eintritt der Ly6C⁺ Makrophagen in die Harnblase, produzieren diese das proinflammatorische Zytokin TNF α , welches an den TNF α – Rezeptor von Ly6C⁻ Makrophagen bindet. (3) Das gebundene TNF α induziert die Produktion und die Sekretion des Chemokins CXCL2 durch Ly6C⁻ Makrophagen. (4) Nachfolgend bindet das freigesetzte Chemokin an den CXCR2 – Rezeptor von neutrophilen Granulozyten und induziert auf diese Weise die Freisetzung der Protease MMP9 aus den Granula der Granulozyten. (5) Mit Hilfe der sekretierten Protease sind neutrophile Granulozyten in der Lage, die Basalmembran zu degradieren und in das Epithel der Harnblase einzuwandern. Dort angelangt phagozytieren und eliminieren sie uropathogene *E.coli*.

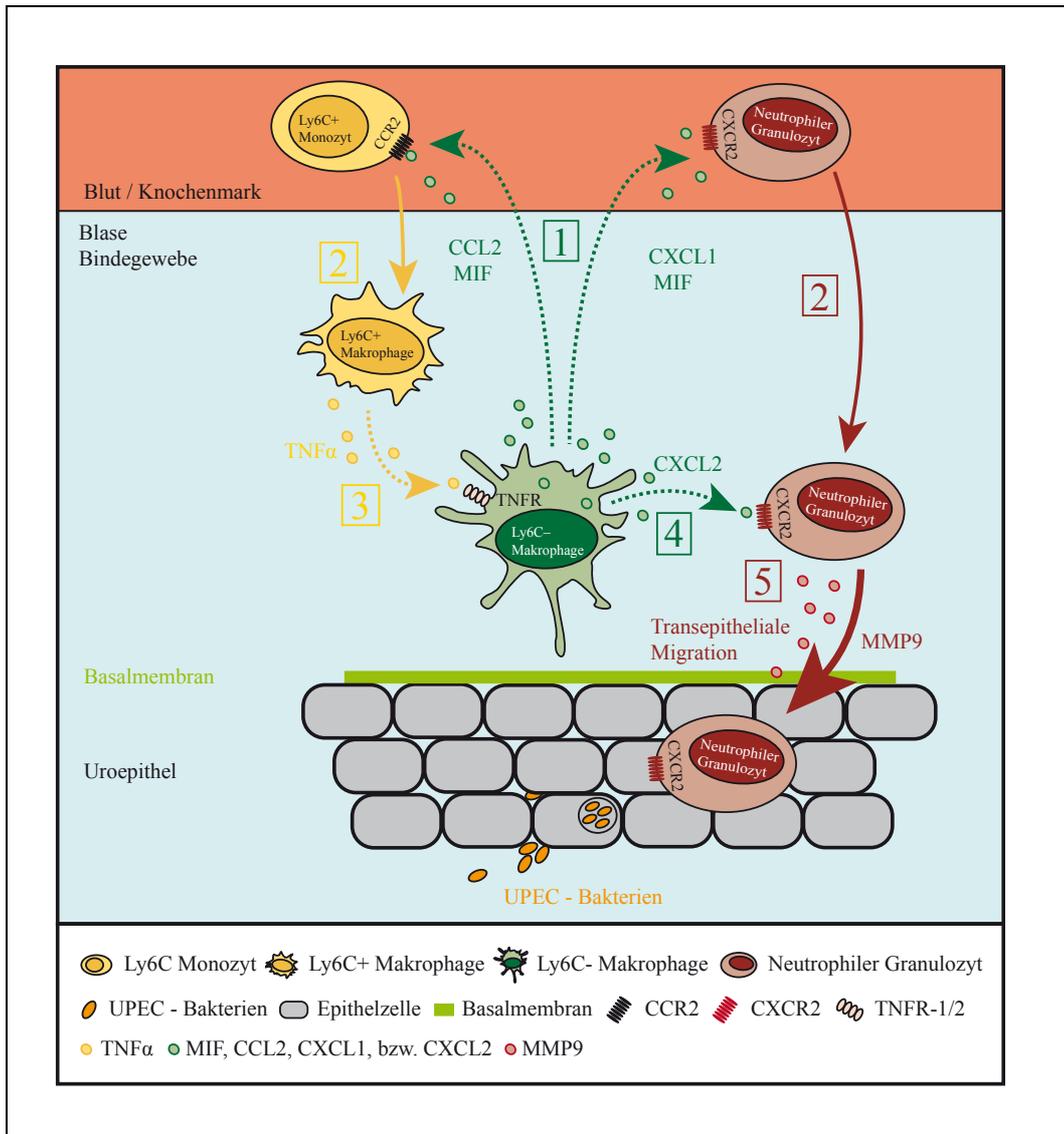


Abbildung 4.1: Regulation der transepithelialen Migration von neutrophilen Granulozyten

Residente Makrophagen (Ly6C⁻) nehmen die UPEC-Infektion wahr und produzieren daraufhin die Chemokine CCL2, CXCL1 und MIF, die inflammatorische Makrophagen (Ly6C⁺) und neutrophile Granulozyten in die Harnblase rekrutieren. Nach dem Eintritt produzieren Ly6C⁺ Makrophagen das inflammatorische Zytokin TNFα, das an den TNFR von Ly6C⁻ Makrophagen bindet und diese zur Produktion des Chemokins CXCL2 animiert. Das freigesetzte CXCL2 bindet anschließend an den CXCR2 Rezeptor von Granulozyten, was die Freisetzung von MMP9 aus den Granula der Granulozyten induziert. Mit Hilfe dieser Protease MMP9 ist der neutrophile Granulozyt dazu in der Lage, die epitheliale Basalmembran zu degradieren und in das infizierte Epithel einzuwandern (modifiziert nach D. Engel).

4.4 TNF α und CXCL2 regulieren *in vitro* die Migrations – Geschwindigkeit von neutrophilen Granulozyten

Anhand von *in vitro* Studien konnten weitere Einflüsse von TNF α und CXCL2 auf die Migration der Granulozyten ermittelt werden. Diese Befunde treten allerdings nur in der Kombination von TNF α und CXCL2 auf. Daher kann dieses Migrationsverhalten nicht in der *TNFR*^{-/-} Mäusen analysiert werden. Es ist ebenfalls anzunehmen, dass dieser Effekt keine Rolle bei der Migration der Granulozyten in das Uroepithel spielt, da innerhalb dieser *in vitro* Untersuchungen keine künstlichen Barrieren, wie beispielsweise eine simulierte Basalmembran, verwendet wurden. Die Zellen konnten sich im Versuch frei bewegen. In „Transwell“ – Versuchen konnte gezeigt werden, dass mit TNF α stimulierte neutrophile Granulozyten bei geringen CXCL2 Konzentrationen effektiver entlang eines Chemokingradienten migrieren können als bei hohen Konzentrationen. Unstimulierte WT – Zellen und unstimulierte bzw. stimulierte *TNFR*^{-/-} Granulozyten dagegen steigern ihre Migration mit höheren CXCL2 Konzentrationen. Diese Migrationsversuche wurden ebenfalls mit dem Chemoattraktant C5a durchgeführt und es zeigte sich, dass TNF α unstimulierte und stimulierte WT- und *TNFR*^{-/-} – Granulozyten ebenfalls mit steigenden Konzentrationen verbessert migrieren. Daher ist anzunehmen, dass das veränderte Migrationsverhalten von TNF α stimulierten WT – Granulozyten bei hohen Chemokinkonzentrationen nur in Kombination mit CXCL2 zustande kommt.

Durch die 3D-Kollagen-Chemotaxis-Methode¹⁰⁸ konnte weiterhin festgestellt werden, dass TNF α die Migrationsgeschwindigkeit bei niedrigen CXCL2 – Konzentrationen erhöht. Die Direktionalität wird dabei nicht beeinflusst. Es müssten jedoch noch weitere Untersuchungen angestellt werden, um zu prüfen, ob die Migration von TNF α stimulierten Granulozyten, im Vergleich zu unstimulierten Zellen, bei hohen Konzentrationen eventuell verlangsamt ist.

Eine mögliche Erklärung für diese Phänomene wäre beispielsweise, dass TNF α einen Mechanismus in der Zelle aktiviert, der eine Art Start- bzw. Stopp-Signal für Granulozyten simuliert und somit bei niedrigen Konzentrationen die Migrationsgeschwindigkeit erhöht und bei hohen Konzentrationen erniedrigt. Geringe Chemokinkonzentrationen, die vom Produktionsort meist weit entfernt sind, ermöglichen den Zellen demnach eine schnellere Migration zum Zielort. Gelangen die neutrophile Granulozyten dagegen in die Nähe des

Produktionsortes des Chemokins, an dem die Konzentration die höchste ist, wird die Zelle abgestoppt und der Granulozyt kann dort seinen spezifischen Aufgaben nachgehen. Lokuta et. al demonstrieren in *in vitro* Studien ebenfalls eine inhibierende Wirkung von TNF α auf die Migration von humanen Granulozyten in Kombination mit ansteigenden Konzentrationen des Chemokins IL8, welches dem murinen CXCL2 entspricht. Dieses Stopp - Signal soll im Speziellen von der MAP-Kinase p38 reguliert werden⁸⁵. Ein Start-Signal konnte die Arbeitsgruppe allerdings nicht identifizieren. In der Studie analysierten Lokuta et. al lediglich die Abnahme der Migration von TNF α stimulierten Granulozyten auf unterschiedliche IL8-Konzentrationen. Unstimulierte Granulozyten galten lediglich als Kontrolle und wurden nicht in Abhängigkeit von unterschiedlichen IL8-Konzentrationen untersucht. Aus diesem Grund könnten die hier durchgeführten Versuche in Zukunft mit humanen Granulozyten wiederholt werden, um die murinen Daten eventuell zu bestätigen⁸⁵.

Für das Chemoattraktant fMLP konnte bereits im Detail gezeigt werden, dass die MAP – Kinasen p38 und Erk solche Start- und Stopp – Signale vermitteln¹⁰⁹. Beide Mechanismen werden dabei über den fLMP Rezeptor FPR („formyl-peptide-Rezeptor“) gesteuert¹⁰⁹.

Ob TNF α diese MAP-Kinasen oder andere intrazelluläre Mechanismen in der Maus als Start- bzw. Stopp – Signal nutzt, muss in Zukunft noch genauer ermittelt werden. Die hier erhobenen Daten stellen somit erst den Anfang einer neuen Studie dar.

4.5 Die innate Helferfunktion durch Makrophagen

In dieser Arbeit konnte eine von residenten und inflammatorischen Makrophagen vermittelte innate Helferfunktion aufgeklärt werden, welche die Auflösung von bakteriellen Harnblaseninfektionen durch die Regulation von neutrophilen Granulozyten ermöglicht. Diese koordinierte Migration von Granulozyten erfolgt hierbei durch das Zytokin TNF α und dem Chemokin CXCL2.

Die Abfolge immunologischer Prozesse nach einer bakteriellen Infektion ist immer noch nicht vollkommen verstanden^{29,58}. Während die endotheliale Migration von Phagozyten, somit der Austritt der Zellen aus der Zirkulation in das infizierte Gewebe, bereits zu großen Teilen aufgeklärt und in der Literatur ausführlich beschrieben ist, ist über die epitheliale Migration von Immunzellen sehr wenig bekannt^{23,29,58,110,111}. Die vorhandenen Daten über die epitheliale Migration stammen größtenteils aus *in vitro* Studien, die

allerdings nicht alle *in vivo* relevanten Aspekte berücksichtigen können^{112–114}. Die hier erhobenen *in vivo* Befunde beschreiben einen bisher noch unbekanntem Teilprozess der epithelialen Migration in einer bakteriellen Infektion.

Residente Ly6C⁺ Makrophagen agieren in der Harnblase als Wächterzellen, die als erste Immunzellen die Infektion über PAMPs (LPS, CpG) oder Chemoattraktantien (fLMP, C5a), wahrnehmen^{23,29,58}. Infolgedessen erhöhen Makrophagen die Permeabilität lokaler Blutgefäße und rekrutieren durch die Expression von speziellen Chemokinen inflammatorische Phagozyten in das Blasengewebe²⁹. Jedes von Ly6C⁺ Makrophagen produziertes CX-Chemokin besitzt eine spezielle Aufgabe^{16,29,51,73}. Hier konnte dargestellt werden, dass die beiden Chemokine CXCL1 und MIF während einer Zystitis hauptsächlich für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aus der Zirkulation zuständig sind. Demzufolge sind diese Chemokine für die endotheliale Migration der Granulozyten in die infizierte Harnblase essentiell. Es wird vermutet, dass in verschiedenen Geweben unterschiedliche Chemokine zur Rekrutierung von Phagozyten während einer Inflammation verantwortlich sind^{58,71}. Zudem können diese Chemokine in den verschiedenen Geweben von unterschiedlichen residenten Zelltypen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen, Endothel- und/oder Epithelzellen, produziert werden. In der Leber beispielsweise produzieren hauptsächlich residente Makrophagen (Kupferzellen) Chemokine, die neutrophile Granulozyten mobilisieren⁵⁸. Während des respiratorischen Distresssyndromes (ARDS) dagegen produzieren Epithelzellen das Chemokin CXCL5, das anschließend Granulozyten in das Lungengewebe rekrutiert^{58,68}. Bei einer durch Autoantikörper verursachten Arthritis ist hauptsächlich das Chemoattraktant LTB₄ für die Migration der Zellen verantwortlich¹¹⁵. Aus diesem Grund ist es notwendig, die entsprechenden Chemokine und die exprimierenden Zelltypen in jedem Modell zu analysieren. Nach der Einwanderung in das infizierte Gewebe müssen neutrophile Granulozyten allerdings dem initialen Chemokingradienten, der für die Rekrutierung der Phagozyten aus dem Blutstrom aufgebaut wurde, widerstehen. Ansonsten würden die Zellen wieder zurück in die Zirkulation migrieren^{29,58}. Aus diesem Grund wird vermutet, dass in infizierten Organen weitere Chemokingradienten existieren müssen, die für Granulozyten attraktiver sind als der endotheliale Gradient und dass diese Gradienten die Zellen zum Epithel leiten^{16,58,67}. Welche Moleküle für diesen Prozess verantwortlich sind, ist bislang jedoch noch ungeklärt. Allerdings konnte in verschiedenen Studien^{16,116} und auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Chemoattraktoren stärkere Stimuli für

Granulozyten darstellen als Chemokine. Daher kann vermutet werden, dass diese so genannten „End – target“ Moleküle die attraktiveren Gradienten innerhalb des Gewebes bilden und neutrophile Granulozyten von den Endothelien bis zum Epithel dirigieren^{16,67}. Ein Argument für diese Hypothese ist, dass Chemokine und „End – target“ Moleküle unterschiedliche Signalwege nach ihrer Bindung an den Rezeptor in der Zelle auslösen und somit die Zelle auf unterschiedliche Art und Weise stimulieren^{58,71}. Heit et al. konnten zudem darstellen, dass neutrophile Granulozyten intrazelluläre Signalweg-Hierarchien („Entscheidungs-Mechanismen“) besitzen, die darüber entscheiden, zu welchem Chemokin oder Chemoattraktant die Zelle migriert^{117,118}.

Neben den neutrophilen Granulozyten werden ebenfalls Ly6C⁺ Makrophagen, unter anderem durch die Chemokine CCL2 und MIF, in die infizierte Harnblase rekrutiert²³. In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass diese inflammatorischen Makrophagen als innate Regulatoren dienen^{23,28}. Durch die Expression von TNF α induzieren sie in Ly6C⁻ Makrophagen die Produktion des Chemokins CXCL2, welches die Migration von neutrophilen Granulozyten in das Uroepithel steuert. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte nicht eindeutig geklärt werden, wie CXCL2 innerhalb des infizierten Organs wirkt⁹⁴. Bezüglich der Wirkungsweise existierten unterschiedliche Vermutungen. Beispielsweise wurde angenommen, dass das Chemokin, ausgehend vom Epithel, einen Gradienten bildet und so den Zellen einen Weg zum Infektionsort weist^{16,29}. Allerdings ist dies sehr unwahrscheinlich, da CXCL2 chemotaktisch nicht so potent ist wie „End – target“ Moleküle, die zusammen mit dem Chemokin im Gewebe vorkommen und so den Chemokingradienten überschreiben würden (siehe oben). Des Weiteren wird vermutet, dass nicht ein Chemokin allein, sondern multiple Chemokine und Chemoattraktantien diese Wanderung der Immunzellen innerhalb eines Gewebes steuern⁵⁸. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass das von Ly6C⁻ Makrophagen produzierte Chemokin CXCL2 die Sekretion von MMP9 aus den Granula der Granulozyten induziert. Diese Protease bewirkt anschließend die Degradation des Kollagen IV in der epithelialen Basalmembran und ermöglicht dem Granulozyten den Durchtritt in das Uroepithel. Somit konnte die Metallomatrixprotease MMP9 als epithelialer Barrierebrecher identifiziert werden, der durch CXCL2 reguliert wird. Gesteuert wird diese Regulation durch das von Ly6C⁺ Makrophagen produzierte TNF α , das wiederum die CXCL2 – Produktion reguliert.

Anhand von Literaturdaten^{16,29} und der hier erhobenen Versuchsdaten ergeben sich nun innerhalb der bakteriellen Infektion drei verschiedene Funktionsbereiche für chemotaktisch

wirkende Moleküle: Zum einen sind Chemokingradienten (z.B. CXCL1 oder MIF) für die Rekrutierung von Phagozyten aus der Zirkulation in das infizierte Organ notwendig^{23,29,58}, zum zweiten ist es wahrscheinlich, dass die Migration von Immunzellen vom Endothel bis zum Epithel durch Chemoattraktantien wie fLMP oder C5a reguliert wird^{16,29,58}. Im dritten und letzten Migrationsschritt wird der Durchtritt des Granulozyten in das Epithel durch das Chemokin CXCL2⁹⁴ indirekt über die Aktivierung von MMP9 induziert.

Die hier beschriebene Helferfunktion ist vergleichbar mit einer bereits bekannten Helferfunktion im adaptiven Immunsystem: Für die Aktivierung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen durch kreuzpräsentierende dendritische Zellen, müssen dendritische Zellen zuvor von CD4⁺ T-Helfer oder NKT – Zellen lizenziert werden. Daher können dendritische Zellen eine naive T-Zelle erst nach einer solchen Lizenzierung effektiv aktivieren. Im Anschluss sind die so aktivierten zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen in der Lage, virale Infektionen zu bekämpfen¹¹⁹⁻¹²¹.

In dieser Arbeit konnte nun eine ähnliche, durch Makrophagen vermittelte, Helfer – Funktion im innaten System identifiziert werden, welche die Bekämpfung von bakteriellen Infektionen ermöglicht.

4.6 Die klinische Relevanz

Eine gängige Therapie bei Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise Arthritis, ist die Blockade von TNF α ^{122,123}. Allerdings verursacht diese Inhibition des proinflammatorischen Zytokins bei Patienten mit Arthritis oder Darmerkrankungen Rückfälle mit dem Tuberkulose Bakterium *mycobacterium tuberculosis*¹²². Neben einer höheren Wahrscheinlichkeit an Tuberkulose zu erkranken, steigt bei dieser Therapie ebenfalls das Risiko eine Zystitis oder sogar eine Pyelonephritis zu erlange¹²⁴⁻¹²⁶. Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse könnten eine Erklärung für diese Infekte durch bakterielle Erreger sein, da TNF α ein Schlüsselprotein darstellt, das die Migration von Bakterien eliminierenden Phagozyten kontrolliert. Eine Blockade von TNF α führt in diesen Patienten möglicherweise zu einer fehlerhaften Migration der Granulozyten und erlaubt somit kleineren und ansonsten unauffälligen Entzündungen zu großen Infekten auszuarten. Ein möglicher Ansatz bei Patienten, die eine TNF α blockierende Behandlung erhalten, wäre anhand unserer Daten beispielsweise eine Chemokintherapie. In diesem Fall könnte die Migration der neutrophilen Granulozyten in das Epithel des entsprechenden

Organs wieder gewährleistet werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Makrophagen und neutrophile Granulozyten sind bedeutsame Phagozyten des innate Immunsystems, die in Zusammenarbeit eine Vielzahl von bakteriellen Infektionen auflösen. Die funktionelle Spezialisierung dieser Zellen und der genaue Ablauf der innate Abwehr konnte allerdings bislang nicht vollständig aufgeklärt werden. Mit dieser Arbeit ist es gelungen, einen weiteren Teilprozess der innate Immunantwort zu entschlüsseln, indem eine Helfer-Funktion durch inflammatorische Makrophagen während der Zystitis aufgedeckt wurde. Im Speziellen konnte nachgewiesen werden, dass zur Auflösung einer bakteriellen Harnwegsinfektion die Kooperation zwischen drei verschiedenen Zelltypen des innate Immunsystems notwendig ist: Ly6C⁻ Makrophagen fungieren als residente Wächterzellen, die zirkulierende Ly6C⁺ Makrophagen und neutrophile Granulozyten in das infizierte Gewebe rekrutieren. Ly6C⁺ Makrophagen sind innate Helferzellen, die nach ihrer Rekrutierung das Zytokin TNF α produzieren, das in Ly6C⁻ Makrophagen die Produktion von CXCL2 bewirkt. Dieses Chemokin induziert anschließend in Granulozyten die Sekretion der Metallomatrixprotease MMP9, welche die epitheliale Basalmembran degradiert und so dem Granulozyten die Wanderung in das Uroepithel ermöglicht. Im Epithel angelangt, phagozytieren und eliminieren Granulozyten anschließend die Bakterien. In dieser Arbeit konnte somit ein vorher unbekannter Helfer-Mechanismus durch Ly6C⁺ Makrophagen im innate Immunsystem aufgeklärt werden, wodurch residente Makrophagen in der Koordination der epithelialen Migration von neutrophilen Granulozyten, unterstützt werden. Auf diese Weise wird letztendlich eine erfolgreiche Eliminierung der Bakterien in der Harnblase gewährleistet. In diesem Zusammenhang konnte gleichzeitig TNF α als zentraler Mediator identifiziert werden, der diese Regulation der innate Immunantwort induziert.

Es konnten weiterhin erste *in vitro* Daten erhoben werden, die darauf hinweisen, dass TNF α zusammen mit CXCL2 die Migrationsgeschwindigkeit von Granulozyten steuert. Für das Chemoattraktant fMLP konnten bereits Start- und Stoppsignale für Immunzellen, mit den MAP – Kinasen p38 und ERK, ermittelt werden. Mit dem Zytokin TNF α könnte somit ein potentieller Regulator für die Chemokin vermittelte Start- und Stopp – Funktion gefunden worden sein. Diese Annahme muss allerdings in Zukunft noch durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
°C	Grad Celsius
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	„Bovine serum albumin“
C5a	„Complement 5a“
ca.	Circa
CD	„cluster of differentiation“
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CL	Chlodronat Liposomen
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin – Phosphat – Guanin
DAMPs	„Damage-associated molecular pattern molecules“
dH ₂ O	Destiliertes Wasser
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	„ Fluorescence-activated cell Sorting“
FCS	„ <i>Fetal calf serum</i> “
fLMP	„ <i>N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine</i> “
FPR	„Formyl-peptide-rezeptor“
GFP	„ <i>Green fluorescent protein</i> “
GM-CSF	„Granulocyte/macrophages colony stimulating factor“
GRK	„G protein-coupled-receptor-kinase“
HCL	Salzsäure
ICAM1/2	„Intracellular adhesion melecule 1/2“
IL	Interleukin

INF γ	Interferon γ
IRDS	respiratorisches Distresssyndrom
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
KO	„Knockout“
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	Leukotrin B ₄
M	Molar
MACS	„Magnetic-activated cell sorting“
MAP – Kinase	„Mitogen-activated-protein-kinase“
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloprotease
MPO	<i>Myeloperoxidase</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natrium Azid
NEM	n – Ethylmaleimide
NET	„Neutrophil extracellular trap“
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
PAMPs	„Pathogen-associated molecular patterns“
PBS	„Phosphat – buffered saline“
PECAM	„ <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i> “
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
pg	Picogramm
PRR	„pattern recognition“ - Rezeptor
RCB - Puffer	„ <i>Red Blood Cell</i> “ - Puffer
RPMI	„ <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> “

RT	Raumtemperatur
SDS	„Sodium – dodecyl – sulfate“
Sec.	Sekunde(n)
SP	Serinprotease
TIMP	„Tissue inhibitor of metalloproteinases“
TLR	„Toll like“ - Rezeptor
TNF α	„Tumor necrosis factor alpha“
TNFR	„Tumor necrosis factor alpha rezeptor 1 und 2“
Tris	Tris(hydroxymethyl) - aminomethan
UPEC	Uropathogene <i>Escherichia coli</i>
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
WT	Wildtyp

6.2 Abbildungsverzeichnis

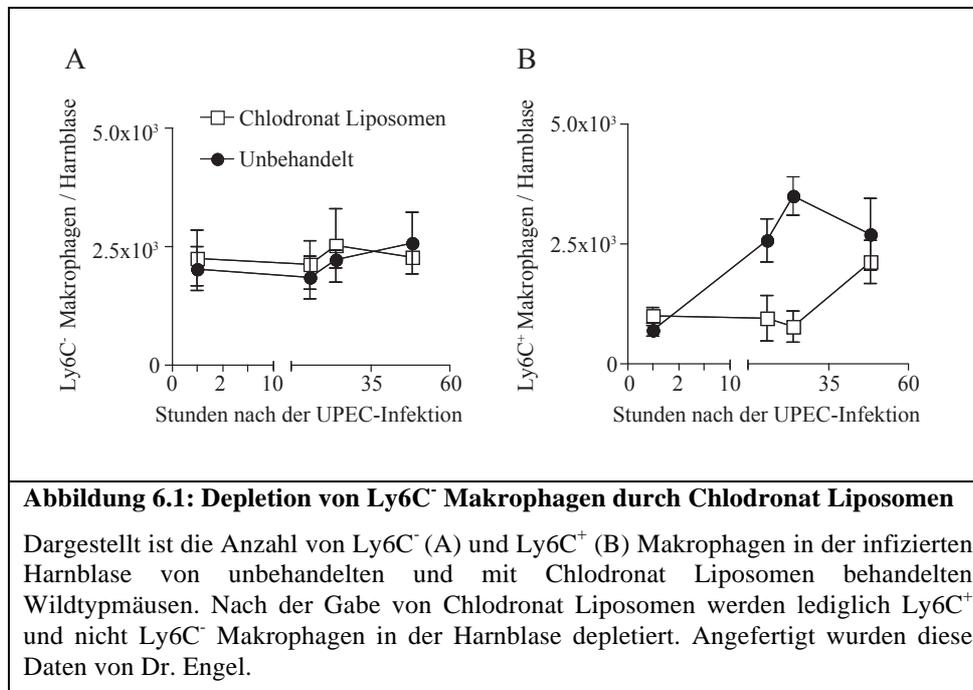
Abbildungsnummer	Titel	Seiten- nummer
Abbildung 1.1	Schematische Darstellung der Harnblase	4
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung der Basalmembran	4
Abbildung 1.3	Zellen des innaten und adaptiven Immunsystems	5
Abbildung 1.4	Entwicklung und Differenzierung von Immunzellen im Knochenmark	7
Abbildung 1.5	Transmigration von neutrophilen Granulozyten durch das Endothel	16
Abbildung 1.6	Schematische Darstellung von präferentiellen Migrationsstellen von neutrophilen Granulozyten während der Transmigration durch das Endothel	17
Abbildung 3.1	Vorkommen und Lokalisation von Immunzellen in der Zystitis	44

Abbildung 3.2	Chemokin- und Zytokin – Produktion durch neutrophilen Granulozyten, Ly6C ⁺ - und Ly6C ⁻ - Makrophagen während der Zystitis	46
Abbildung 3.3	Rolle von Chemokinen und TNF α auf die Zellrekrutierung und bakterielle Last während der Zystitis	48
Abbildung 3.4	<i>TNFR</i> ^{-/-} Granulozyten akkumulieren vor dem Uroepithel	50
Abbildung 3.5	Hematopoetische Zellen vermitteln den Migrationsdefekt neutrophiler Granulozyten in chimären Mäusen	52
Abbildung 3.6	Der TNF – Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten ist nicht relevant für deren epitheliale Migration	54
Abbildung 3.7	Expressionsanalyse von migrationsrelevanten Molekülen auf neutrophilen Granulozyten	56
Abbildung 3.8	Chemokin- und Zytokin – Produktion in Wildtyp und <i>TNFR</i> ^{-/-} - Mäusen	57
Abbildung 3.9	TNF α -abhängige CXCL2-Produktion reguliert die epitheliale Migration neutrophiler Granulozyten	59
Abbildung 3.10	MMP9 ^{-/-} - Granulozyten akkumulieren vor dem Uroepithel	61
Abbildung 3.11	Autokrin produziertes MMP9 reguliert die epitheliale Migration von neutrophilen Granulozyten	63
Abbildung 3.12	CXCL2 reguliert die MMP9 Freisetzung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	65
Abbildung 3.13	TIMP-1-Expression in WT- und KO – Mäusen	67
Abbildung 3.14	Differentielle Migration TNF α stimulierter neutrophiler Granulozyten	69
Abbildung 4.1	Regulation der transepithelialen Migration von neutrophilen Granulozyten	86
Abbildung 6.1	Depletion von Ly6C ⁻ Makrophagen durch Chlodronat Liposomen	98

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabellennummer	Titel	Seitennummer
Tabelle 1	MMP Familien, klassifiziert anhand ihrer Struktur und deren Substraten	12
Tabelle 2	Chemokin- und Zytokinproduktion von Immun- und CD45 ⁺ Zellen während der Zystitis	46

6.4 Depletion von Ly6C⁻ und Ly6C⁺ Makrophagen durch Chlodronat Liposomen



6.5 Literaturverzeichnis

1. Hung, C.-S., Dodson, K. W. & Hultgren, S. J. A murine model of urinary tract infection. *Nature protocols* **4**, 1230–1243 (2009).
2. Kau, A. L., Hunstad, D. a & Hultgren, S. J. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. *Current opinion in microbiology* **8**, 54–59 (2005).
3. Hooton, T.M., Stamm, W. E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **11**, 551–581 (1997).
4. Svanborg C, G. G. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am.* **3**, 513–529 (1997).
5. Mulvey, M. a, Schilling, J. D., Martinez, J. J. & Hultgren, S. J. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8829–8835 (2000).
6. Russo TA, Stapleton A, Wenderoth S, Hooton TM, S. W. E. Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *J Infect Dis.* **2**, 440–445 (1995).
7. Sivick, K. E. & Mobley, H. L. T. Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. *Infection and immunity* **78**, 568–585 (2010).
8. Nielubowicz G. R., M. H. L. T. Host-pathoginteractions in urinary tract infection. *Nature reviews. Urology* **7**, 430–441 (2010).
9. Foxman, B. Recurring urinary tract infection: incidence and risk factors. *American journal of public health* **80**, 331–333 (1990).
10. Montini, G., Tullus, K. & Hewitt, I. Febrile urinary tract infections in children. *The New England journal of medicine* **365**, 239–250 (2011).
11. Gray, H. & Clemente, C. *Anatomy of the Human Body*. 1985
12. Khandelwal, P., Abraham, S. N. & Apodaca, G. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *Gastrointestinal and Liver Physiology* F1477–F1501 (2009).doi:10.1152/ajprenal.00327.2009.
13. RM., H. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biol Rev Camb Philos Soc.* **2**, 215–246 (1975).
14. Truschel, S. T. *et al.* Stretch-regulated Exocytosis / Endocytosis in Bladder Umbrella Cells. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 830–846 (2002).

15. Apodaca, G. The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **5**, 117–128 (2004).
16. Chin, A. C. & Parkos, C. a Pathobiology of neutrophil transepithelial migration: implications in mediating epithelial injury. *Annual review of pathology* **2**, 111–143 (2007).
17. LeBleu, V. S., Macdonald, B. & Kalluri, R. Structure and function of basement membranes. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* **232**, 1121–1129 (2007).
18. Aitken, K. J. & Bägli, D. J. The bladder extracellular matrix. Part I: architecture, development and disease. *Nature reviews. Urology* **6**, 596–611 (2009).
19. Janeway, C. & Murphy, K. M. Immunobiology. (2012).
20. Fujita, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature reviews. Immunology* **2**, 346–53 (2002).
21. Gasque, P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Molecular immunology* **41**, 1089–98 (2004).
22. Helmy, K. Y. *et al.* CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* **124**, 915–27 (2006).
23. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **11**, 762–774 (2011).
24. Soehnlein, O. & Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* **10**, 427–39 (2010).
25. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
26. Yona, S. & Jung, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Current opinion in hematology* **17**, 53–9 (2009).
27. Zigmond, E. & Jung, S. Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends in immunology* **34**, 162–168 (2013).
28. Auffray, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science (New York, N.Y.)* **317**, 666–670 (2007).
29. Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**, 159–175 (2013).
30. Silva, M. T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *Journal of Leukocyte Biology* **87**, 93–106 (2009).

31. Filippo, K. De, Henderson, R. B., Laschinger, M. & Hogg, N. Neutrophil Chemokines KC and Macrophage-Inflammatory Protein-2 Are Newly Synthesized by Tissue Macrophages Using Distinct TLR Signaling Pathways. *The Journal of Immunology* **180**, 4308–4315 (2013).
32. Knudsen, E., Iversen, P., Van Rooijen, N. & Benestad, H. Macrophage-dependent regulation of neutrophil mobilization and chemotaxis during development of sterile peritonitis in the rat. *Eur J Haematol.* **69**, 284–296 (2002).
33. Sakanashi, Y. *et al.* Kinetics of macrophage subpopulations and expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in bleomycin-induced lung injury of rats studied by a novel monoclonal antibody against rat MCP-1. *Journal of leukocyte biology* **56**, 741–50 (1994).
34. Standiford, T. J. *et al.* Macrophage Inflammatory Protein-1. *The Journal of Immunology* **151**, 2852–2863 (1993).
35. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine* **204**, 3037–3047 (2007).
36. Shechter, R. *et al.* Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS medicine* **6**, e1000113 (2009).
37. Häger, M., Cowland, J. B. & Borregaard, N. Neutrophil granules in health and disease. *Journal of internal medicine* **268**, 25–34 (2010).
38. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)* **303**, 1532–1535 (2004).
39. Dinarello, C. A. Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol.* **37**, 34–45 (2007).
40. Hafler, D. Cytokines and interventional immunology. *Nature Reviews Immunology* **423**, (2007).
41. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews. Immunology* **6**, 173–82 (2006).
42. Feldman, a M. *et al.* The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* **35**, 537–544 (2000).
43. Beutler, B. & Huffer, C. Van Unraveling Function in the TNF Ligand and Receptor Families Cell Death Genes : Drosophila Enters the Field. *Science* **264**, 667–668 (1994).
44. Parameswaran, N. & Patial, S. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **20**, 87–103 (2011).

45. Wohlleber, D. *et al.* TNF-induced target cell killing by CTL activated through cross-presentation. *Cell reports* **2**, 478–87 (2012).
46. Noti, M., Corazza, N., Mueller, C., Berger, B. & Brunner, T. TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis. *The Journal of experimental medicine* **207**, 1057–66 (2010).
47. Dal Canto, R. a, Shaw, M. K., Nolan, G. P., Steinman, L. & Fathman, C. G. Local delivery of TNF by retrovirus-transduced T lymphocytes exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **90**, 10–4 (1999).
48. Perry, R. T., Collins, J. S., Wiener, H., Acton, R. & Go, R. C. P. The role of TNF and its receptors in Alzheimer ' s disease. **22**, 873–883 (2001).
49. Bedrosian, T. a, Weil, Z. M. & Nelson, R. J. Chronic dim light at night provokes reversible depression-like phenotype: possible role for TNF. *Molecular psychiatry* 1–7 (2012).doi:10.1038/mp.2012.96
50. Blanchet, X., Langer, M., Weber, C., Koenen, R. R. & Von Hundelshausen, P. Touch of chemokines. *Frontiers in immunology* **3**, 175 (2012).
51. David, J. & Mortari, F. Chemokine receptors A brief overview. *Clinical and Applied Immunology Reviews* **1**, 105–125 (2000).
52. Allen, S. J., Crown, S. E. & Handel, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual review of immunology* **25**, 787–820 (2007).
53. Page-McCaw, A., Ewald, A. J. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 221–233 (2007).
54. Rowe, R. G. & Weiss, S. J. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends in cell biology* **18**, 560–574 (2008).
55. Roderfeld, M. *et al.* Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. *Biological chemistry* **388**, 1227–1234 (2007).
56. Sternlicht, M. D. & Werb, Z. HOW MATRIX METALLOPROTEINASES REGULATE CELL BEHAVIOR. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **17**, 463–516 (2001).
57. Duncan, M. J., Li, G., Shin, J.-S., Carson, J. L. & Abraham, S. N. Bacterial penetration of bladder epithelium through lipid rafts. *The Journal of biological chemistry* **279**, 18944–51 (2004).
58. Williams, M. R., Azcutia, V., Newton, G., Alcaide, P. & Luscinskas, F. W. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends in Immunology* **32**, 461–469 (2011).

59. Nielubowicz, G. R. & Mobley, H. L. T. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature reviews. Urology* **7**, 430–441 (2010).
60. Zhang, D. *et al.* A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science (New York, N.Y.)* **303**, 1522–6 (2004).
61. Manuscript, A. Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. *Front Biosci* **14**, 1596–1605 (2010).
62. Summers, C. *et al.* Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology* **31**, 318–324 (2010).
63. Friedl, P. & Weigelin, B. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nature immunology* **9**, 960–969 (2008).
64. Wang, S. *et al.* Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1519–32 (2006).
65. Kolaczowska, E. *et al.* Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis. *Journal of leukocyte biology* **85**, 374–81 (2009).
66. Betsuyaku, T., Shipley, J. M., Liu, Z. & Senior, R. M. Neutrophil emigration in the lungs, peritoneum, and skin does not require gelatinase B. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **20**, 1303–9 (1999).
67. Foxman, E. F., Campbell, J. J. & Butcher, E. C. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *The Journal of cell biology* **139**, 1349–1360 (1997).
68. Goodman, R. *et al.* Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* **154**, 602–611 (1996).
69. Tittel, A. P. *et al.* Kidney dendritic cells induce innate immunity against bacterial pyelonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **22**, 1435–41 (2011).
70. Jacobs, J. P. *et al.* Deficiency of CXCR2, but not other chemokine receptors, attenuates autoantibody-mediated arthritis in a murine model. *Arthritis and rheumatism* **62**, 1921–32 (2010).
71. McDonald, B. & Kubes, P. Chemokines: sirens of neutrophil recruitment-but is it just one song? *Immunity* **33**, 148–149 (2010).
72. David, J. & Mortari, F. Chemokine receptors A brief overview. *Clinical and Applied Immunology Reviews* **1**, 105–125 (2000).

73. Allen, S. J., Crown, S. E. & Handel, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual review of immunology* **25**, 787–820 (2007).
74. Lauterbach, M., O'Donnell, P., Asano, K. & Mayadas, T. N. Role of TNF priming and adhesion molecules in neutrophil recruitment to intravascular immune complexes. *Journal of Leukocyte Biology* **83**, 1423–1430 (2008).
75. Lukac, N. W., Stricter, R. M., Chensue, S. W., Widmer, M. & Kunkel, S. TNF- α Mediates Recruitment of Neutrophils and Eosinophils During Airway Inflammation. *The Journal of Immunology* **154**, 5411–5417 (1995).
76. Zhang, Y., Ramos, B. F. & Jakschik, B. A. Neutrophil Recruitment by Tumor Necrosis Factor from Mast Cells in Immune Complex Peritonitis. *Science (New York, N.Y.)* **258**, 16–18 (1992).
77. Natarajan, S., Kim, J. & Remick, D. G. Acute Pulmonary Lipopolysaccharide Tolerance Decreases TNF- without Reducing Neutrophil Recruitment. *The Journal of Immunology* **181**, 8402–8408 (2008).
78. Crosara-Alberto, D. P. *et al.* Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by Staphylococcus aureus. *British journal of pharmacology* **136**, 645–658 (2002).
79. Craciun, F. L., Schuller, E. R. & Remick, D. G. Early enhanced local neutrophil recruitment in peritonitis-induced sepsis improves bacterial clearance and survival. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **185**, 6930–6938 (2010).
80. Barber, E. M., Fazzari, M. & Pollard, J. W. Th1 Cytokines Are Essential for Placental Immunity to *Listeria monocytogenes*. *Infection and immunity* **73**, 6322–6331 (2005).
81. Skerrett, S. J. *et al.* Role of the type 1 TNF receptor in lung inflammation after inhalation of endotoxin or *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Physiology* **73**, 715–727 (1999).
82. Recher *et al.* Inhibition of meningitis-associated neutrophil apoptosis by TNF- α depends on functional PI3-kinase in monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* **93**, 259–266 (2013).
83. Salamone, G. *et al.* Promotion of neutrophil apoptosis by TNF- α . *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **166**, 3476–3483 (2001).
84. Rainard, Riollet, Poutrel & Paape Phagocytosis and killing of Staphylococcus aureus by bovine neutrophils after priming by tumor necrosis factor- α and the des-arginine derivative of C5a. *Am J Vet Res.* **61**, 951–959 (2000).
85. Lokuta, M. A. & Huttenlocher, A. TNF- promotes a stop signal that inhibits neutrophil polarization and migration via a p38 MAPK pathway Abstract : Neutrophils are a major component of recruitment of neutrophils into areas of

- inflamma- in neutrophils treated with TNF- α causes neutro-. *Journal of Leukocyte Biology* **78**, 210–219 (2005).
86. Rebres, R. a, Vaz, L. E., Green, J. M. & Brown, E. J. Normal ligand binding and signaling by CD47 (integrin-associated protein) requires a long range disulfide bond between the extracellular and membrane-spanning domains. *The Journal of biological chemistry* **276**, 34607–34616 (2001).
87. Orazizadeh, M. *et al.* CD47 associates with alpha 5 integrin and regulates responses of human articular chondrocytes to mechanical stimulation in an in vitro model. *Arthritis research & therapy* **10**, R4 (2008).
88. Howard, T. H. & Wang, D. Calcium ionophore, phorbol ester, and chemotactic peptide-induced cytoskeleton reorganization in human neutrophils. *The Journal of clinical investigation* **79**, 1359–1364 (1987).
89. Chua, F. & Laurent, G. Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrix destruction and accumulation. Chua F, Laurent GJ. *Proc Am Thorac Soc.* **3**, 424–427 (2006).
90. Physiol, A. J. *et al.* Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. *American Journal of Physiology* **279**, L537–L546 (2013).
91. Belaaouaj, A. Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **4**, 1259–1264 (2002).
92. Britigan, B. E., Ratcliffe, H. R., Buettner, G. R. & Rosen, G. M. Binding of myeloperoxidase to bacteria: effect on hydroxyl radical formation and susceptibility to oxidant-mediated killing. *Biochimica et Biophysica Acta* 231–240 (1996).
93. Chou, R. C. *et al.* Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. *Immunity* **33**, 266–278 (2010).
94. Godaly, G., Hang, L., Frendeus, B. & Svanborg, C. Transepithelial neutrophil migration is CXCR1 dependent in vitro and is defective in IL-8 receptor knockout mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **165**, 5287–5294 (2000).
95. De Plaen, I. G. *et al.* Lipopolysaccharide induces CXCL2/macrophage inflammatory protein-2 gene expression in enterocytes via NF-kappaB activation: independence from endogenous TNF-alpha and platelet-activating factor. *Immunology* **118**, 153–163 (2006).
96. Montfort, A. *et al.* FAN stimulates TNF(alpha)-induced gene expression, leukocyte recruitment, and humoral response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **183**, 5369–5378 (2009).
97. Driscoll, K. E. *et al.* Toxicology Letters TNFar and increased chemokine expression in rat lung after particle exposure. *Toxicology letters* 483–489 (1995).

98. Shornick, L. P. *et al.* Airway epithelial versus immune cell Stat1 function for innate defense against respiratory viral infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 3319–3328 (2008).
99. DW, R., ED, C. & BW, W. TNF-alpha-induced regulation and signalling in macrophages. *Immunobiology* 477–490 (1996).
100. Van den Steen, P. E. *et al.* Generation of glycosylated remnant epitopes from human collagen type II by gelatinase B. *Biochemistry* **43**, 10809–16 (2004).
101. Rosenblum, G. *et al.* Direct visualization of protease action on collagen triple helical structure. *PloS one* **5**, e11043 (2010).
102. Van den Steen, P. *et al.* Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **37**, 375–536 (2002).
103. Corry, D. B. *et al.* Overlapping and independent contributions of MMP2 and MMP9 to lung allergic inflammatory cell egression through decreased CC chemokines. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 995–997 (2004).
104. Keck, T., Balcom, J. H., FernÁndez-Del Castillo, C., Antoniu, B. a. & Warshaw, A. L. Matrix metal loproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. *Gastroenterology* **122**, 188–201 (2002).
105. Xu, X. *et al.* A self-propagating matrix metalloprotease-9 (MMP-9) dependent cycle of chronic neutrophilic inflammation. *PloS one* **6**, e15781 (2011).
106. Chakrabarti, S. & Patel, K. D. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils can be released following stimulation . We exam-. *Journal of Leukocyte Biology* **78**, 279–288 (2005).
107. Chakrabarti, S., Zee, J. M. & Patel, K. D. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils : novel pathways for tertiary granule release is rapidly released following stimulation . We exam-. *Journal of Leukocyte Biology* **79**, 214–222 (2006).
108. Sixt, M. & Lämmermann, T. In Vitro Analysis of Chemotactic Leukocyte Migration in 3D Environments. *Springer Science and Business Media* **769**, 149–165 (2011).
109. Liu, X. *et al.* Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. *Nature immunology* **13**, 457–64 (2012).
110. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* **7**, 678–689 (2007).

111. Nourshargh, S., Hordijk, P. L. & Sixt, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 366–378 (2010).
112. Kato, Y. *et al.* Airway epithelial cells promote transmigration of eosinophils in a new three-dimensional chemotaxis model. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **32**, 889–897 (2002).
113. Liu, L., Ridefelt, P., Håkansson, L. & Venge, P. Regulation of human eosinophil migration across lung epithelial monolayers by distinct calcium signaling mechanisms in the two cell types. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **163**, 5649–5655 (1999).
114. Miller, L. A., Usachenko, J., McDonald, R. J. & Hyde, D. M. Trafficking of neutrophils across airway epithelium is dependent upon both thioredoxin- and pertussis toxin- sensitive signaling mechanisms lation into the airways is a multi-step process , in-. *Journal of Leukocyte Biology* **68**, 201–208 (2000).
115. Kim, N. D., Chou, R. C., Seung, E., Tager, A. M. & Luster, A. D. A unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *The Journal of experimental medicine* **203**, 829–35 (2006).
116. Heit *et al.* PTEN functions to “prioritize” chemotactic cues and prevent “distraction” in migrating neutrophils. *Nature Immunology* **9**, 743–752 (2008).
117. Heit, B. *et al.* PTEN functions to “prioritize” chemotactic cues and prevent “distraction” in migrating neutrophils. *Nature immunology* **9**, 743–752 (2008).
118. Heit, B., Tavener, S., Raharjo, E. & Kubes, P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *The Journal of cell biology* **159**, 91–102 (2002).
119. Semmling, V. *et al.* Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nature immunology* **11**, 313–20 (2010).
120. Castellino, F. *et al.* Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* **440**, 890–5 (2006).
121. Smith *et al.* Cognate CD4+ T cell licensing of dendritic cells in CD8+ T cell immunity. *Nature immunology* **5**, 1143–1148 (2004).
122. Flynn, J. L. *et al.* Tumor Necrosis Factor- α Is Required in the Protective Immune Response Against Mycobacterium tuberculosis in Mice. *Immunity* **2**, 561–572 (1995).
123. Choo-Kang, B. S. W. *et al.* TNF-blocking therapies: an alternative mode of action? *Trends in immunology* **26**, 518–522 (2005).

124. Wright, H. L., Moots, R. J., Bucknall, R. C. & Edwards, S. W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford, England)* **49**, 1618–31 (2010).
125. Winthrop, K. L., Chang, E., Yamashita, S., Iademarco, M. F. & LoBue, P. a Nontuberculous mycobacteria infections and anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Emerging infectious diseases* **15**, 1556–61 (2009).
126. Dixon, W. G. *et al.* Rates of serious infection, including site-specific and bacterial intracellular infection, in rheumatoid arthritis patients receiving anti-tumor necrosis factor therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Arthritis and rheumatism* **54**, 2368–76 (2006).