

Untersuchungen zur homöostatischen Regulation der neutrophilen Granulozyten im Mausmodell

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Stefanie Bugl

aus Nürtingen

Tübingen

2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

16.10.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

2. Berichterstatter:

PD Dr. Hans-Georg Kopp

Meiner Familie

Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das Erforschliche erforscht zu haben und das Unerforschliche zu verehren.

Johann Wolfgang von Goethe

Danksagung

*Zusammenkunft ist ein Anfang.
Zusammenhalt ist ein Fortschritt.
Zusammenarbeit ist der Erfolg.
(Henry Ford)*

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Ruth für die Vertretung dieser Dissertation vor der Fakultät.

Mein größter Dank geht an PD Dr. Hans-Georg Kopp für seine Unterstützung, Betreuung, Diskussionsbereitschaft, für seine Motivation, Hilfe und die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten.

Vielen lieben Dank an Dr. Stefan Wirths für seine unermüdliche Geduld beim Poster und am FACS und an Dr. Dr. Martin R. Müller für seine vielfältige Hilfe, Unterstützung und Aufmunterungen.

Ganz lieben Dank an Melanie Märklin und Marina Bechtel für eure Gesellschaft in den frühen Morgen- und späten Abendstunden und eure Hilfe an den Analysentagen. Tina Wiesner, Alexandra Poljak und Elke Malenke sei herzlich gedankt für die hervorragende technische Unterstützung. Bei Elke möchte ich mich zusätzlich für die vielen hilfreichen Tipps, Ratschläge und Diskussionen bedanken, die mir stets eine große Hilfe waren.

Dr. Pamela Stein danke ich ganz besonders für das Depletieren der TLR4^{-/-} Mäuse und das Korrekturlesen dieser Dissertation.

Weiter bedanke ich mich bei allen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. Ganz besonders hervorheben möchte ich dabei Jonas Heitmann, Sabrina Grimm, Theresa Placke, Martina Konantz, Petra Bareiß und Michael Gutknecht.

Zuletzt möchte ich von Herzen meinen Eltern, meinem Ehemann Michael und meiner Schwester Simone danken: Danke für alles!

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Angeborenes und erworbenes Immunsystem.....	1
1.2	Murine hämatopoetische Stammzellendifferenzierung.....	1
1.3	Neutrophile Granulozyten	3
1.3.1	Übersicht.....	3
1.3.2	Antikörper-induzierte Neutropenie-Modelle	6
1.3.3	G-CSF (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor)	7
1.3.4	Regulation und Neutrophilenproduktion	8
1.3.5	Aktuelle Hypothesen zur Regulation der steady-state Granulopoese.....	9
1.3.6	Redundante Regulation der Granulopoese	11
1.4	Bakterielle Einflüsse	12
1.4.1	Emergency and steady-state Granulopoese	12
1.4.2	Keimfreie Versuchstierhaltung.....	13
1.4.3	Toll-Like Rezeptoren	14
1.4.4	MyD88- abhängiger und MyD88-unabhängiger (TRIF-abhängiger) Pathway..	16
1.5	Zielsetzung	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Material	19
2.1.1	Reagenzien.....	19
2.1.1.1	Allgemeine Reagenzien.....	19
2.1.1.2	Antikörper	20
2.1.1.2.1	FACS- Antikörper	20
2.1.1.2.2	In vivo Antikörper	21
2.1.1.3	ELISA	21
2.1.1.4	Puffer.....	21
2.1.2	Geräte.....	22
2.1.3	Verbrauchsmaterial	24

2.2	Methoden	26
2.2.1	Tiere.....	26
2.2.2	Antikörper-induziertes Neutropenie -Modell	26
2.2.3	Weitere <i>in vivo</i> Modelle	27
2.2.3.1	Applikation von rh-G-CSF	27
2.2.3.2	NK- Zelldepletion	27
2.2.3.3	LPS-Injektion	27
2.2.3.4	anti-G-CSF Behandlung mit gleichzeitiger Neutrophilendepletion.....	27
2.2.4	Transfusion von Neutrophilen	28
2.2.5	Transplantation von Knochenmark.....	29
2.2.6	Herstellung von Blutplasma aus murinem peripheren Blut.....	29
2.2.7	Differentialblutbild.....	29
2.2.8	Aufreinigung von Blut für die FACS-Färbung	30
2.2.9	Aufreinigung der Milz.....	30
2.2.10	Aufreinigung von Knochenmark zur Depletionsanalyse.....	31
2.2.10.1	Aufarbeitung der Knochenmarkzellen	31
2.2.10.2	FACS-Färbungen.....	32
2.2.11	ELISA	33
2.2.12	Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen und Stimulation mit LPS ...	34
2.2.13	RNA- Isolation aus Knochenmarkzellen	34
2.2.13.1	DNase I Verdau	35
2.2.13.2	cDNA-Synthese	36
2.2.13.3	β - Actin PCR.....	36
2.2.14	quantitative Real-Time-PCR	37
2.2.15	Paraffin-Einbettung der Femura	38
2.2.16	HE-Färbung.....	39
2.2.17	Ausstriche.....	39
2.2.18	Statistik.....	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Antikörper induzierte Neutropenie in C57BL/6 Mäusen	41
3.1.1	Etablierung der Antikörperdosis	41
3.1.2	Blut.....	42
3.1.3	Knochenmark.....	44
3.1.4	Zytokingehalt im Blutplasma	47

3.1.5	Kontrollexperiment mit NK1.1-Antikörper	49
3.2	Antikörperinduzierte Neutropenie in immundefizienten NSG Mäusen	50
3.2.1	Knochenmark.....	51
3.2.2	Zytokingehalt im Blut.....	53
3.3	Granulozytentransfusion.....	54
3.4	Injektion von rh-G-CSF.....	55
3.4.1	Veränderungen im Knochenmark.....	55
3.4.2	G-CSF Gehalt auf Transkriptionsebene	57
3.5	Germ-free Mäuse (Keimfreie Wildtypmäuse).....	58
3.5.1	Neutrophile Depletion in keimfreien C57BL/6 Mäusen	58
3.5.1.1	Knochenmark.....	59
3.5.1.2	Zytokingehalt im Plasma.....	60
3.5.2	Injektion der maximalen LPS- Dosis im Antikörper.....	61
3.6	Applikation von anti-G-CSF mit gleichzeitiger Neutrophilen-Depletion	63
3.7	Einfluss von Toll-Like Rezeptoren.....	65
3.7.1	C3H/N und C3H/HeJ Mäuse	65
3.7.2	C3H/HeJ/TLR2-KO Mäuse.....	68
3.7.3	TLR4-KO Mäuse	70
3.8	Adaptormolekül-Defiziente Tiere	71
3.8.1	MyD88-KO Mäuse.....	71
3.8.2	TRIF-KO Mäuse	73
3.9	Die Rolle des Egress	75
3.10	MSC in vitro Versuche.....	78
3.11	Transplantation von Knochenmark.....	79
4	DISKUSSION	81
4.1	Regulation der Neutrophilen-Homöostase im steady-state.....	81
4.1.1	Neutrophiler Drehkreuzmechanismus	81
4.1.2	Zellularität im Knochenmark und Spezifität	83

Verzeichnisse

4.1.3	Antikörperwahl zur <i>in vivo</i> Neutrophilen-Depletion	84
4.1.4	Transkriptionales G-CSF	84
4.2	Einfluss von TLRs.....	85
4.2.1	Keimfreie Tiere und Endotoxin	85
4.2.2	Einfluss von Endotoxin im Antikörper	86
4.2.3	Einfluss von TLR4 und TLR2	87
4.2.4	TLR4 knock-out Tiere.....	88
4.2.5	Adaptorproteine MyD88 und TRIF.....	88
4.2.5.1	MyD88 ^{-/-} Tiere.....	89
4.2.5.2	TRIF ^{-/-} Tiere	89
4.2.5.3	Möglicher weiterer Mechanismus über Autophagie.....	90
4.2.6	Rolle des Egress	90
4.3	Transplantation Knochenmark von C3H/N in C3H/HeJ.....	91
4.4	In vitro Experimente mit MSC	92
5	LITERATUR	93
5.1	Weitere Literatur	105
6	ZUSAMMENFASSUNG	106
7	ANHANG.....	108
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	108
7.2	Akademische Lehrer.....	110
8	LEBENS LAUF	111
9	CONTRIBUTIONS.....	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Vereinfachtes Modell der murinen Hämatopoese.....	3
Abbildung 2 Neutrophiler Granulozyt.....	4
Abbildung 3 Aminosäuresequenz von murinem G-CSF.....	7
Abbildung 4 Vereinfachte Darstellung des Feedback-Mechanismus in Adhäsionsmolekül-defizienten Mäusen.....	11
Abbildung 5 TLR 4 vermittelter Signaltransduktionsweg.....	16
Abbildung 6 Applikationsschema der Antikörpergabe und Veränderungen im Blut.....	42
Abbildung 7 FACS des peripheren Bluts nach neutrophiler Depletion.....	43
Abbildung 8 FACS-Analyse des Knochenmarks nach antikörper-induzierter Neutropenie.....	45
Abbildung 9 Absolute Zellzahlen im Knochenmark in neutropenen C57BL/6 an Tag 8.....	46
Abbildung 10 Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Knochenmarks.....	47
Abbildung 11 G-CSF und M-CSF-Gehalt im Plasma von C57BL/6.....	48
Abbildung 12 Effektive Depletion der NK-Zellen nach Gabe von anti-NK1.1.....	49
Abbildung 13 Knochenmarkanalyse der NK1.1 injizierten C57BL/6 Tiere.....	50
Abbildung 14 Relative Verschiebungen im Knochenmark neutropener NSG Mäuse.....	51
Abbildung 15 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener NSG Mäuse.....	52
Abbildung 16 G-CSF und M-CSF-Gehalt im Plasma von NSG-Mäusen nach Depletion.....	53
Abbildung 17 Veränderungen des G-CSF Gehalts vor und nach Transfusion von Neutrophilen.....	55
Abbildung 18 Relative Veränderungen im Knochenmark bei rh-G-CSF behandelten Mäusen.....	56
Abbildung 19 Absolute Veränderungen im KM bei rh-G-CSF behandelten C57BL/6 Mäusen.....	56
Abbildung 20 Ratio von G-CSF auf Transkriptionsebene.....	57
Abbildung 21 Bestimmung der Depletionseffizienz in keimfreien C57BL/6 Mäusen.....	59
Abbildung 22 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener keimfreier C57BL/6 Mäuse.....	60
Abbildung 23 G-CSF im Plasma von keimfreien C57BL/6 im Vergleich mit C57BL/6.....	61
Abbildung 24 Knochenmarkanalyse der mit 2 EU LPS injizierten C57BL/6 Mäuse.....	62
Abbildung 25 Peripheres Blut der anti-G-CSF behandelten und neutrophil-depletierten C57BL/6.....	63
Abbildung 26 Absolute Progenitorzahlen der anti-G-CSF behandelten und neutrophil-depletierten C57BL/6.....	64
Abbildung 27 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener C3H/N Mäuse.....	66
Abbildung 28 Relative Veränderungen im Knochenmark neutropener C3H/HeJ-Mäusen.....	67
Abbildung 29 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener C3H/HeJ Mäuse.....	67
Abbildung 30 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener C3H/HeJ/TLR2-KO Mäuse.....	68
Abbildung 31 G-CSF im Plasma von unterschiedlichen neutropenen Mäusen auf C3H-background.....	69
Abbildung 32 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener TLR4 ^{-/-} Mäuse.....	70
Abbildung 33 G-CSF im Plasma von TLR4 ^{-/-} Mäusen im Vergleich mit C57BL/6.....	71
Abbildung 34 G-CSF im Plasma von MyD88 ^{-/-} Mäusen im Vergleich mit C57BL/6.....	72
Abbildung 35 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener MyD88 ^{-/-} Mäuse.....	73
Abbildung 36 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener TRIF ^{-/-} Mäuse.....	74
Abbildung 37 G-CSF im Plasma von TLR4 ^{-/-} und TRIF ^{-/-} Mäusen im Vergleich mit C57BL/6.....	75
Abbildung 38 CXCL12 Level auf Transkriptionsebene in unterschiedlichen Mäusen.....	77
Abbildung 39 G-CSF Transkription der LPS stimulierten MSC.....	79
Abbildung 40 Zusammenfassende Abbildung des positiven Feedback-Mechanismus.....	107

1 Einleitung

1.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus zwei verschiedenen Komponenten, der angeborenen Immunantwort und der erworbenen Immunantwort.

Das angeborene Immunsystem hat die Aufgabe, schnell auf eindringende Krankheitserreger zu reagieren um eine Ausbreitung der Pathogene zu verhindern. Zu den Komponenten der angeborenen Immunität gehören Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, NK- Zellen und Granulozyten (Janeway, Lehrbuch der Immunologie). Die Gruppe der Granulozyten teilt sich auf in drei differente Subklassen: neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und basophile Granulozyten.

Das angeborene Immunsystem hat eine eingeschränkte Spezifität, es erkennt Muster PAMPs, handelt schnell, ist aber nicht besonders spezifisch. Eine bessere Spezifität und hohe Effektivität bei der Bekämpfung von Krankheitserregern wird durch Zellen der erworbenen Immunantwort erreicht, die B- und T- Lymphozyten (Janeway, Lehrbuch der Immunologie).

1.2 Murine hämatopoetische Stammzellendifferenzierung

Das etablierte Modell der hämatopoetischen Stammzellendifferenzierung in adulten Mäusen geht von einer hämatopoetischen Stammzelle aus (Osawa, Hanada et al. 1996), die sich über verschiedene Zwischenstufen entweder in die myeloische oder lymphoide Linie entwickelt und zu den unterschiedlichen Zellarten ausdifferenziert (Akashi, Traver et al. 2000; Ceredig, Rolink et al. 2009).

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) haben die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern. Diese Fähigkeit verlieren sie jedoch mit fortschreitender Differenzierung. HSC sind in der Maus stark in der lineage negativen, Stammzellantigen 1 (Sca-1) und

1. Einleitung

Stammzellfaktor (c-kit) positiven (LSK)- Population angereichert (Okada, Nakauchi et al. 1992; Osawa, Hanada et al. 1996; Osawa, Nakamura et al. 1996).

Als lineage negative Zellen werden Zellen bezeichnet, die negativ für CD3 (Marker für T-Zellen), B220 (Marker für B-Zellen, T-Zellen), Ter-119 (Erythrozyten), CD11b (Monozyten, Makrophagen) und Gr-1 (Granulozyten) sind. Diese Zellen können durch einen lineage negativen Antikörpercocktail markiert werden.

Der nächste Entwicklungsschritt ausgehend von HSC sind multipotente Progenitorzellen (MPP). Diese Zellen können sich nun weiter in die lymphoide Linie oder die myeloische Linie differenzieren.

In der lymphoiden Linie sind die differenzierungschronologisch nächsten Vorläuferzellen die gemeinsamen lymphoiden Progenitoren (CLP) aus denen sich T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen entwickeln können (Akashi, Traver et al. 1999).

In der myeloischen Linie geht die Differenzierung von den gemeinsamen myeloischen Vorläufern (CMP) aus, welche sich zum einen zu $lin^{-}/ Sca-1^{-}/ c-kit^{+}/ CD34^{+}/ CD16/32^{+}$ Granulozyten-Makrophagen-Progenitoren (GMP) und im Anschluss zu Granulozyten oder Monozyten/Makrophagen entwickeln können. Der andere Teil führt von den $lin^{-}/ Sca-1^{-}/ c-kit^{+}/ CD34^{+}/ CD16/32^{low}$ gemeinsamen myeloischen Progenitoren (CMP) zu den $lin^{-}/ Sca-1^{-}/ c-kit^{+}/ CD34^{-}/ CD16/32^{-}$ Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitoren (MEP) zur Bildung von Megakaryozyten/Thrombozyten oder Erythrozyten (Akashi, Traver et al. 1999; Akashi, Traver et al. 2000).

Die nachstehende Abbildung zeigt ein vereinfachtes Schema der murinen hämatopoetischen Stammzelldifferenzierung in adulten Mäusen (modifiziert nach (Akashi, Traver et al. 2000; Ceredig, Rolink et al. 2009)).

Eine ähnlich verlaufende Stammzelldifferenzierung wird auch im Menschen beschrieben.

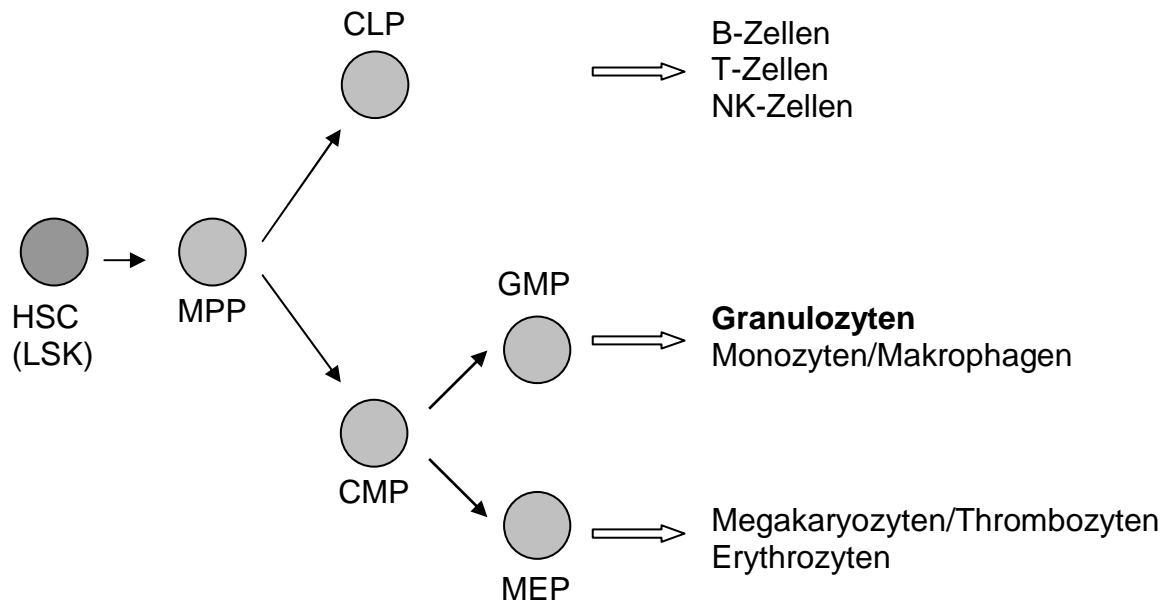


Abbildung 1 Vereinfachtes Modell der murinen Hämatopoese

Modell modifiziert nach (Akashi, Traver et al. 2000; Ceredig, Rolink et al. 2009)

1.3 Neutrophile Granulozyten

1.3.1 Übersicht

Neutrophile Granulozyten sind Blutzellen der angeborenen Immunabwehr und bilden den größten Anteil an Leukozyten im menschlichen Blut. Sie dienen als erste Barriere gegen eindringende Krankheitserreger. Die Normalwerte liegen beim Menschen bei 3500 – 9500 Leukozyten/ μ l, davon sind ungefähr 50-70 % Neutrophile (Janeway, Lehrbuch der Immunologie). Bei der Maus (C57BL/6 Wildtyp-Mäusen) liegen die Normwerte der Leukozyten bei 2600 - 3500/ μ l, davon sind ungefähr 7,5 - 30 % Neutrophile (Jackson, Physiologisches Datenblatt).

Dem Wortstamm nach kommt Granulozyt aus dem Lateinischen für *granulum*, Körnchen und dem altgriechischen *cytos*, Hülle.

Neutrophile Granulozyten sind stark granuliert. Die Granula enthalten Enzyme und Proteine, welche an der Abwehr von Mikroorganismen beteiligt sind. Bei der Phagozytose von Mikroorganismen kommt es zur Degranulation, danach sterben

1. Einleitung

neutrophile Granulozyten rasch ab. Wenn sich dies zum Beispiel an der Hautoberfläche ereignet, kommt es zur Bildung von Eiter (Janeway, Lehrbuch der Immunologie).

Eine der wichtigsten Komplikationen in der Krebstherapie, der fehlende Abwehrschutz gegen eindringende Pathogene nach einer zytotoxischen Chemotherapie wird als Neutropenie, d.h. Verminderung der neutrophilen Granulozyten bezeichnet.



Abbildung 2 Neutrophiler Granulozyt

Neutrophiler Granulozyt des peripheren Blutes aus dem Blutausschlag einer C57BL/6 Maus. Der Ausschlag wurde nach der Methode von Pappenheim gefärbt und mit der Vergrößerung (63x) fotografiert.

Da Neutrophile die kürzeste Lebenszeit aller Blutzellen (nachdem sie aus dem Knochenmark in den Blutstrom gelangt sind) haben, müssen die Bildung und der Turnover sehr dynamisch verlaufen. Es werden daher täglich bis zu 100 Milliarden Neutrophile im Knochenmark nachgebildet (Dancey, Deubelbeiss et al. 1976; Demetri and Griffin 1991).

Damit im Bedarfsfall genügend neutrophile Granulozyten vorliegen muss es somit einen Sensor geben, welcher die Produktion und Freisetzung der Neutrophilen aus dem Knochenmark reguliert. Dieser Sensor kann zugleich eine Drehkreuzfunktion einnehmen, indem er als Zähler fungiert und somit eine ganz spezielle Art von Sensor darstellt. Dieser Drehkreuzmechanismus wurde zum ersten Mal 1991 vorgeschlagen (Demetri and Griffin 1991).

1. Einleitung

Dabei wurde allerdings nicht die Lokalisation des Sensors geklärt, weder auf zellulärer noch auf molekularer Ebene. Inzwischen weiß man, dass sich dieser Sensor nicht am Ausgang des Knochenmarks befindet, da die Neutrophilenfreisetzung aus dem Knochenmark auch bei Adhäsionsmolekül-defizienten Mäusen, bei denen keine Neutrophile in die Peripherie transmigrieren können, funktioniert (Forlow, Schurr et al. 2001; Horwitz, Mizgerd et al. 2001).

Im Jahr 2005 beschrieben Stark et al. das aktuell gültige Modell eines neutrophilen homöostatischen Feedback-Mechanismus in Adhäsionsmolekül-defizienten Mäusen. Dieser Mechanismus ist abhängig von IL-17, IL-23, T-Zellen und G-CSF.

Die Gruppe schlägt aus ihren erhaltenen Daten ein „Drehkreuz“ im Gastrointestinaltrakt vor, da in ihrem beschriebenen Modell Neutrophile in den Magen-Darm-Trakt transmigrieren und dort von Makrophagen und dendritischen Zellen phagozytiert werden. Dies führt zu einer Absenkung der IL-23 Produktion.

In Wildtypmäusen wird das meiste IL-17 in den Mesenteriallymphknoten gebildet. Zudem wird im Gastrointestinaltrakt, speziell im Dünndarm, das Immunsystem mit Antigenen der endogenen bakteriellen Flora getriggert. Dies führt zur Freisetzung von IL-23 aus dendritischen Zellen und Makrophagen (Stark, Huo et al. 2005).

Allerdings wird in späteren Publikationen deutlich, dass dieser Mechanismus wohl so nur in Adhäsionsmolekül-defizienten Mäusen so stattfindet. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass die kurzzeitige Neutralisation von IL-17 mit Hilfe von Antikörpern die Neutrophilenzahlen in Wildtypmäusen nicht verändern (Furze and Rankin 2008). Das Fehlen von Makrophagen in den c-FLIP^{fl/fl} LysM-cre Mäusen führt zur Neutrophilie und einem Anstieg von G-CSF, aber nicht zu erhöhten IL-17 Spiegeln (Gordy, Pua et al. 2011). Zudem verläuft die gesteigerte Granulopoese nach antikörper-vermittelten Neutropenie, oder nach einer Entzündung mit dem Impfadjuvans Alum unabhängig von IL-17 (Cain, Snowden et al. 2011).

Daraus lässt sich schließen, dass es andere, redundante Regulationen der Granulopoese gibt/geben muss.

Zusammengefasst sind die Hauptfaktoren der Regulation von peripheren Neutrophilenzahlen die Produktion, die Freisetzung aus dem Knochenmark, Margination und Abbau.

1.3.2 Antikörper-induzierte Neutropenie-Modelle

Ly-6 Proteine gehören zur Familie der GPI- Ankerproteine, von denen viele an der Regulation der Aktivierung und Adhäsion muriner und humaner Leukozyten beteiligt sind (Fleming, Fleming et al. 1993). Ly-6G wird unter anderem auf murinen Neutrophilen exprimiert (Fleming, Fleming et al. 1993).

Um eine neutrophile Depletion in Mäusen *in vivo* zu erreichen, wurde bis vor einigen Jahren hauptsächlich der Anti-Ly-6G Antikörper Klon RB6-8C5 eingesetzt (Czuprynski, Brown et al. 1994; Bliss, Gavrilescu et al. 2001). Dieser Antikörper kreuzreagiert allerdings auch mit Ly-6C, welches auf Subpopulationen von Monozyten, T- Zellen, dendritischen Zellen und Neutrophilen exprimiert wird. Dadurch kommt es bei einer *in vivo* Depletion mit anti-Ly-6G/C Klon RB6-8C5 auch zu einer Depletion von CD8 positiven T-Zellen (Matsuzaki, Tsuji et al. 2003).

Es wird beschrieben, dass die *in vivo* Depletion zu einem Verlust der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blutstrom führt, aber nicht aus Leber, Milz und Lunge (Goossens, Jouin et al. 1991) und auch nicht aus dem Knochenmark (Ribechini, Leenen et al. 2009). Letztere Autoren machen dafür Mcl-1 verantwortlich. Neutrophile im Knochenmark exprimieren hohe Level von Ly-6C, Ly-6G und Mcl-1. Mcl-1 wirkt dem pro-apoptotischen Effekt des Ly-6G Signalweges entgegen. Der Mechanismus der neutrophilen Depletion ist Komplementsystem-unabhängige Cytotoxizität und beinahe FcRezeptor-unabhängig, da der Mechanismus auch in FcR^{-/-} Mäusen funktioniert (Abbitt, Cotter et al. 2009; Cain, Snowden et al. 2011).

Um eine spezifischere neutrophile Depletion zu erreichen, wird inzwischen häufig der anti-Ly-6G Klon 1A8 eingesetzt, da er spezifisch Ly-6G bindet und somit nur zu einer *in vivo* Depletion von neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut führt (Fleming, Fleming et al. 1993; Daley, Thomay et al. 2008).

1.3.3 G-CSF (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor)

G-CSF ist allgemein akzeptiert als wichtigster Faktor bei der Freisetzung und Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark und wird klinisch zur Stammzellmobilisierung eingesetzt.

Es wurde Mitte der 1980er Jahre von Welte et al. entdeckt und kloniert (Welte, Bonilla et al. 1987). Mit der Entdeckung und Charakterisierung dieses Faktors konnte die Neutrophilen – Homöostase näher untersucht und verstanden werden.

Murines G-CSF ist ein hydrophobes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 22,4 kDa und einer Länge von 208 Aminosäuren. Es ist O-Glykosyliert, besitzt 2 Disulfidbrücken und gehört zur IL-6 Superfamilie (Swiss-Prot).

Nachfolgend die Aminosäuresequenz von murinem G-CSF.

```
MAQLSAQRMMKLMALQLLLWQSALWSGREAVPLVTVSALPPSLPLPRSFLKLSLEQ  
VRKIQASGSVLLLEQLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPKASLSGCSSQALQQTQCLSQ  
LHSGLCCLYQGLLQALSGISPALPTLDLLQLDVANFATTIWQQMENLGVAPTQPTQ  
SAMPFTSAFQRRAGGVLAISYLQGFLETARLALHHLA
```

Abbildung 3 Aminosäuresequenz von murinem G-CSF

Generell wird das Knochenmarkstroma als wichtigste Quelle für G-CSF benannt. Es ist jedoch nicht bekannt, welcher der kultivierbaren Stroma-Zellarten den quantitativ wichtigsten Beitrag leistet (Panopoulos 2008, Watari 1994).

Weitere Experimente zeigten, dass Makrophagen aus dem Knochenmark *in vitro* unter Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) G-CSF produzieren (Nishizawa, Tsuchiya et al. 1990; Pradervand, Maurya et al. 2006; Panopoulos and Watowich 2008). Zudem ist bekannt, dass IL-17 einen upstream regulator für G-CSF *in vivo* darstellt (Fossiez, Djossou et al. 1996).

G-CSF defiziente- (*gcsf*^{-/-}) oder G-CSF Rezeptor defiziente (*gcsfr*^{-/-}) Mäuse sind neutropen. Die Neutrophilenzahlen im peripheren Blut betragen nur ungefähr 15-30% der Werte, die in Wildtyp-Geschwistertieren vorliegen. Die Anzahl an myeloischen

Progenitorzellen im Knochenmark ist zudem signifikant erniedrigt (Lieschke, Grail et al. 1994).

Rekombinantes, humanes G-CSF (Filgrastim) wird klinisch als Medikament für den Menschen eingesetzt. Zugelassen ist es zur Verkürzung der Dauer von Neutropenien, zur Verminderung der Häufigkeit neutropenen Fiebers unter Chemotherapie und zur Mobilisierung peripherer Blutstammzellen (Produktmonographie Filgrastim HEXAL, HEXAL, 2010).

1.3.4 Regulation und Neutrophilenproduktion

Es gibt unterschiedliche Wege, wie die Regulation von G-CSF und die Produktion von Neutrophilen ablaufen kann. Allgemein werden die Neutrophilenzahlen im peripheren Blut nicht nur durch die Produktion bestimmt, sondern auch durch die Freisetzung im neutrophilen Knochenmark bestimmt. Im steady-state befinden sich nur 1-2% der reifen murinen Neutrophilen in der Zirkulation (Semerad, Liu et al. 2002). Die Freisetzung der Neutrophilen aus dem Knochenmark wird durch die Interaktion von CXCL12 und CXCR4 reguliert (Petit, Szyper-Kravitz et al. 2002).

Die Stimulation mit Zytokinen, z.B. G-CSF führt zu einer verlängerten Lebensdauer der Neutrophilen (Adachi, Kubota et al. 1994).

Zum einen können inflammatorische Stimulantien (z.B. LPS, TNF α und IL-1 β) auf Zielzellen wirken (Demetri and Griffin 1991). Dies induziert eine G-CSF Expression über intrazelluläre Signalmoleküle wie NF- κ B und C/EBP β (Dunn, Coles et al. 1994). Bei G-CSF^{-/-} Mäusen sinkt die Anzahl der peripheren Neutrophilen auf 20 bis 30 % von Wildtyp-Mäusen. Die Gabe von G-CSF hebt den durch den knock-out entstandenen Effekt bei den Neutrophilenzahlen auf. Bei Infektionen kommt es zu einer gesenkten Neutrophilen- und Monozytensteigerung, im Vergleich zur Antwort in G-CSF^{+/+} Tieren (Lieschke, Grail et al. 1994).

Zum anderen kann die Signaltransduktion über den IL-17R von TH₁₇-Zellen über die Produktion von IL-17 aktiviert werden und dadurch zur Expression von G-CSF führen (Ye, Rodriguez et al. 2001). G-CSF kann weiterhin durch transkriptionale und post-

transkriptionale Mechanismen reguliert werden (Ernst, Ritchie et al. 1989; Falkenburg, Harrington et al. 1991).

Zirkulierende Neutrophile regulieren in einem negativen Feedback-Mechanismus die Produktion von IL-23 und TH₁₇-Zellen. Dies bildet einen Feedback-Mechanismus, welcher die G-CSF Synthese kontrolliert ((Stark, Huo et al. 2005; Smith, Zarbock et al. 2007; reviewed in (Panopoulos and Watowich 2008))).

Allerdings beschreiben diese Wege die Neutrophilen-Homöostase nicht in ihrem kompletten Umfang.

1.3.5 Aktuelle Hypothesen zur Regulation der steady-state Granulopoese

IL-17 und IL-23 gelten als wichtigste Zytokine bei der Regulation der Granulopoese (Stark, Huo et al. 2005; Smith, Zarbock et al. 2007; Panopoulos and Watowich 2008). Interleukine sind zu den Peptidhormonen gehörende Zytokine, die von Leukozyten produziert werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden bereits 37 Interleukine identifiziert (Tete, Tripodi et al. 2012).

IL-17 gehört zu einer Zytokinfamilie mit den Untergruppen IL-17A-F und spielt eine Rolle bei der Pathogenabwehr, bei inflammatorischen Erkrankungen und bei der angeborenen und erworbenen Immunantwort (Pappu, Ramirez-Carrozzi et al. 2011). IL-17 produzierende Zellen werden von IL-23 stimuliert. Dabei induziert IL-23 auch die IL-17-Produktion in RAG-defizienten Mäusen, welche keine B- oder T-Zellen haben (Uhlig, McKenzie et al. 2006).

Gebildet wird IL-17 hauptsächlich von T-Zell-Subpopulationen wie TH₁₇-Zellen, NK T-ähnliche Tn-Zellen und aktivierten CD4⁺ αβ-T-Zellen. Allerdings können auch myeloische Zellen IL-17 produzieren (Cua and Tato 2010).

Li et al. konnten in einem Modell einer akuten Nieren- Ischämie-Reperfusion-Verletzung in Mäusen zeigen, dass IL-23 die nachgeschalteten IL-17 vermittelnden Signaltransduktionswege aktiviert. Dies führte zu bekannten Veränderungen, wie der Produktion von spezifischen Zytokinen und dem Rekrutieren von Neutrophilen. Das

1. Einleitung

meiste des anfänglich freigesetzten IL-17 in der Niere wurde dabei allerdings nicht von Lymphozyten, sondern von CD11b⁺Gr1⁺- Zellen, also von myeloischen Zellen produziert (Li, Huang et al. 2010).

Das zweite wichtige Zytokin, IL-23, ist ein Heterodimer, bestehend aus der Untereinheit IL-23 α und der Untereinheit IL-12B.

Verbunden sind diese Untereinheiten über eine Disulfidbrücke. Sezerniert wird IL-23 von dendritischen Zellen und Makrophagen (Oppmann, Lesley et al. 2000).

Die Arbeitsgruppe von Klaus Ley (Stark, Huo et al. 2005) beschrieb 2005 ein Modell des momentan gültigen neutrophilen homöostatischen IL-17/IL-23 abhängigen Feedback-Mechanismus in Adhäsionsmolekül- (CD 18, E/P-Selektin, $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1), core2-glucosaminyltransferase (Core-2) und E/P/L-Selektin) defizienten Mäusen.

Bei diesen Tieren konnten keine neutrophilen Zellen in das Gewebe transmigrieren. Dadurch konnten apoptotische Neutrophile nicht durch Makrophagen und dendritische Zellen phagozytiert werden. Dies hatte zur Folge, dass die Produktion von IL-23 nicht gehemmt wurde.

In Adhäsionsmolekül-defizienten Mäusen wird postuliert, dass Makrophagen und dendritische Zellen IL-23 produzieren. Dies stimuliert T-Zell-Subklassen IL-17 zu produzieren. Es kommt zu einem Anstieg von IL-17, zu einem Anstieg von G-CSF und dadurch zu einer gesteigerten Granulopoese.

Somit können mehr Neutrophile zirkulieren und ins Gewebe transmigrieren um später apoptotisch zu werden und phagozytiert werden zu können (Stark, Huo et al. 2005).

1. Einleitung

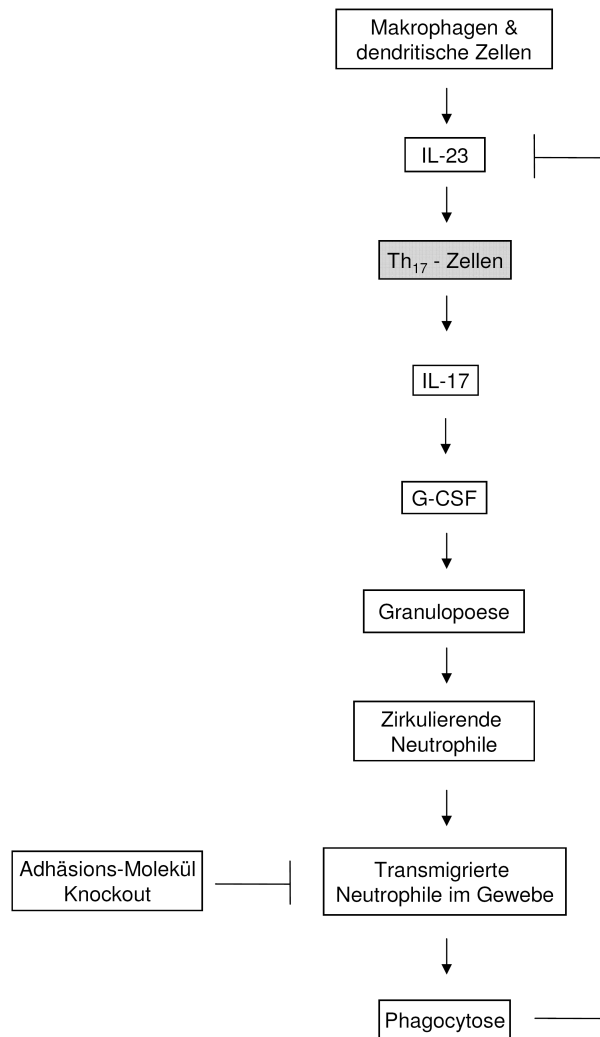


Abbildung 4 Vereinfachte Darstellung des Feedback-Mechanismus in Adhäsionsmolekül-defizienten Mäusen

Dieser Feedback-Mechanismus (modifiziert nach Stark et al. (Stark, Huo et al. 2005)) hat nur Gültigkeit in Adhäsionsmolekül-defizienten Mäusen.

1.3.6 Redundante Regulation der Granulopoese

Die Anzahl der Neutrophilen im peripheren Blut wird nicht nur durch die Produktion, sondern auch durch die Freisetzung aus dem Knochenmark bestimmt. Im steady-state zirkulieren nur 1-2 % der reifen Neutrophilen in der Peripherie (Semerad, Liu et al. 2002). Die Freisetzung der Neutrophilen aus dem Knochenmark „Egress“ wird dabei durch die Interaktion von CXCL12 und CXCR4 reguliert (Petit, Szyper-Kravitz et al. 2002).

In C-FLIP^{fl/fl} Lys-M cre Mäusen fehlen Makrophagen durch einen konditionalen knock-out. Dies führt zwar zu erhöhten G-CSF Spiegeln und Neutrophilie, hat aber keinen Einfluss auf den IL-17 Spiegel (Gordy, Pua et al. 2011). Auch die antikörpervermittelte Neutralisation von IL-17 hat keinen Einfluss auf die Neutrophilenzahlen (Furze and Rankin 2008).

Die gesteigerte Granulopoese bei der antikörper-induzierten Neutropenie oder der Entzündung mittels Alum wurde als unabhängig von IL-17 beschrieben (Cain, Snowden et al. 2011). Alum (hydratisiertes Kalium-Aluminiumsulfat) wird häufig als Adjuvans in der Produktion von Impfstoffen eingesetzt.

Verkompliziert wird die Klärung der Rolle von IL-17 durch die vielen Synthesorte, die IL-17 aufweist und somit IL-17 sowohl eine Rolle in der angeborenen, als auch in der erworbenen Immunantwort spielen lässt.

1.4 Bakterielle Einflüsse

1.4.1 Emergency and steady-state Granulopoese

Es ist bekannt, dass die bakterielle Besiedlung die Entwicklung der angeborenen und erworbenen Immunabwehr beeinflusst. Bei der emergency Granulopoese, welche im allgemeinen Sprachgebrauch die Granulopoese bei einer akuten Infektion darstellt, findet die Vermittlung durch mikrobielle Komponenten statt. Sie wurde bereits ziemlich genau charakterisiert (Basu, Hodgson et al. 2000); (reviewed in (Panopoulos and Watowich 2008)).

Erstmalige Erwähnung fand sie bei der experimentellen, intraperitonealen Infektion von G-CSF/GM-CSF defizienten Mäusen mit Hefen (*Candida albicans*), welche als Antwort eine starke Neutrophilie zeigten (Basu, Hodgson et al. 2000). Die emergency Granulopoese wird dabei als unabhängig von G-CSF und GM-CSF beschrieben (Basu, Hodgson et al. 2000).

Seit der ersten Beschreibung wird versucht, die Unterschiede zwischen der Granulopoese im Infektionsfall und der Granulopoese im steady-state zu beschreiben und zu charakterisieren.

Die konzeptionellen Unterschiede zwischen der emergency Granulopoese und der Hämatopoese im steady-state werden durch C/EBP dargestellt. C/EBP gelten als wichtige Regulatoren der Granulopoese.

C/EBP α gilt als Hauptregulator der steady-state Granulopoese. Dies wurde durch C/EBP $\alpha^{-/-}$ Mäuse festgestellt. Diese Mäuse besitzen keine Granulozyten, da die Granulozytenbildung durch eine Blockade auf dem Differenzierungsstand der CMP-Zellen verhindert wird (Zhang, Zhang et al. 1997; Zhang, Iwasaki-Arai et al. 2004). Nach der Differenzierung von CMP zu GMP wird C/EBP α allerdings nicht mehr für die Entwicklung reifer Granulozyten benötigt, da die Zytokine ab diesem Zeitpunkt abhängig von C/EBP β sind. C/EBP β ist essentiell für die emergency Granulopoese. Das Fehlen von C/EBP β spielt jedoch keine Rolle in der steady-state Granulopoese (Screpanti, Romani et al. 1995). Eine neuere Publikation zeigt allerdings, dass sowohl C/EBP α als auch C/EBP β eine Rolle bei der Differenzierung und Produktion von Neutrophilen im Infektionsfall spielen (Cain, Snowden et al. 2011).

1.4.2 Keimfreie Versuchstierhaltung

Die Besiedlung mit bakterieller Flora spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Immunsystems im Magen-Darm-Trakt. Peptidoglykane, die von kommensalen Bakterien produziert werden, können in die Peripherie austreten und zu einer gesteigerten Reifung von Neutrophilen in einer NOD 1 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1) abhängigen Weise führen (Clarke, Davis et al. 2010).

Im Allgemeinen leben Mäuse in einer Versuchstierhaltung in SPF-Haltung. Allerdings sind sie nicht frei von bakterieller Besiedlung. Das wird nur bei sogenannten keimfreien (germ-free) Mäusen erreicht.

Diese Tiere werden entweder durch Kaiserschnittgeburt oder durch Embryotransfer in keimfreie Empfängermäuse generiert, in speziellen, keimfreien Isolatoren zur Welt gebracht, dort aufgezogen und gehalten (Inzunza, Midtvedt et al. 2005). Diese Tiere

unterscheiden sich durch ihre spezielle Haltung zu Tieren des gleichen Stammes in SPF-Haltung. Keimfrei gehaltene Tiere haben zum Beispiel veränderte Proteingrundspiegel im Plasma, unterschiedliche Morphologien des Gastrointestinaltraktes und zum Teil andere Immunantworten auf eindringende Pathogene im Vergleich zu Tieren in SPF-Haltung (Smith, McCoy et al. 2007).

Als Beispiel wurde bei Ratten, welche keimfrei gehalten werden, eine im Vergleich mit SPF gehalten Ratten um 90 % reduzierte Anzahl an Neutrophilen im peripheren Blut gefunden (Ohkubo, Tsuda et al. 1999). Zudem sind diese Tiere nicht vollständig entwickelt und haben durch den Mangel an Kontakt mit Bakterien funktionelle Defizite in fast allen Organen und auch in der Immunität, z.B. durch ein reduziertes lymphatisches System und kleinere Mesenteriallymphknoten (Smith, McCoy et al. 2007).

Ein mögliches Drehkreuz zur Regulation der Neutrophilen-Homöostase im Gastrointestinaltrakt sollte von daher kaum benutzt werden, da Neutrophile durch das Fehlen von kommensalen Bakterien keinen Grund haben sollten, in den Magen-Darm-Trakt zu wandern um dort eindringende Pathogene zu bekämpfen.

1.4.3 Toll-Like Rezeptoren

Das Toll Protein wurde ursprünglich in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert. Mitte der 1990er Jahre wurde der erste Toll-Like Rezeptor (TLR) entdeckt. TLRs werden auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert und von Strukturmotiven auf Bakterien, Viren und Pilzen, sogenannten pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) stimuliert (Medzhitov and Janeway 2002; Akira, Uematsu et al. 2006). Es wurden bisher 10 TLR im Menschen identifiziert und 13 TLR in der Maus. Diese TLRs haben jeweils unterschiedliche Liganden (Gordon 2002; Takeda and Akira 2004; McCoy and O'Neill 2008).

TLRs spielen eine zentrale Rolle in der Initiierung von Immunantworten gegen eine Anzahl von Pathogenen. Allerdings wurde im Laufe der Zeit klar, dass auch andere pattern-recognition Receptors (PPRs) wie z.B. NOD-like Rezeptoren bei der Erkennung von PAMPs eine Rolle spielen ((Inohara, Ogura et al. 2001); reviewed in (Kawai and Akira 2011)).

TLR 1, 2, 4, 5 und 6 sind an der Zelloberfläche lokalisiert und erkennen hauptsächlich mikrobielle Membrankomponenten. TLR 3, 7, 8 und 9 sind hingegen in intrazellulären Vesikeln exprimiert und erkennen dort Nukleinsäuren (Janeway, Lehrbuch der Immunologie; (Blasius and Beutler 2010)).

Einer der wichtigsten und bekanntesten Toll-Like Rezeptoren ist TLR 4, welches ein Sensor für LPS und damit für gram-negative Bakterien ist. Dies hat die Gruppe um Beutler durch Versuche mit C3H/HeJ-Mäusen gezeigt, welche eine Spontanmutation (loss-of-function) im TLR4 Gen haben (Poltorak, He et al. 1998). Durch diese Mutation wird bei den Tieren die Immunantwort auf LPS gestört (Poltorak, He et al. 1998) (reviewed in (Kawai and Akira 2011)).

Die LPS-Stimulation läuft über Interaktionen mit unterschiedlichen Proteinen: LPS bindendes Protein, CD14, MD-2 und TLR4 (Gioannini and Weiss 2007).

Nach der LPS-Erkennung wird TLR 4 oligomerisiert und interagiert mit Toll-interleukin-1 Rezeptor Domänen (TIR Domänen).

Es gibt 5 verschiedene TIR-Domäne enthaltende Adaptorproteine: MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein), TRIF (TIR domain –containing adaptor inducing IFN- β), TRAM (TRIF-related adaptor molecule) und SARM (sterile α and HEAT-Armadillo motifs-containing protein) (Fitzgerald, Rowe et al. 2003; O'Neill and Bowie 2007; Lu, Yeh et al. 2008).

Die Adaptorproteine MyD88 und TRIF sind zuständig für die Signalweiterleitung bei TLR. Bei TLR 4 existieren ein MyD88-abhängiger und ein MyD88-unabhängiger, dafür TRIF-abhängiger Signalweg. Der MyD88-abhängige Pathway ist verantwortlich für die proinflammatorische Zytokinproduktion, während der MyD88-unabhängige Weg die Induktion von Typ I Interferonen z.B. IFN β und Interferon-induzierten Genen vermittelt z.B. IRF-3 (Lu, Yeh et al. 2008).

1.4.4 MyD88- abhängiger und MyD88-unabhängiger (TRIF-abhängiger) Pathway

MyD88 wurde zum ersten Mal 1990 beschrieben (Lord, Hoffman-Liebermann et al. 1990) und ist ein im Zytoplasma lokalisiertes Adaptorprotein (Homodimer) mit 296 Aminosäuren. Es kann aber auch mit TIRAP ein Heterodimer bilden. Es gibt zwei Isoformen, die jeweils in verschiedenen Geweben exprimiert sind.

TRIF ist ein Adaptorprotein welches von den Rezeptoren TLR 3 und 4 verwendet wird. TRIF liegt als Homodimer vor und wird auch als Ticam-1 bezeichnet. Die Sequenz ist 732 Aminosäuren lang und kann mit TIR Domänen interagieren (Yamamoto, Sato et al. 2003).

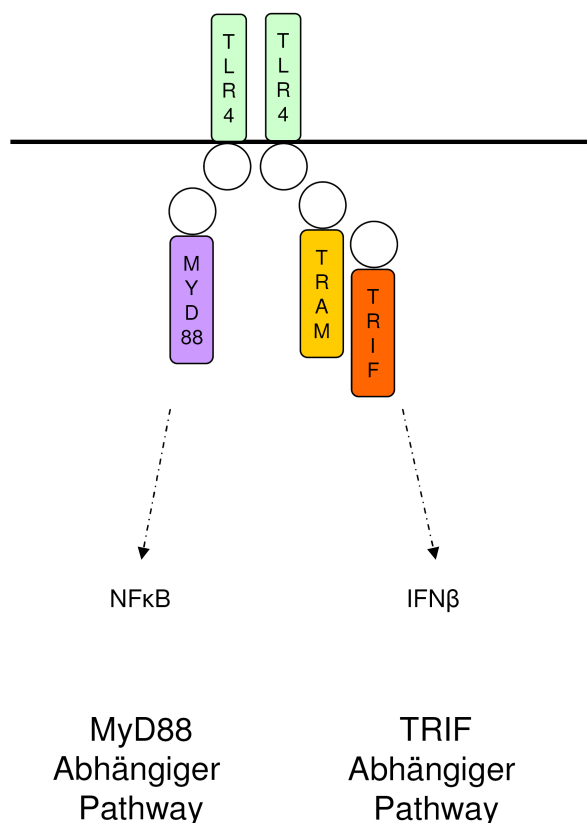


Abbildung 5 TLR 4 vermittelter Signaltransduktionsweg

TLR4 kann sowohl über den MyD88 abhängigen, als auch über den MyD88-unabhängigen, dafür TRIF-abhängigen Signalweg vermittelt werden. Bei dem Weg über MyD88 wird NFκB aktiviert, bei dem TRIF-abhängigen Weg wird IFNβ aktiviert.

1. Einleitung

MyD88 wird von allen TLR (ausgenommen TLR 3) und den Mitgliedern der IL-1 Rezeptorfamilie verwendet. Es überträgt Signale die zur Aktivierung von NF- κ B und MAP-Kinasen führen und dient zur Induktion von inflammatorischen Zytokinen ((Lord, Hoffman-Liebermann et al. 1990; Zhang, Kirschning et al. 1999); reviewed in (Kawai and Akira 2011)).

TLR 3 und TLR 4 verwenden TRIF als alternativen Signalweg. Dies führt zu einer Aktivierung von NF- κ B und IRF-3 und zur Induktion von IFN Typ 1 sowie zur Produktion inflammatorischer Zytokine (Yamamoto, Sato et al. 2003; Kawai and Akira 2011).

Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen exprimieren TLRs und können durch LPS *in vivo* und *in vitro* aktiviert werden (Scumpia, Kelly-Scumpia et al. 2010). Eine Infektion mit E.coli führt zu einem Anstieg der LSK-Zellpopulation, welche bekanntlich stark angereichert mit HSC sind und zu einem Anstieg der Neutrophilenzahlen.

Eine Injektion von LPS in Wildtypmäuse führt zu einer 8-9 fachen Expansion der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen. In C3H/HeJ Mäusen kam es bei den oben beschriebenen Versuchen zu keinen Veränderungen. Dies unterstreicht die Abhängigkeit von TLR4 (Scumpia, Kelly-Scumpia et al. 2010).

Auch kam es zu kleineren Veränderungen in den LSK-Zellzahlen bei MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-} und C3H/HeJ Mäusen, welche mit LPS behandelt wurden. Daraus lässt sich schließen, dass TLR4, MyD88 und TRIF eine Rolle bei der Vermittlung des LPS-Signals an das HSPC Kompartiment spielen könnten.

Zusammengefasst zeigten Scumpia et al. eine Erhöhung der HSPC Zahlen nach Gabe von LPS, die sowohl abhängig von TLR4 als auch von MyD88 und TRIF ist (Scumpia, Kelly-Scumpia et al. 2010). Sie schlugen einen Sensor im Knochenmark vor, der feststellt ob eine Hypozellularität im Knochenmark auftritt oder ob die Neutrophilen im Knochenmark sinken. Dieser Sensor soll in Folge dessen die Bildung von Granulozyten induzieren.

1.5 Zielsetzung

Die Neutrophilen-Homöostase im steady-state ist im Vergleich zur Regulation von Erythrozyten und Thrombozyten noch nicht vollständig verstanden. Bei Erythrozyten reguliert der Sauerstoffpartialdruck die renale Erythropoietin (EPO) -Produktion und somit die Erythropoese ((Beru, McDonald et al. 1987); reviewed in (Jelkmann 2011)). Bei den Thrombozyten ist der Thrombopoietin-Spiegel abhängig von der Masse thrombopoetischer Zellen ((Scheding, Bergmann et al. 2002; reviewed in (Kaushansky 2009)). Bei Neutrophilen ist der Weg noch nicht komplett verstanden, man weiß allerdings, dass G-CSF eine große Rolle bei der Neutrophilenfreisetzung aus dem Knochenmark spielt.

Untersuchungen zur Neutrophilen-Homöostase und die Suche nach einem Sensor für die Neutrophilenregulation und -freisetzung war Teil der vorliegenden Dissertation. Zudem wurde die Abhängigkeit der homöostatischen Regulation von kommensalen Bakterien untersucht sowie die Signalweiterleitung über Toll Like Rezeptoren, speziell TLR4.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

2.1.1.1 Allgemeine Reagenzien

100 bp DNA Ladder	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
16 % Formaldehyde (w/v) - Methanol frei	Pierce, Perbio	Rockford, USA
Ampli Taq DNA Polymerase	Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
Bouins Solution	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Decalcifizierungslösung	Richard Allan Scientific	Braunschweig, Deutschland
EDTA-Lösung (0,5M)	FLUKA	Steinheim, Deutschland
GelRed TM	Biotrend	Köln, Deutschland
LPS from E.coli	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
May-Grünwald Lösung	Merck	Darmstadt, Deutschland
Oligo dT23 Primers	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Oligonucleotide	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Orange G	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
PBS w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	PAA	Cölbe, Deutschland
QIA Shredder	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNAse Out	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
Rneasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
dNTP	Lonza	Basel, Schweiz

2. Material und Methoden

Trypsin	Gibco/Life technologies GmbH	Darmstadt, Germany
MEM-Medium	Gibco/Life technologies GmbH	Darmstadt, Germany
L-Glutamin	Gibco/Life technologies GmbH	Darmstadt, Germany
Anti-Anti	Gibco/Life technologies GmbH	Darmstadt, Germany
Natriumpyruvat	Gibco/Life technologies GmbH	Darmstadt, Germany
Primer	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

2.1.1.2 Antikörper

2.1.1.2.1 FACS- Antikörper

Alle FACS- Antikörper wurden insofern nicht anders beschrieben von ebioscience, Frankfurt am Main, Deutschland bezogen.

Sca-1 PE		
c-kit- APC		
Gr-1- PE		
CD135- PECy5		
CD19- eFluor 450		
CD34- eFluor 450		
CD127- eFluor 450		
B220- FITC		
CD3- PE		
CD16/32- PECy5		
CD49b- APC		
CD11b- APC		
CD16/32- FITC		

2. Material und Methoden

CD127- biotin		
CD335- FITC		
Streptavidin-APC		
Streptavidin- PECy7		
lineage depletion cocktail (biotinyliert)	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland

2.1.1.2.2 In vivo Antikörper

anti- Ly-6G (clone 1A8)	BioXCell	West Lebanon, NH, USA
anti- Ly-6G (clone RB6-8C5)	BioXCell	West Lebanon, NH, USA
anti- NK1.1 (clone PK136)	BioXCell	West Lebanon, NH, USA
Anti- G-CSF (Mab414)	RnD Systems	Wiesbaden, Deutschland

2.1.1.3 ELISA

Mouse M-CSF Quantikine ELISA	RnD Systems	Wiesbaden, Deutschland
Mouse IL-17 Quantikine ELISA	RnD Systems	Wiesbaden, Deutschland
Mouse G-CSF Quantikine ELISA	RnD Systems	Wiesbaden, Deutschland
Mouse IL-23 Quantikine ELISA	RnD Systems	Wiesbaden, Deutschland

2.1.1.4 Puffer

MACS-Puffer:

500 ml PBS w/o Ca²⁺ Mg²⁺

2 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0)

2,5 g BSA

sterilfiltriert, Lagerung bei 4 °C

2. Material und Methoden

Blutentnahmepuffer:

PBS + 1% BSA + 5,475 μ M EDTA
sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C

Ammoniumchloridpuffer:

0,8% NH₄Cl in Aqua bidest
0,1 mM EDTA
gepuffert mit KHCO₃ auf pH 7,4
sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C

TBE-Puffer für Gelelektrophorese (10 x)

=> zur Elektrophorese 1 x in Aqua bidest verdünnt eingesetzt

107,8 g TRIS
55 g Borsäure
7,44 g EDTA-Dinatrium-Dihydrat
aufgefüllt auf 1 l mit Aqua bidest

2.1.2 Geräte

Abzug	Waldner	Wangen, Deutschland
BD FACS Aria™ II	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
BD FACS Canto II	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus	Hanau, Deutschland
Countess	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
ELISA Reader	TECAN	Crailsheim, Deutschland
Eppendorf Multipette stream	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus 0,5 - 10 μ l	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2. Material und Methoden

Eppendorf Research Plus 10 - 100 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus 10 - 200 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus 100 - 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Gentle MACS	Miltenyi	Bergisch Gladbach, Deutschland
Inkubator HERA Cell	Heraeus	Hanau, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr	Ochsenhausen, Deutschland
Light Cycler LC480	Roche	Grenzach-Whylen, Deutschland
Megafuge 1. OR	Heraeus	Hanau, Deutschland
Mikrowelle	LG	Willich, Deutschland
Pipetboy acu	Integra Biosciences	Chur, Schweiz
Schüttler Polymax 1040	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Sterilbank HERA safe	Heraeus	Hanau, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Vacusafer	Integra Biosciences	Chur, Schweiz
Waage Kern	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Wasserbad	Memmert	Schwabach, Deutschland
ADVIA 120	Bayer	Leverkusen, Deutschland
Gelkammer	PEQLAB	Erlangen, Deutschland
Spannungsgerät Power Pac 300	Bio-Rad	München, Deutschland
Mikroskop HBO 50	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Mastercycler Gradient	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Nanodrop	PEQLAB	Erlangen, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr	Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	SANYO	München, Deutschland

2. Material und Methoden

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Combitips Biopur 25 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Combitips Biopur 5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Falconröhrchen 15 ml	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Falconröhrchen 50 ml	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Gentle MACS C-tubes	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Deutschland
Gewebe-Kulturflaschen 75 cm ²	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Gewebe-Kulturschale Polystyrol PS 16/60 mm	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Handschuhe Micro-Touch	Ansell	Tamworth, UK
Objektträger Superfrost	Langenbrinck	Emmendingen, Deutschland
Pipette serologisch Advant. 10 ml	BD Falcon	Franklin Lakes, USA
Pipette serologisch Advant. 2 ml	BD Falcon	Franklin Lakes, USA
Pipette serologisch Advant. 25 ml	BD Falcon	Franklin Lakes, USA
Pipette serologisch Advant. 5 ml	BD Falcon	Franklin Lakes, USA
Pipette serologisch Advant. 50 ml	BD Falcon	Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen blau 100-1000 µl	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen gelb 10-200µl	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen weiss 0,5-10µl	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Röhrchen 12x75 steril 5 ml, Falcon	BD Falcon	Franklin Lakes, USA
Spritze Insulin 1,0 ml mit Kanüle	BD Falcon	Franklin Lakes, USA

2. Material und Methoden

Sterilfilterspitzen 100-1000 µl	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Sterilfilterspitzen 10-100 µl	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Sterilfilterspitzen 1-10 µl	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Zellsieb 40 µm, steril	BD Falcon	Franklin Lakes, USA
Kapillaren 9 µl	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
Hämatokrit Einmalkapillaren 60 µl	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
Microvette 300 Li-Heparin	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Microvette 500 EDTA	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Kimberley Clark	Weinheim, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere

Um die Regulation der Neutrophilen-Homöostase im nichtinfektiösen Mausmodell *in vivo* zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mäusestämme mit verschiedenen Rassen eingesetzt.

Als Wildtypmäuse wurden C57BL/6 Mäuse (Jackson) verwendet, als immundefizienter Stamm NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) Mäuse. Weiter wurden C3H/N, C3H/HeJ, C3H/HeJ/TLR2-KO, MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-}, TLR4^{-/-} und keimfreie (GF) C57BL/6 Mäuse eingesetzt.

Mäusestamm	Background	
C57BL/6		Wildtyp
keimfreie C57BL/6	C57BL/6	Frei von kommensalen Bakterien
TLR4 ^{-/-}	C57BL/6	
MyD88 ^{-/-}	C57BL/6	
TRIF ^{-/-}	C57BL/6	
NSG		Immundefizient, keine B-/T- und NK-Zellen
C3H/N		Wildtyp
C3H/HeJ	C3H	Punktmutation im <i>Tlr4</i> -Gen, loss-of-function
C3H/HeJ/TLR2-KO	C3H	Punktmutation im <i>Tlr4</i> -Gen, loss-of-function und TLR2-KO

Die Tiere wurden in geregelten Tag- und Nachtzyklus gehalten, mit Futter und Trinkwasser *ad libitum*. Die Haltung der Tiere erfolgte in den Tierhaltungen der Universitätsklinik Tübingen.

2.2.2 Antikörper-induziertes Neutropenie -Modell

Um ein Antikörper-vermitteltes neutropenes Mausmodell zu generieren, wurden Mäuse für 8 Tage mit anti-Ly-6G-Antikörpern depletiert.

Die zu verwendende Dosis und Applikationszeitpunkte wurden dabei titriert. Die optimalen Dosen für die Versuche waren: anti-Gr-1 (Klon RB6-8C5), 500 µg alle 48 h i.p.; Dosis für Klon 1A8: 1 mg alle 36 h.

Um Infektionen zu vermeiden wurde für die Dauer der Versuche Amoxicillin (Amoxanil 200F) ins Trinkwasser gegeben.

2.2.3 Weitere *in vivo* Modelle

2.2.3.1 Applikation von rh-G-CSF

n = 5 C57BL/6 Mäuse wurden täglich mit 300 µg pro kg Körpergewicht rh-G-CSF (Filgrastim) s.c. behandelt (Petit, Szyper-Kravitz et al. 2002). Nach 5 Tagen wurden die Tiere geopfert und analysiert.

2.2.3.2 NK- Zelledepletion

NK-Zellen wurden in n = 5 C57BL/6 Mäusen durch tägliche Applikation von 300 µg anti-NK1.1 Klon PK136 (BioXCell, West Lebanon, NH, USA) i.p. depletiert. Nach 7 Tagen wurden die Tiere geopfert und das Knochenmark und das Plasma analysiert.

2.2.3.3 LPS-Injektion

n = 5 C57BL/6 Wildtyp-Mäuse wurden 5 Tage alle 36 h mit 2 EU LPS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) i.p. behandelt. Dies entsprach der maximalen Dosis LPS, welche in den eingesetzten *in vivo* Antikörpern laut Datenblatt der Firma vorliegen konnte. Danach wurden die Tiere geopfert und analysiert.

2.2.3.4 anti-G-CSF Behandlung mit gleichzeitiger Neutrophilendepletion

Um zirkulierendes G-CSF im peripheren Blut zu neutralisieren, wurden n = 8 C57BL/6 Mäuse mit 10 µg anti-G-CSF (Mab 414, RnDsystems, Wiesbaden,

Deutschland) täglich i.p. injiziert. Um gleichzeitig eine antikörper-induzierte Neutropenie zu erzeugen, wurde bei n = 4 Tieren je 1 mg anti-Ly-6G Klon 1A8 i.p. appliziert bzw. 500 µl PBS bei den Kontrolltieren. Nach 8 Tagen wurden die Tiere geopfert und das Knochenmark auf Progenitorebene durchflusszytometrisch untersucht.

2.2.4 Transfusion von Neutrophilen

Das periphere Blut von C57BL/6 Mäusen, welche entweder zuvor mit rh-G-CSF stimuliert wurden (Petit, Szyper-Kravitz et al. 2002) oder unstimuliert waren, wurde durch retrobulbäres Ausbluten mit heparinisierten Kapillaren in EDTA-Röhrchen gewonnen. Das Blut wurde anschließend 1:2 mit sterilem PBS verdünnt. In ein 15 ml Falcon wurden 3 ml Histopaque 1119 vorgelegt und vorsichtig mit 3 ml Histopaque 1077 überschichtet.

Auf diese Zuckerlösungen wurden 6 ml verdünntes Blut geschichtet und der Ficoll bei 2000 rpm, 30 min bei ausgeschalteter Bremse zentrifugiert.

Es bildeten sich drei Schichten. In der obersten Interphase befinden sich mononukleäre Zellen, in der unteren Interphase Granulozyten und Erythrozyten. Die Schicht zwischen den Interphasen und die untere Interphase wurden mit einer Stangenpipette abgenommen und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt um die Zuckerlösung zu verdünnen. Die Zellen wurden bei 300 g für 8 min abzentrifugiert und im Anschluss nochmals mit PBS gewaschen und abzentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in 500 µl PBS aufgenommen und je Maus $3,5 \times 10^6$ Granulozyten transfundiert. Die Reinheitskontrolle erfolgte im FACS mit der Färbung auf CD11b und Gr-1 doppelpositive Zellen.

Direkt vor der Transfusion wurde den Empfängermäusen Blut für eine durchflusszytometrische Bestimmung, für ein Differentialblutbild und Plasma abgenommen. Dadurch wurde die Neutrophilenzahl im Blut der Empfängermäuse bestimmt. Diese Zellzahl wurde mit den Werten 24 h nach Transfusion (am Analysenzeitpunkt), die mit Hilfe der gleichen Parameter bestimmt wurden, verglichen.

2.2.5 Transplantation von Knochenmark

Für die allogene Transplantation von Knochenmark aus Wildtyp-Mäuse in Wildtyp-Mäuse wurden die Empfängermause am Morgen der Transplantation mit 0,9 Gy im gamma-Strahler bestrahlt. Die Spendermause des gleichen Stammes wurden getötet und die Knochenmarkzellen aus den Femura und Tibiae mit MACS-Puffer gespült. Die Wirbelsäulen wurden ebenfalls präpariert, in kleine Stücke geschnitten und anschließend mit Mörser und Pistill zerrieben.

Die gewonnenen Zellen wurden vereinigt, durch ein 40 µm Zellsieb filtriert um Knochenstücke zu entfernen und zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 300g, 7 min). Danach wurden die Zellen in PBS aufgenommen und im Volumen von 200 µl in die Empfängermause transplantiert. Nach 4 Wochen war das Engraftment der Knochenmarkzellen abgeschlossen und die Tiere wurden für 8 Tage neutrophil depletiert, im Anschluss geopfert und analysiert.

2.2.6 Herstellung von Blutplasma aus murinem peripheren Blut

Das mit einer heparinisierten Kapillare retrobulbär aus dem Auge gewonnene Blut wurde in einem Sarstedt EDTA- oder Heparin-Röhrchen aufgefangen. Innerhalb von 30 min nach Entnahme wurde das Blut in Eppendorfcups pipettiert und in einer Tischzentrifuge bei 6000 rpm (2200 g) für 10 min bei RT abzentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde abgenommen, in ein neues Eppendorfgesäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.2.7 Differentialblutbild

Zur Bestimmung der Anzahl der Leukozyten und weiterer Blutzellen aus dem peripheren Blut von Mäusen wurde bei jeder Blutabnahme ein Differentialblutbild erstellt. Dafür wurden nach Betäubung der Maus mit einer heparinisierten Kapillare retrobulbär 60 µl Blut abgenommen und in ein Eppendorfgesäß, in dem sich 180 µl

Blutentnahmepuffer (PBS, 1% BSA, 5,45 μ M EDTA) befanden gegeben. Das Blut und der Puffer wurden gut gemischt und im automatischen Cell Counter ADVIA2120 gemessen.

2.2.8 Aufreinigung von Blut für die FACS-Färbung

Zur Erythrozytenlyse wurden 50 μ l Blut in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und mit 2 ml eisgekühltem Ammoniumchloridpuffer durch vortexen gemischt. Dann wurde das Blut auf Eis für 10 min unter Schütteln inkubiert. Das Blut wurde 6 min, 300g abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde erneut mit 1 ml Ammoniumchloridpuffer lysiert und 6 min auf Eis geschüttelt, anschließend 6 min bei 300g abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet im Anschluss mit 10 ml PBS gewaschen.

Nach erneutem Abzentrifugieren (6 min, 300g) wurden die Zellen in 200 μ l MACS-Puffer für die FACS-Färbung aufgenommen. Meist wurden 2 Panels gefärbt: Panel 1 um die unterschiedlichen Lymphozyten zu differenzieren: (Zugabe von 1 μ l CD3-PE, 1 μ l DX5-APC, 1 μ l B220-FITC). Panel 2 wurde gefärbt um die Granulozyten und Monozyten/Makrophagenpopulation zu unterscheiden (1 μ l Gr1-PE, 1 μ l CD11b-APC und 1 μ l CD16/32-FITC).

2.2.9 Aufreinigung der Milz

Bei der Maus wurde für die Entfernung der Milz das Bauchfell eröffnet und die Milz vorsichtig herauspräpariert. Die Milz wurde gewogen und im Anschluss in ein gentleMACS C-Röhrchen, in dem sich 4 ml eisgekühlter MACS-Puffer befanden gegeben.

Die Milz wurde im gentleMACS und dem Programm mouse spleen 1 zerkleinert. Falls sich viel Schaum gebildet hatte, wurde das Röhrchen kurz abzentrifugiert.

Die Zellsuspension wurde über ein 40 μ m Filter in ein 50 ml Falcon pipettiert, bei 300g für 7 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen. Um die Erythrozyten zu lysieren wurden 9 ml eisgekühlter Ammoniumchloridpuffer zugegeben und unter leichtem Schütteln 30 sec

lysiert. Die Lyse wurde sofort im Anschluss durch Zugabe von 40 ml MACS-Puffer gestoppt.

Danach wurde das Röhrchen bei 300g für 7 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet erneut in 20 ml MACS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen zur FACS-Färbung in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und in der Verdünnung 1:10 gezählt.

Dann erfolgte eine FACS-Färbung von je 1 Mio. Zellen in 100 µl MACS-Puffer um die unterschiedlichen Lymphozyten zu differenzieren (Zugabe von 1 µl CD3-PE, 1 µl DX5-APC, 1µl B220-FITC) oder um die Granulozyten und Monozyten/Makrophagenpopulation zu unterscheiden (1µl Gr1-PE, 1 µl CD11b-APC und 1 µl CD16/32-FITC).

2.2.10 Aufreinigung von Knochenmark zur Depletionsanalyse

2.2.10.1 Aufarbeitung der Knochenmarkzellen

Die Femura und Tibiae aus beiden Hinterläufen der Maus wurden entnommen und in eine Petrischale mit MACS-Puffer gelegt. Dabei ist es wichtig, dass die Knochen nicht austrocknen. Als nächster Schritt wurden die Knochenköpfe mit einer Schere abgeschnitten und die Röhrenknochen durch spülen mit einer Insulinspritze vom Knochenmark befreit. Die Knochenmarkzellen wurden durch auf- und abpipettieren vereinzelt und durch einen 40 µm Filter in ein 50 ml Falcon-Röhrchen filtriert.

Die Zellen wurden für 7 min bei 300 g abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 ml gekühltem MACS-Puffer aufgenommen und zur Erythrozytenlyse mit 9 ml kaltem Ammoniumchloridpuffer versetzt. Die Lyse erfolgte für 10 min unter Schütteln auf Eis. Anschließend wurden die Zellen in der vorgekühlten Zentrifuge (4°C) abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen.

Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen, gezählt (Verdünnung 1:10) und zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

2.2.10.2 FACS-Färbungen

Für die FACS-Färbungen wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 50 μ l MACS-Puffer als Färbevolumen eingesetzt. Es wurden hauptsächlich drei Antikörperpanels gefärbt:

- Panel 1 um gemeinsame lymphoide Progenitoren (CLP) zu detektieren: $lin^- CD127^+ Sca-1^+ c-kit^+$.
- Panel 2 um myeloische Progenitoren zu detektieren: $lin^- CD127^-$, $Sca-1^-$, $c-kit^+$. Näher charakterisiert werden die Granulozyten/Makrophagen Progenitoren (GMP) als $CD16/32^+ CD34^+$, die gemeinsamen myeloischen Vorläufer (CMP) als $CD16/32^{low}$ und $CD34^+$ und die Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitoren als $CD16/32^- CD34^-$.
- Panel 3 um LSK-Zellen zu detektieren: lin^- , $Sca-1^+$, $c-kit^+$.

Nr1.		Nr.2		Nr. 3	
μ l	Antikörper	μ l	Antikörper	μ l	Antikörper
5	CD127- pacific blue	5	CD34- pacific blue	5	CD34- pacific blue
2,5	Sca-1- PE	2,5	Sca-1- PE	2,5	Sca-1- PE
1,25	c-kit- APC (= CD117)	1,25	c-kit- APC (= CD117)	1,25	c-kit- APC (= CD117)
		0,6	CD16/32-PerCP-Cy5		
1	CD135-PECy5			1	CD135-PECy5
4	Lineage negativer Cocktail	4	Lineage negativer Cocktail	4	Lineage negativer Cocktail
	-----	1	CD 127-bio	1	CD 127-bio
	Streptavidin PE-Cy7		-----		-----
			Streptavidin PE-Cy7		Streptavidin PE-Cy7

Der Lineage negativer Cocktail wurde vorher gemischt aus gleichen Anteilen von B220-biotinyliert, CD11b- biotinyliert, CD3- biotinyliert, Ter119- biotinyliert und Gr-1- biotinyliert.

Die Antikörper wurden in eine 96 Well-Platte vorgelegt und mit 1×10^6 Zellen in 50 μ l MACS-Puffer versetzt. Die Zellen wurden 45 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt, dann

im Anschluss bei 1400 rpm, 5 min abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und gegebenenfalls mit Sekundärantikörper (Streptavidin PE-Cy7, Verdünnung 1:100) für 20 min im Dunkeln, 4 °C gefärbt. Nach erneutem Waschen mit MACS-Puffer wurden die Zellen in 170 µl MACS-Puffer aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und mittels Durchflusszytometer BD FACS Canto II gemessen.

2.2.11 ELISA

Der Gehalt der Analyte G-CSF, M-CSF, IL-17 und IL-23 wurde mittels Quantikine Elisa Kits nach Angaben des Herstellers bestimmt.

Dazu wurde das Plasma je nach Analyt unverdünnt (IL-17 und IL-23) oder bis zu 1:12 verdünnt (G-CSF und M-CSF) eingesetzt.

Der Standard wurde in „Calibrator Diluent“ gelöst und eine 8-wertige Standardkurve erstellt. Die Hersteller-Kontrolle wurde in destilliertem Wasser gelöst und unverdünnt eingesetzt.

Jeweils 50 µl Assay Diluent wurde in die mit dem jeweiligen Antikörper beschickten Wells pro Well vorgelegt und 50 µl Plasma, Standard oder Kontrolle hinzugefügt. Dann wurde der ELISA für 2 h bei RT inkubiert und im Anschluss 4 - 5 mal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem Trockenklopfen der Platte wurden 100 µl Konjugat zugegeben und der Assay erneut für 2 h inkubiert. Nach erneutem 4 - 5 maligen waschen wurden 100 µl Substratlösung zugegeben (je ein Teil Color Reagent A und ein Teil Color Reagent B gemischt), für 30 min im Dunkeln inkubiert, und danach die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung gestoppt. Innerhalb 30 min wurde dann der Assay im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen und die Referenzmessung bei 540 nm abgezogen.

2.2.12 Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen und Stimulation mit LPS

Das Knochenmark von C57BL/6 Mäusen und C3H/HeJ/TLR2^{KO} Mäusen wurde durch Ausspülen von Femura und Tibiae geerntet. Zusätzlich wurden die Wirbelsäulen präpariert, in Stücke geschnitten und mit Hilfe eines Mörsers und Pistills zerrieben.

Die Zellen und Knochenstücke wurden vereinigt und mit PBS zweimal gewaschen (300g, 8 min). Dann wurden die Zellen und Knochen in Medium aufgenommen ((MEM mit 10% FCS, 1% Anti-Anti, 1% L-Glutamin und 1 % Natriumpyruvat) und in 75 cm² Gewebekulturflaschen ausgesät und im CO₂-Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach 72 h wurden die Knochenstücke und nicht-adärente Zellen entfernt und die adhärennten mesenchymalen Stromazellen bis zur Konfluenz kultiviert.

Die Endotoxin stimulierten Gruppen der konfluenten MSC aus beiden Mäusestämmen wurden mit $c = 10 \mu\text{g/ml}$ LPS im Medium für 24 h behandelt, die Kontrollzellen blieben unberührt.

Am nächsten Tag wurden die MSC abtrypsiniert, zweimal mit PBS gewaschen (300 g, 8 min), die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Das Transkriptionslevel von G-CSF wurde mittels qRT-PCR und dem Taqman Gene Expression Assay bestimmt und die Ratio in Bezug auf das Housekeeping Gen β -Actin berechnet.

2.2.13 RNA- Isolation aus Knochenmarkzellen

Die mit Ammoniumchloridpuffer lysierten Zellen aus dem Knochenmark wurden in 10 ml PBS aufgenommen und bei 300 g, 8 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Waschvorgang ein weiteres Mal wiederholt. Danach wurde das PBS komplett abgesaugt und die Zellen sofort in 600 μl RLT-Puffer mit 1 % β -Mercaptoethanol aufgenommen, gevortext und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Zur Aufarbeitung der RNA wurden die Zellen aufgetaut und erneut gevortext. Um die Zellen zu Homogenisieren wurden die Zellen auf QIA Schredder-Säulchen pipettiert und für 2 min bei 13000 rpm (10140 g) in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Durchlauf wurde mit dem gleichen Volumen (600 µl) 70 % Ethanol resuspendiert und 600 µl auf die RNeasy Minikit Säulen pipettiert. Dann wurde das Säulchen für 15 s bei 10000 rpm abzentrifugiert, der Durchlauf verworfen, die restlichen 600 µl des Zell-Ethanolgemisches auf die Säule gegeben, erneut 15 s abzentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dann wurden 700 µl RW1- Waschpuffer auf die Säule gegeben und erneut für 15 s abzentrifugiert.

Im Anschluss wurde das Röhrchen samt Durchlauf verworfen und die Säule in ein neues 2 ml Röhrchen gestellt. Nach Zugabe von 500 µl RPE-Puffer wurde die Säule für 15 s bei 10000 rpm (6160 g) abzentrifugiert, der Durchlauf verworfen und nach erneuter Zugabe von 500 µl RPE- Puffer für 2 min bei max. Geschwindigkeit (10140 g) zentrifugiert um die Säule zu trocknen.

Die Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und die RNA durch Zugabe von 30 µl DEPC-Wasser bei 1 min, 10000 rpm (6160 g) eluiert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde im Nanodrop durchgeführt und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert .

2.2.13.1 DNase I Verdau

Um verunreinigende DNA aus der isolierten RNA zu entfernen wurde ein Verdau mit DNase I durchgeführt. 2 µg RNA wurden eingesetzt und mit RNase und DNase freiem Wasser auf 16 µl aufgefüllt. Hinzu wurden 2 µl 10 x Puffer und 2 µl DNaseI pipettiert, durch vorsichtiges anschnippen gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl 25 mM EDTA und sofortiges inkubieren für 10 min bei 65 °C wurde der DNase Verdau gestoppt.

Die DNase verdaute RNA kann bei -80 °C gelagert werden oder direkt zur cDNA Synthese eingesetzt werden.

2.2.13.2 cDNA-Synthese

Der Umschrieb der DNase I verdauten RNA in cDNA wurde mittels Superscript II durchgeführt. Dazu wurde ein Mastermix von 4 µl 5x Puffer, 2 µl DTT, 1 µl Oligo(dT)₂₃-Primern, 1 µl dNTP, 1 µl RNase Out und 1 µl Superscript II pro RNA-Probe angesetzt, mit 10 µl RNA vorsichtig gemischt und bei 42°C für 50 min inkubiert.

Um die Enzyme zu inaktivieren wurde die umgeschriebene cDNA für 15 min bei 70 °C inkubiert, danach kurz abzentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

Um die Qualität der cDNA und den Erfolg des DNase Verdau zu überprüfen wurde eine Test-PCR für β-Actin der cDNA und der DNase-verdauten RNA durchgeführt, bevor die cDNA zur qRT-PCR eingesetzt wurde.

2.2.13.3 β-Actin PCR

Für jede zu überprüfende cDNA wurde ein Mastermix mit 16,3 µl Wasser, 2,5 µl 10 x Puffer, 2 µl dNTP, 0,2 µl Taq HS, 1 µl Primer fwd und 1 µl Primer rev angesetzt. Das Volumen betrug somit insgesamt 23 µl. Dazu wurden 2 µl DNA bzw. 0,5 µl DNase I verdaute RNA + 1,5 µl Wasser eingesetzt um auf ein Gesamtvolumen von 25 µl zu kommen.

β-Actin fwd: TCT TGG GTA TGG AAT CCT GTG GCA

β-Actin rev: ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT

PCR-Programm:

Temperatur	Dauer	
95°C	2 min	
95°C	15 sec	25 Zyklen
58°C	45 sec	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
10°C	unendlich	

2. Material und Methoden

Das PCR Produkt (Länge des Produkts für β - Actin 288 bp) wurde auf ein 1,5 % Agarosegel mit GelRed (1: 1000) aufgetragen, bei 120 V für 1 h aufgetrennt und fotografiert.

2.2.14 quantitative Real-Time-PCR

Um die Transkription im Knochenmark zu untersuchen, wurde die aus RNA umgeschriebene cDNA mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) analysiert. Verwendet wurde das Light-Cycler System LC480 von Roche und SYBR Green I, bzw. für G-CSF eine Taqman Gene Expression Assay Probe.

Für die quantitative Bestimmung von G-CSF wurden je 40 ng cDNA pro Probe eingesetzt. Als Referenzgen wurde β -Actin gewählt. Insgesamt wurden 5 μ l cDNA und 15 μ l Mastermix eingesetzt. Der gesamte Mastermix bestand aus 1 μ l Taqman Gene Expression Assay Probe, 4 μ l RNase und DNase freiem Wasser und 10 μ l vorgefertigter Mastermix.

Als Programm wurde das im LC480 vorgegebene Programm für FAM-gelabelte Proben Hydrolysis Probe/UPL Probe mit 50 Zyklen angewandt. Die Auswertung erfolgte mit der LC480 Analysesoftware und der Ratio gebildet aus Ziel- und Referenzgen.

Programm: Hydrolysis Probe/UPL Probe

Temperatur	Zeit	
50°C	2 min	
95°C	10 min	
95°C	15 sec	50 Zyklen
60°C	1 min	
72°C	1 sec	

Für die Bestimmung von CXCL12, wurde SYBR Green I Mastermix und eine cDNA-Menge von 25 ng in einem Volumen von 5 μ l DNase und RNase freiem Wasser

2. Material und Methoden

eingesetzt. Für einen Ansatz wurden 10 µl SYBR Green I Mastermix, 3,8 µl DNase und RNase freies Wasser sowie je 0,6 µl Primer (10 µM) forward bzw. reverse pipettiert, und dann in eine qRT-PCR Microplatte gegeben, in die 5 µl cDNA vorgelegt waren.

Das Gesamtvolumen pro Well betrug somit 20 µl. Das Programm SYBR Green 96-I wurde gestartet und die Auswertung erfolgte wiederum mit der LC480-Analysen-Software durch Bildung der Ratio zwischen Ziel- und Referenzgenen.

Programm: SYBR Green 96-I

Temperatur	Zeit	
95°C	7 min	
95°C	10 sec	50 Zyklen
60°C	30 sec	
72°C	20 sec	
Schmelzkurve		

Verwendete Primer:

Primer	5' -> 3'	Länge des Produkts
CXCL12 fwd	AGTAGTGGCTCCCCAGGTTT	115 bp
CXCL12 rev	GAGACAGTCTTGCGGACACA	
β- Actin fwd	TCTTGGGTATGGAATCCTGTGGCA	288 bp
β- Actin rev	ACTCCTGCTTGCTGATCCACATCT	

Zur Kontrolle der Produktlänge wurden die PCR-Produkte auf ein 2%- Agarosegel mit GelRed aufgetragen, aufgetrennt und fotografiert.

2.2.15 Paraffin-Einbettung der Femura

Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Knochen sauber herauspräpariert und in 2 % PFA in PBS auf dem Schüttler für 4 h fixiert. Anschließend wurden die

fixierten Knochen in PBS gewaschen und im Anschluss 2 h in Decalcifizierungslösung auf dem Schüttler decalcifiziert.

Nach der Decalcifizierung wurden die Femura für 10 min unter häufigen Wechsel in Aqua bidest gewaschen, in eine Einbettkassette gelegt und bis zur Einbettung in Paraffin in 3,7%-Formalin in PBS gelegt.

Danach wurde der Femur in einen Paraffinblock automatisch eingebettet und im Anschluss am Mikrotom 5 µm Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger gezogen.

2.2.16 HE-Färbung

Die Paraffinschnitte wurden in einen Objektträger- Halter gestellt und 3 x 3 min mit Roticlear gewaschen, dann 1 min in Xylol/Ethanol (1:2), dann in einer absteigenden Alkoholkonzentrationsreihe 2 x 1 min 100% Ethanol, 1 min mit 70% Ethanol, 1 min mit 50% Ethanol und 30 sec mit Hämatoxylin gefärbt. Der Schnitt wurde mit Wasser gespült, bis das Spülwasser nur noch leicht hellblau war.

Die Schnitte wurden 1 min mit 50 % Ethanol, 1 min mit 70 % Ethanol und 30 sec bis 1 min mit 0,5 % Eosin gefärbt. Dann wurde der Schnitt mit 70% Ethanol sauber gespült und wieder mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (1 min 70% Ethanol, 2 x 1 min 100% Ethanol, 1 min Xylol/Ethanol (1:2) und 3 x 3 min mit Roticlear.

2.2.17 Ausstriche

Blutausstriche wurden durch Auftropfen von einem Tropfen Blut auf einen Objektträger und anschließendem Ausstreichen unter Zuhilfenahme eines zweiten Objektträgers angefertigt. Für die Knochenmarkausstriche wurde ein Tropfen der lysierten Knochenmarkzellen auf einen Objektträger gegeben und ausgestrichen. Die Ausstriche wurden an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet.

Um den Zellkern und das Zytoplasma anzufärben, wurden die Ausstriche nach der Methode von Pappenheim gefärbt. Dazu wurden die Ausstriche 4 min mit May-Grünwaldlösung gefärbt und anschließend mit Aqua dest. gespült. Dann wurde mit frisch angesetzter, verdünnter Giemsa-Färbelösung (1:20 in Weise-Puffer (1

Puffertablette von Merck/ pro Liter Ampuwa)) 8 min gefärbt. Die Ausstriche wurden mit Aqua dest. gespült und getrocknet.

Zum Eindecken wurden 2 kleine Tropfen Neomount auf den Objektträger gegeben und der Objektträger mit einem Deckgläschen abgedeckt.

2.2.18 Statistik

Die statistische Vergleich der Versuchs-/Kontrollgruppen gelang mit Hilfe des students t-test (MS Excel). Dabei wurden Werte $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen. Die Werte in den Diagramme sind mit einer Standardabweichung +/- Standardfehler (SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Antikörper induzierte Neutropenie in C57BL/6 Mäusen

3.1.1 Etablierung der Antikörperdosis

Um die Regulation der Neutrophilen-Homöostase im steady-state zu untersuchen, wurde das Mausmodell der antikörper-induzierten Neutropenie verwendet. Dabei wurden die Mäuse unter SPF-Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen (IVC) gehalten und zusätzlich eine Antibiotikaprophylaxe mit Amoxicillin für die Dauer der Versuche durchgeführt.

Durch diese Vorsichtsmaßnahmen wurden Infektionen der Tiere verhindert. Dies war wichtig, um eine Abgrenzung zur Granulopoese im Infektionsfall, der sogenannten emergency Granulopoese zu schaffen.

Durch intraperitoneale Applikation von anti-Ly-6G Antikörpern (Klon RB6-8C5 und Klon 1A8) wurde eine durchgehende, antikörper-induzierte Neutropenie in der Peripherie von Mäusen erreicht.

Dabei wurde bei den ersten Versuchen der häufig in der Literatur beschriebene Klon RB6-8C5 eingesetzt (bindet an Ly-6G und Ly-6C) und später auf den Klon 1A8 gewechselt, da dieser Klon spezifischer Neutrophile depletiert, da er nur an Ly-6G bindet. Ly-6C wird zudem unter anderem auch auf Monozyten (Hatakeyama, Iwabuchi et al. 1994) und CD8⁺ T-Zellen (Deschamps, Pedailles et al. 1984; Schlueter, Malek et al. 1997) exprimiert. Die aus den Versuchen mit RB6-8C5 resultierenden Ergebnisse wurden mit dem Klon 1A8 verifiziert.

Die optimale Dosis und das ideale Zeitintervall der Antikörperapplikation wurde durch *in vivo* Titration bestimmt. Als Grundlage wurden Publikationen, die den Antikörper bereits eingesetzt haben verwendet (Bliss, Butcher et al. 2000; Rodriguez, Fend et al. 2005).

Bei der Titration wurden unterschiedliche Antikörpermengen von 300 µg – 1 mg der Klone RB6-8C5 und 1A8 in 500 µl sterilem PBS eingesetzt und die Effektivität der

3. Ergebnisse

Neutrophilendepletion durch retrobulbäre Blutabnahmen und Blutanalyse im FACS ermittelt.

Die besten Ergebnisse wurden schlussendlich mit der Dosis von 500 µg alle 48 h (Klon RB6-8C5) und der Dosierung 1 mg alle 36 h (Klon 1A8) erzielt.

Die Kontrolltiere wurden im selben Zeitfenster mit 500 µl PBS i.p. behandelt (Abb. 6).

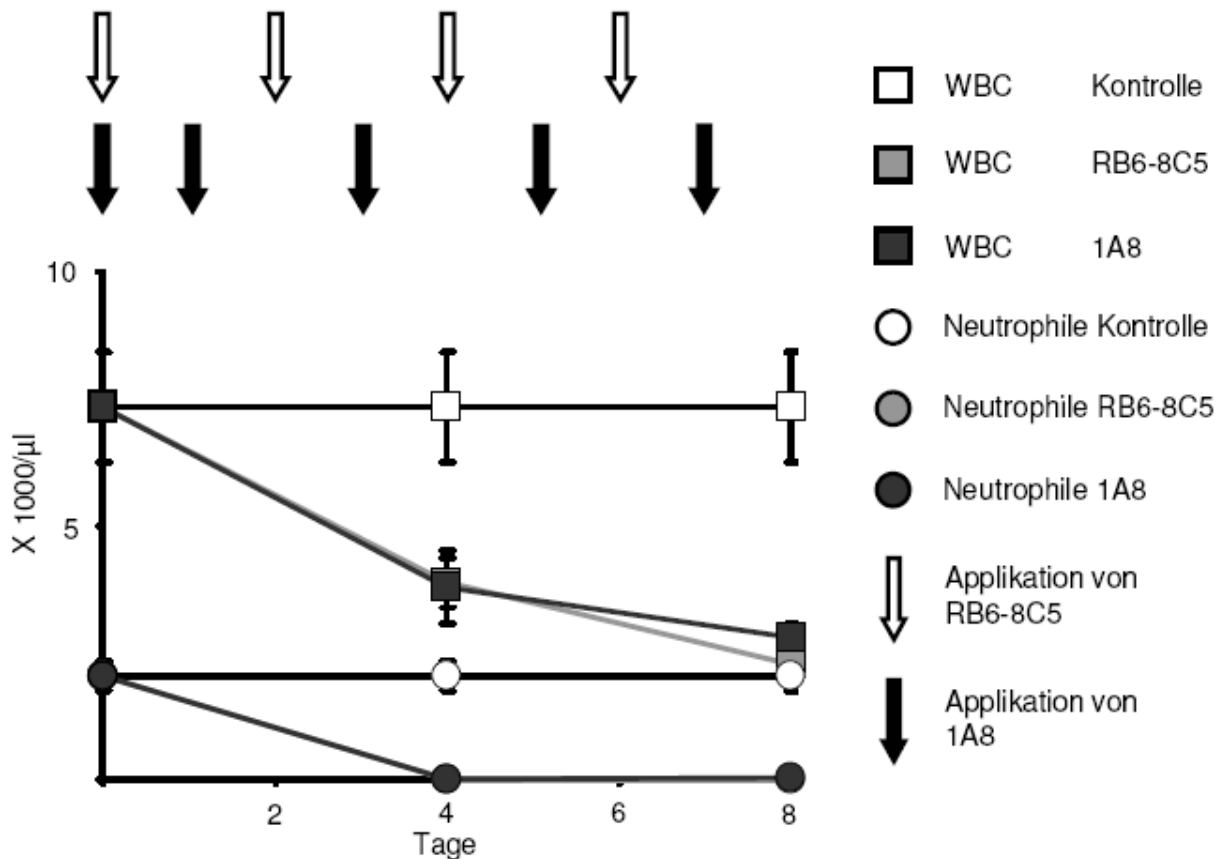


Abbildung 6 Applikationsschema der Antikörpergabe und Veränderungen im Blut

Gesamtzahl an Leukozyten im murinen Blut, Angabe in x 1000/µl. Das Blut wurde an Tag 0, an Tag 4 und an Tag 8 abgenommen und das Differentialblutbild am automatischen Cell Counter bestimmt. Die Blutzellen wurden durchflusszytometrisch charakterisiert und die Anteile der Zelltypen mittels WBC (white blood cells) verrechnet, um auf die absoluten Zellzahlen schließen zu können. In den neutropenen Tieren sinken die Neutrophilenzahlen und der WBC ab.

3.1.2 Blut

Die applizierten Antikörperdosen führten zu einer starken Reduktion der Neutrophilenzahlen in der Peripherie und somit zu einer durchgehenden

3. Ergebnisse

Neutropenie. Die Menge an Leukozyten im peripheren Blut sank ungefähr um den Anteil der Neutrophilen im Blut ab. Das stärkere Absinken der gesamten Leukozytenzahl bei der Depletion mit dem Antikörperklon RB6-8C5 ist dadurch begründet, dass dieser Klon nicht nur an Ly-6G sondern auch an Ly-6C bindet und somit auch Monozyten depletiert.

Die Depletion der Neutrophilen im Blut wurde mittels FACS- Analyse an Tag 0, 4 und 8 untersucht und analysiert. Nach zweifacher Lyse mit Ammoniumchloridpuffer, um die störenden Erythrozyten zu entfernen, wurden die Leukozyten gefärbt und im FACS auf die Oberflächenantigene Gr-1 und CD11b analysiert. Die Gr-1+ und CD11b+ doppelt-positive Zellpopulation wird als Granulozyten definiert, die Gr-1-CD11b+ Population als Monozyten/Makrophagen (Abb. 7).

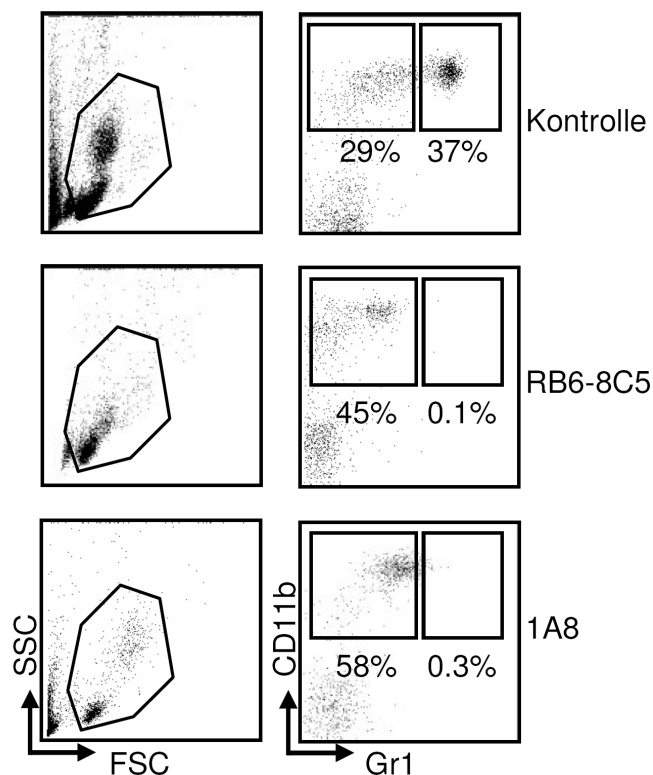


Abbildung 7 FACS des peripheren Bluts nach neutrophiler Depletion

Durchflusszytometrische Analyse von peripherem Blut aus depletierten Mäusen mit Klon RB6-8C5 und 1A8. n = 3 C57BL/6 Mäusen wurden für 8 Tage mit 1 mg 1A8 alle 36 h bzw. 0,5 mg RB6-8C5 alle 48 h behandelt. Nach 8 Tagen wurden die Tiere analysiert und nach Erythrozytenlyse mit Gr-1 und CD11b gefärbt. Bemerkenswert ist die Abwesenheit von Gr1+/CD11b+ Zellen in den Antikörper-behandelten Mäusen. Dies stellt den Marker für die Effektivität der Neutrophilendepletion dar.

3. Ergebnisse

Um die absolute Zellzahl der einzelnen Leukozytenzelltypen im peripheren Blut feststellen zu können, wurde ein Differentialblutbild mittels automatischem Cell Counter Typ ADVIA2120 erstellt. Die Gesamtzahl der Leukozyten wurde mit der im FACS ermittelten Prozentzahl der speziellen Zelluntergruppen verrechnet und so auf die Absolutzahlen der Zelltypen im peripheren Blut geschlossen.

3.1.3 Knochenmark

Um die Progenitoren im Knochenmark der neutropenen Mäuse zu untersuchen, wurden antikörper-behandelte C57BL/6 Wildtyp-Tiere und PBS-behandelte Kontrolltiere an Tag 8 analysiert. Dazu wurden die Tiere ausgeblutet und die Femura und Tibiae aus den Hinterläufen präpariert. Die Zellen wurden aus den Knochen gespült, die Erythrozyten lysiert und die Zellen für eine durchflusszytometrische Analyse mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt.

Die myeloischen Progenitorzellen werden definiert (wie im Methodenteil S. 32 beschrieben) als lineage negativ, Sca-1 negativ, c-kit positiv. Diese Zellpopulation wurde anschließend mit weiteren Markern näher charakterisiert: Granulozyten-Makrophagen-Progenitoren (GMP) als $CD16/32^+$ und $CD34^+$, die gemeinsamen myeloischen Progenitoren (CMP) als $CD16/32^{neg/low} CD34^+$ und die Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitoren (MEP) als $CD16/32^-$ und $CD34^-$.

Innerhalb von 8 Tagen nach Depletionsbeginn kam es zu einer starken Verschiebung der myeloischen Progenitoren im Knochenmark. Es kam zu einem Anstieg der LSK-Zellen und zu einem Anstieg der GMP- Population unabhängig davon, welcher Antikörperklon verwendet wurde. Diese Verschiebungen gingen auf Kosten der MEP-Population (Abb. 8).

Diese Verschiebungen werden zum einem deutlich sichtbar, wenn man die relativen Prozentzahlen der Zellpopulationen betrachtet (Abb. 8), zum anderen auch im Betrachten der Absolutzahlen (Abb. 9). Um die Absolutzahlen zu bestimmen, wurden die Zellen in beiden Femura und Tibiae hochgerechnet und mit dem im FACS ermittelten, prozentualen Zellanteil der Population verrechnet.

3. Ergebnisse

Angewandte Formel:

(Anzahl der lebenden Zellen im KM / 100) x Prozent der Progenitoren = Gesamtzahl der Progenitoren

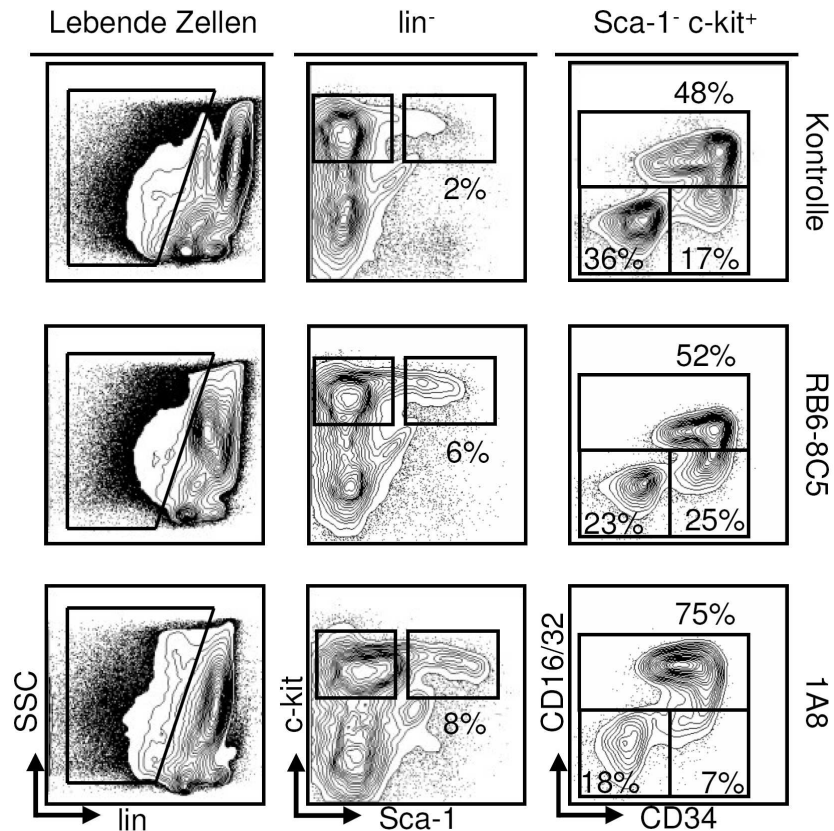


Abbildung 8 FACS-Analyse des Knochenmarks nach antikörper-induzierter Neutropenie

Durchflusszytometrische Analyse von Knochenmarkszellen nach Erythrozytenlyse mit relativen Veränderungen der Progenitorzellen in C57BL/6 Wildtyp-Mäusen an Tag 8 nach Depletionsbeginn.

Die myeloischen Progenitorzellen sind definiert als lin⁻ CD127⁻ Sca-1⁻ c-kit⁺ und werden dann weiter differenziert in GMP (CD16/32⁺ CD34⁺), CMP (CD16/32⁻ CD34⁺) und MEP (CD16/32⁻ CD34⁻).

Interessant ist die starke, signifikante Expansion der LSK Zellen (lin⁻, Sca-1⁺ und c-kit⁺) und der GMP-Zellen auf Kosten der MEP-Zellen; unabhängig davon, welcher Antikörper verwendet wird.

3. Ergebnisse

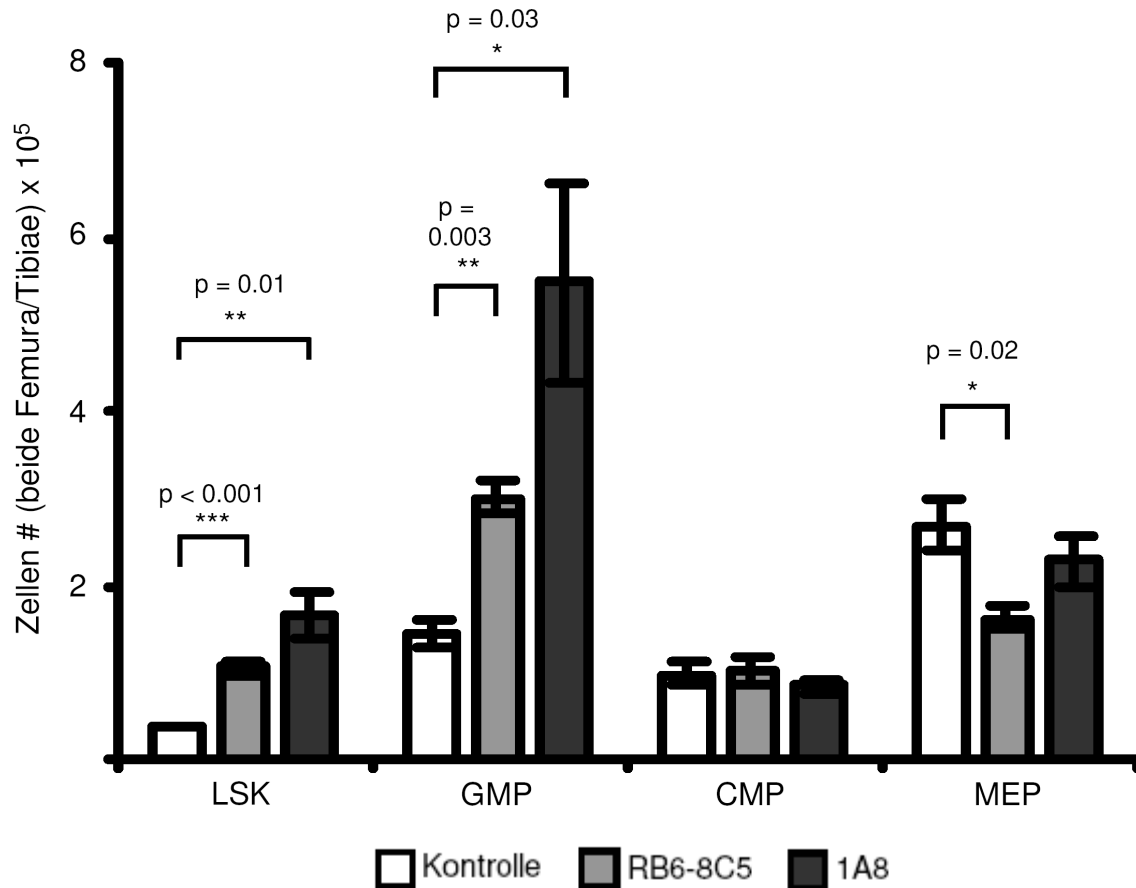


Abbildung 9 Absolute Zellzahlen im Knochenmark in neutropenen C57BL/6 an Tag 8

Absolute Zellzahlen im Knochenmark von je n = 3 neutropenen C57BL/6 Mäusen. Die Gesamtzahl der viablen Zellen in beiden Femura und Tibiae wurde mit dem prozentualen Anteil der Zellpopulation aus dem FACS verrechnet. Es ergeben sich ähnliche Veränderungen, wie in den relativen Veränderungen gesehen.

Die Zellularität im Knochenmark neutropener Tiere blieb im Vergleich zu der PBS-behandelten Kontrollmäusen konstant. Um dies zu überprüfen, wurde am Analysentag ein Femur fixiert, in einer vorgefertigten EDTA-Lösung decalcifiziert und in Paraffin eingebettet.

Der Femur wurde mit einem Mikrotom geschnitten und die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Im Vergleich der Knochenmarkschnitte von neutropenen Tieren und Kontrolltieren ist kein Fehlen von Knochenmarkzellpopulationen und der Zellularität ersichtlich, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Veränderungen auf Progenitorebene

3. Ergebnisse

nicht auf Veränderungen der Zellularität und der Knochenmarkumgebung zurückzuführen sind (Abb. 10).

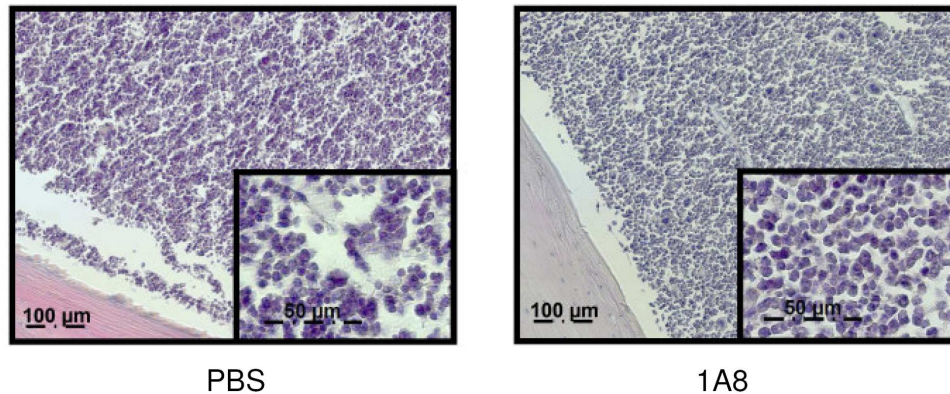


Abbildung 10 Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Knochenmarks

Am Tag 8 nach Depletionsbeginn wurden die Tiere analysiert. Ein Femur wurde fixiert, decalcifiziert, in Paraffin eingebettet und nach dem Schneiden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Hier als Beispiel die Femura von C57BL/6 Tieren, links mit PBS behandelt und rechts mit Klon 1A8. Man sieht im Vergleich keine sichtbaren Veränderungen der Zellularität. Diese entspricht jeweils dem typischen Bild einer 8-12 Wochen alten Maus.

Große Bilder: Vergrößerung 20 x, kleine Bilder unten rechts: Vergrößerung 63 x.

3.1.4 Zytokingehalt im Blutplasma

Ausgehend von der aktuellen Datenlage spielen bei der Regulation der Neutrophilen-Homöostase im steady-state unterschiedliche Zytokine, insbesondere G-CSF, M-CSF, IL-17 und IL-23 eine Rolle (Demetri and Griffin 1991; Semerad, Liu et al. 2002; Stark, Huo et al. 2005; Smith, Zarbock et al. 2007).

Um zu untersuchen, welche Zytokine für die Verschiebungen im Knochenmark verantwortlich sind, wurde das Blutplasma von neutropenen Mäusen untersucht und mit PBS-behandelten Kontrolltieren verglichen.

Zuerst wurde der Spiegel von G-CSF (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor) und M-CSF (Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) mittels ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) bestimmt.

3. Ergebnisse

Bei den Tieren, welche mit einem neutropenie-induzierendem Antikörper behandelt wurden, kam es zu einem starken Anstieg des G-CSF-Spiegels im Plasma. Bei den Tieren die mit dem Klon RB6-8C5 behandelt wurden, stieg nach 8 Tagen der Gehalt von 71 pg/ml um das 4,5-fache auf 317 pg/ml an ($p = 0,002$). Bei den mit 1A8 behandelten Tiere fand man einen Anstieg um das 2,5-fache auf 165 pg/ml ($p < 0,001$). Der M-CSF-Gehalt blieb konstant bei ca. 1000 pg/ml (Abb. 11).

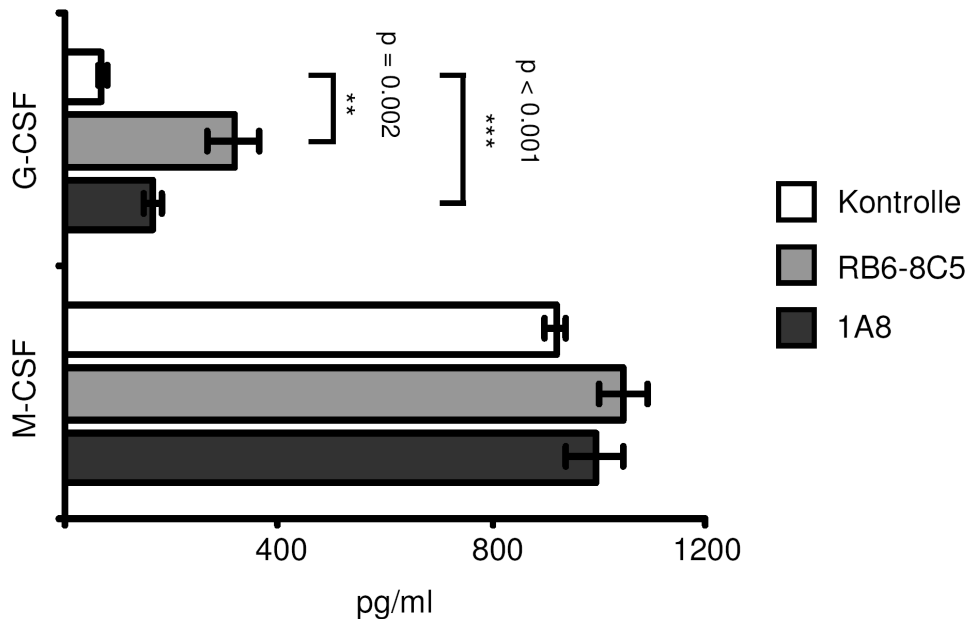


Abbildung 11 G-CSF und M-CSF-Gehalt im Plasma von C57BL/6

Das Plasma der neutropenen Mäuse und Kontrollmäuse wurde am Analysentag gewonnen und der Zytokingehalt per ELISA gemessen. Jeweils $n = 3$ Tiere pro Gruppe wurden untersucht und es wurde ein signifikanter Anstieg an G-CSF in beiden Antikörper-behandelten Gruppen detektiert, während der M-CSF Gehalt weitgehend konstant blieb.

p-Werte: * $< 0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$

Als nächster Schritt wurden im Signaltransduktionsweg „stromaufwärts“ liegende Zytokine wie IL-17 und IL-23 im Plasma untersucht.

Der IL-17-Spiegel im Plasma stieg signifikant um das Dreifache von 21,3 pg/ml auf 67,5 pg/ml (RB6-8C5) an, wohingegen sich der Zytokinspiegel nach Behandlung mit Klon 1A8 auf 43,4 pg/ml verdoppelte ($p = 0,08$).

IL-23 stieg nur bei den 1A8 depletierten Mäuse auf 40,8 pg/ml an, während bei den RB6-8C5 depletierten Tiere kein Anstieg an IL-23 detektiert werden konnte.

3. Ergebnisse

IL-23 wird von Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert.

Da der Klon RB6-8C5 auch an Ly-6C und damit an Monozyten bindet und somit auch zur Depletion der Monozytenpopulation führen kann ist dieser Sachverhalt wahrscheinlich für den fehlenden Anstieg von IL-23 verantwortlich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die spezifische Depletion der Neutrophilen mit Klon 1A8 im peripheren Blut von C57BL/6 Wildtypmäusen zu einem Anstieg von G-CSF, IL-17 und IL-23 führt.

3.1.5 Kontrollexperiment mit NK1.1-Antikörper

Um zu untersuchen, ob die von uns beobachteten Effekte spezifisch für eine antikörper-induzierte Neutrophilendepletion sind oder durch Veränderungen der Knochenmark-Zell-Umgebung zustande kommen, wurden C57BL/6 Mäuse in einem Kontrollexperiment täglich mit einem NK-Zell depletierenden Antikörper NK1.1 (Klon PK 136) behandelt und nach 7 Tagen analysiert.

Der Erfolg der NK-Zelldepletion in der Peripherie wurde durch FACS-Analyse des peripheren Bluts auf CD335 (NK-Zellmarker) und CD49b (Klon DX5) untersucht. Da die doppelpositiven Zellen bei den NK1.1 behandelten Tieren nicht mehr detektiert werden konnten, darf daraus auf eine erfolgreiche Depletion der NK-Zellen im Blut geschlossen werden (Abb. 12).

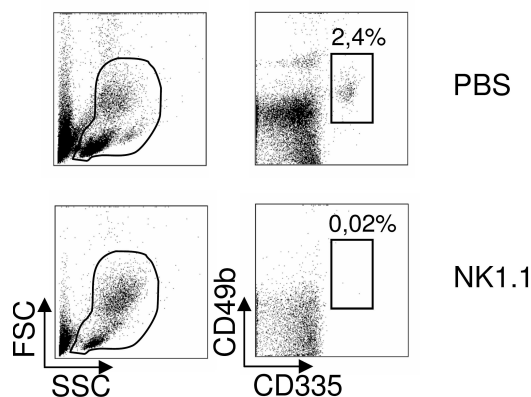


Abbildung 12 Effektive Depletion der NK-Zellen nach Gabe von anti-NK1.1

Die Depletionseffizienz der NK-Zellen wurde durch FACS-Analyse des peripheren Bluts überprüft. Dabei wurde das periphere Blut per FACS auf CD49b und CD335 untersucht. Bei den NK1.1 depletierten Tieren kommt es zu einem Verlust der doppel-positiven Population, was auf eine effektive NK-Zelldepletion hindeutet.

Am Analysentag an Tag 7 nach Depletionsbeginn konnten keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl der Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark detektiert werden. Man kann somit davon ausgehen, dass der von uns beobachtete positive Feedback-Mechanismus bei den Wildtyp-Tieren spezifisch auf die Depletion von neutrophilen Granulozyten zurückzuführen ist (Abb. 13).

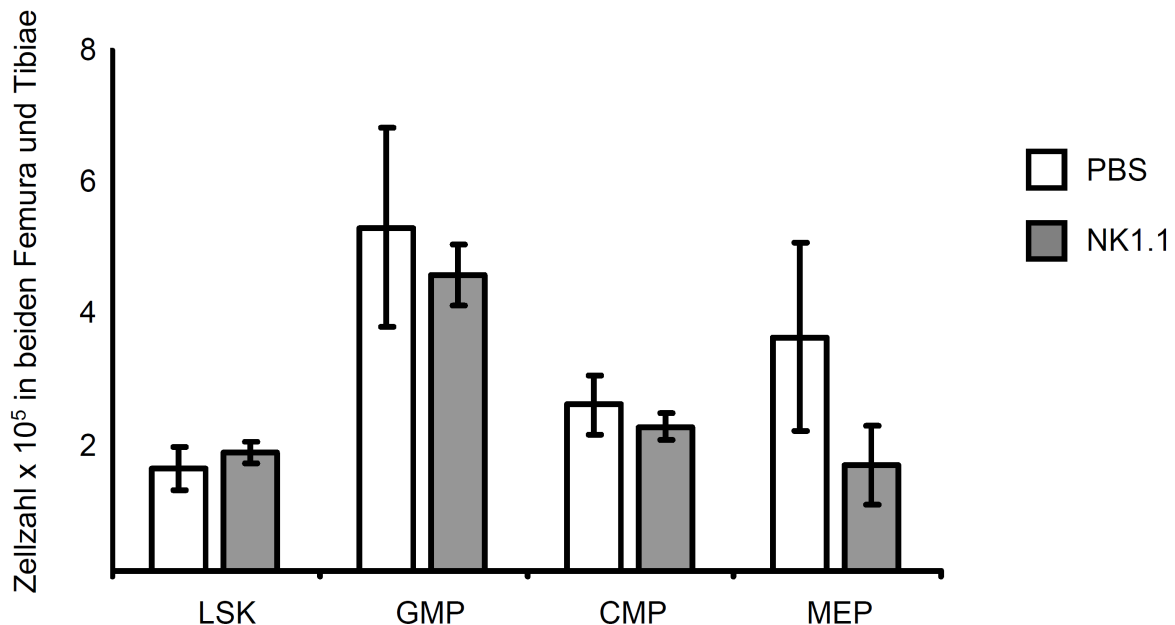


Abbildung 13 Knochenmarkanalyse der NK1.1 injizierten C57BL/6 Tiere

In $n = 5$ C57BL/6 Mäuse wurde für 7 Tage jede 36 h 300 μ g NK1.1- Antikörper i.p. appliziert. Nach 7 Tagen wurden die Tiere analysiert und das Knochenmark auf myeloische Progenitoren und LSK-Zellen untersucht. Es kam es nicht zu signifikanten Veränderungen auf Progenitorebene.

3.2 Antikörperinduzierte Neutropenie in immundefizienten NSG Mäusen

Eine Hauptquelle von IL-17 stellen Lymphozyten, insbesondere T-Zell-Untereinheiten dar (Takatori, Kanno et al. 2009; Cua and Tato 2010). Um den Einfluss von Lymphozyten auf die Neutrophilen-Homöostase im steady-state zu untersuchen, wurden immundefiziente NSG Mäuse eingesetzt. Diese Mäuse haben weder reife B-

3. Ergebnisse

Zellen, noch T-Zellen, noch NK-Zellen. Die Mäuse wurden für 8 Tage mit neutrophilen-depletierendem Antikörper behandelt und analysiert.

3.2.1 Knochenmark

Im Knochenmark kam es nach 8-tägiger Depletion von neutrophilen Granulozyten in NSG Mäusen zu einer starken Expansion der LSK- Zellpopulation ($p(\text{RB6-8C5}) = 0,04$ und $p(1A8) < 0,001$). Zudem stieg die Anzahl an GMP und CMP auf Kosten der MEP an (Abb. 14). Dies war nicht nur in relativen Zahlen gesehen der Fall, sondern auch in Absolutzahlen gesehen. Die Absolutzahlen wurden auf die Gesamtzahl der lebenden Zellen in beiden Hinterläufen der Maus berechnet und ausgewertet (Abb. 15).

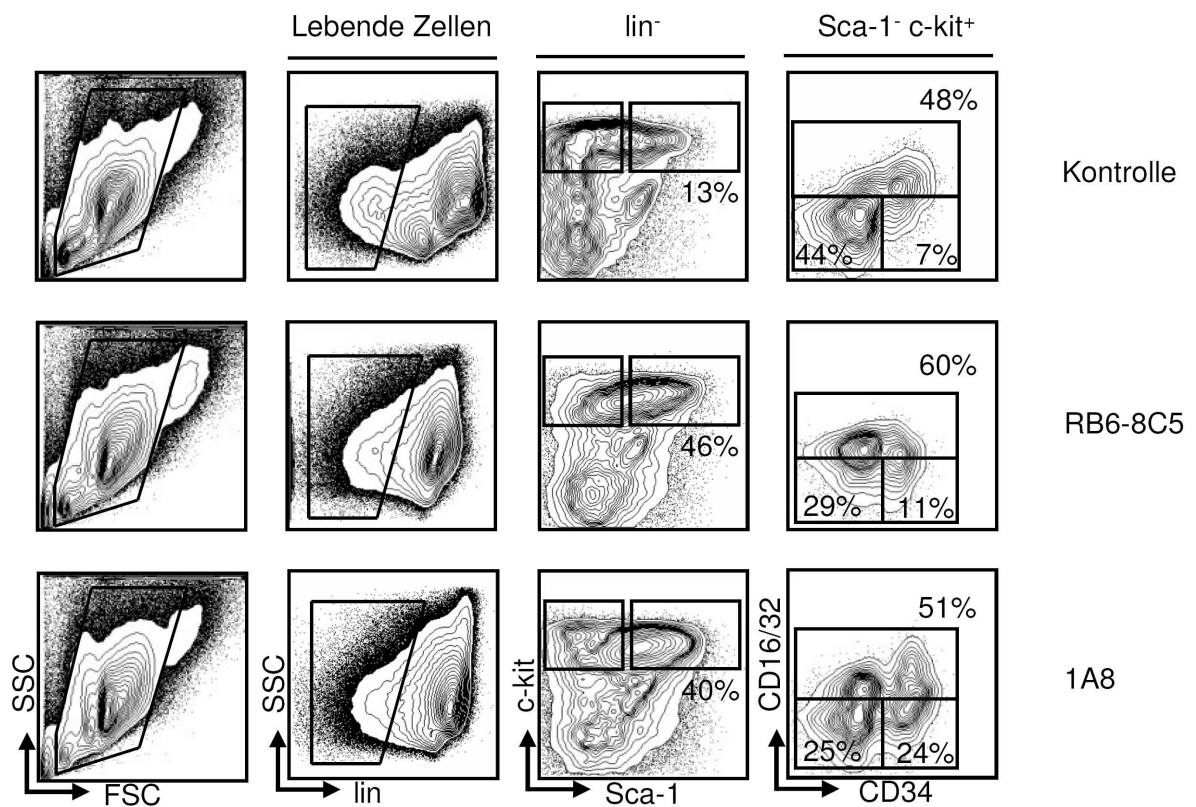


Abbildung 14 Relative Verschiebungen im Knochenmark neutropener NSG Mäuse

3. Ergebnisse

Durchflusszytometrische Analyse an Tag 8 der Erythrozyten-lysierten Knochenmarkszellen in neutropenen NSG Mäusen. Es kann eine starke Expansion der LSK-Zellen beobachtet werden, wie auch eine Verschiebung der myeloischen Progenitoren zu Gunsten der GMP, auf Kosten der MEP.

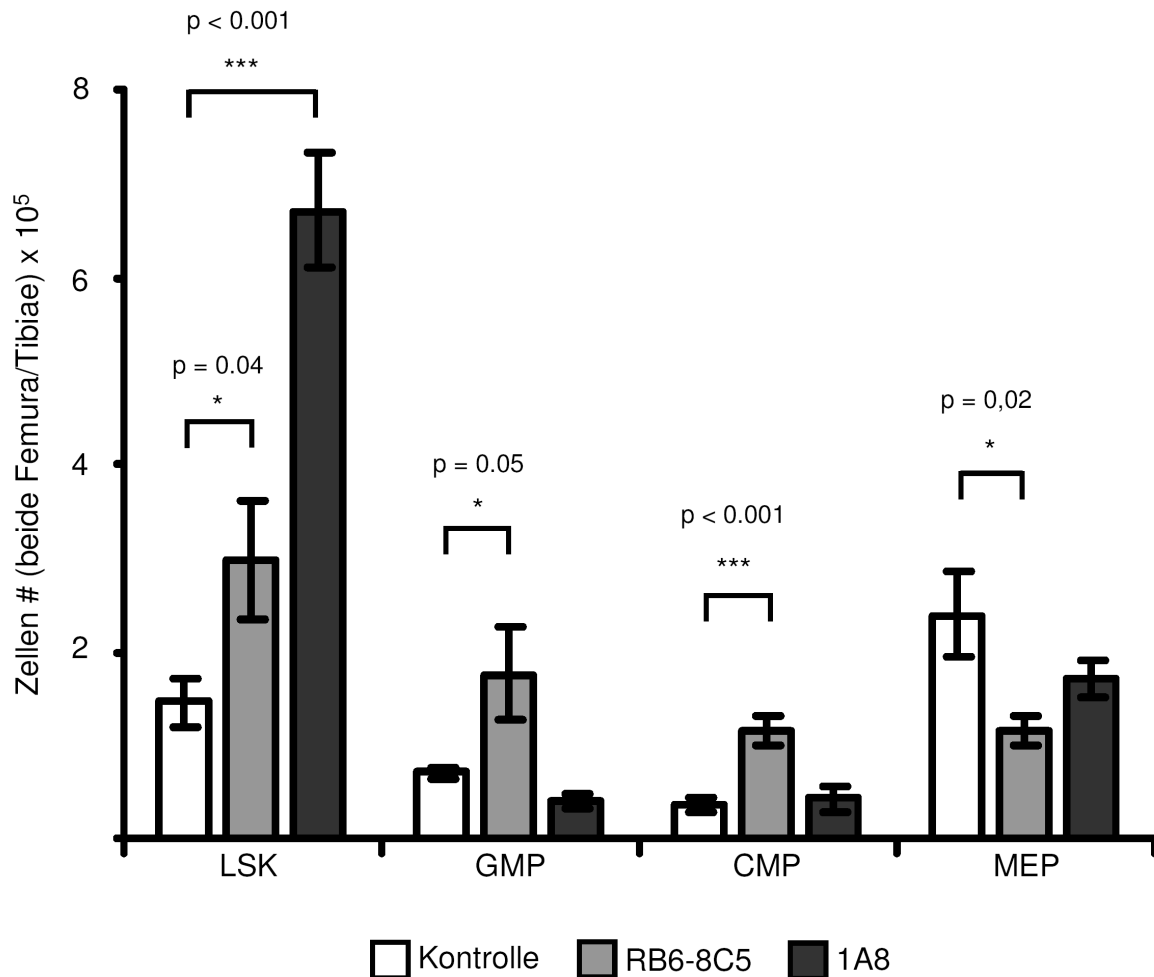


Abbildung 15 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener NSG Mäuse

n = 5 NSG Mäuse wurden neutropen depletiert und die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark per Durchflusszytometrie bestimmt und umgerechnet auf die Gesamtzahl der lebenden Zellen in beiden Hinterläufen. Dabei stiegen die Anzahl der LSK und GMP-Zellen signifikant an.

Im Blut wurde die erfolgreiche Neutrophilendepletion mittels FACS durch das Fehlen der CD11b⁺ und Gr1⁺ doppelpositiven Zellen nachgewiesen.

3.2.2 Zytokingehalt im Blut

Bei der Analyse nach 8 Tagen Neutrophilen-Depletion wurde den Tieren Blut abgenommen und das Plasma abzentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde auf unterschiedliche Zytokine (G-CSF, M-CSF, IL-17 und IL-23) per ELISA untersucht. Der Gehalt an G-CSF im Plasma stieg um das 10-fache von 35 pg/ml bei den PBS-Kontrolltieren auf 370 pg/ml bei den RB6-8C5 depletierten ($p = 0,003$) Tieren an. Bei den mit Klon 1A8 behandelten Tieren stieg der G-CSF Level um das 30-fache auf 1064 pg/ml an ($p < 0,001$) (Abb. 16). Dagegen blieb der Gehalt an M-CSF weitestgehend konstant.

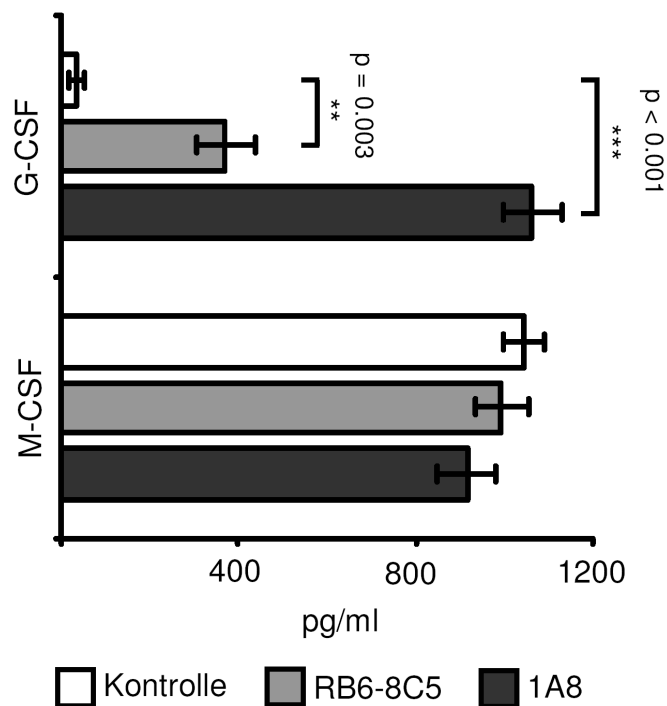


Abbildung 16 G-CSF und M-CSF-Gehalt im Plasma von NSG-Mäusen nach Depletion

Das Plasma der antikörper-induzierten neutropenen NSG-Mäuse und der PBS-Kontrollgruppe wurde an Tag 8 generiert und der Zytokingehalt mittels ELISA gemessen. Jeweils $n = 5$ Tiere wurden untersucht und es konnte ein hoch signifikanter Anstieg an G-CSF in beiden antikörper-behandelten Gruppen festgestellt werden, während der M-CSF Gehalt nahezu konstant blieb.

p-Werte: * $< 0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$

Die IL-17-Spiegel im Plasma lagen bei den immundefizienten NSG- Mäusen unter der vom Hersteller angegebenen Detektionsgrenze, sodass der Anstieg von G-CSF

nicht durch den von Stark et al. gefundenen Feedback-Mechanismus erklärt werden kann. Dieser Mechanismus schreibt IL-17 eine prominente Rolle in der Regulation der Neutrophilenhomöostase über G-CSF zu.

Es muss somit weitere, T-Zell-unabhängige Mechanismen geben, die die neutrophilen Homöostase im steady-state erklären können.

3.3 Granulozytentransfusion

Um zu untersuchen, ob G-CSF abhängig von der neutrophilen Masse reguliert wird, wurden die Neutrophilen von C57BL/6 Empfängermäusen über 8 Tage depletiert und danach mit isolierten und aufgereinigten Neutrophilen aus Spendermäusen transfundiert. Dies führte zu einem Anstieg der Neutrophilenzahlen im peripheren Blut in den Empfängertieren.

Dabei wurden beim ersten Versuch die Donortiere mit 300 µg/kg Körpergewicht rh-G-CSF stimuliert. Dies hatte einen starken Anstieg der Neutrophilen im Blut zu Folge, sodass aus diesen Tieren eine erhöhte Anzahl von Neutrophilen für die Transfusion gewonnen werden konnte. Im nächsten Versuch wurden unstimulierte Donortiere verwendet. Das hatte zur Folge, dass mehr Tiere ausgeblutet werden mussten um auf die gleiche Gesamtzahl an Neutrophilen zu kommen.

Die Neutrophilenaufreinigung wurde mittels Ficoll (Histopaque 1077 und Histopaque 1119) durchgeführt und $3,5 \times 10^6$ Zellen in neutropene Mäuse transfundiert. Kurz vor der Transfusion und 24 h danach wurde Blut von den Empfängertieren abgenommen, durchflusszytometrisch bestimmt, ein Differentialblutbild erstellt und das Plasma abzentrifugiert.

Der G-CSF-Gehalt des Plasmas wurde mittels ELISA bestimmt und die Differenz des G-CSF-Spiegels vor Transfusion vs. danach berechnet.

Im FACS konnte im Blut eine Erhöhung der Granulozytenzahl detektiert werden, allerdings spiegelt sich dieser Sachverhalt nicht in starken Veränderungen des G-CSF Gehalts wieder. Es kam zu keinen signifikanten Veränderungen, die Änderungen waren sehr heterogen (Abb. 17).

3. Ergebnisse

Diese Ergebnisse wurden sowohl mit Neutrophilen aus unstimulierten als auch aus rh-G-CSF stimulierten Tieren erzielt.

Daraus kann geschlossen werden, dass die Neutrophilenmasse nicht direkt den G-CSF Spiegel bestimmt.

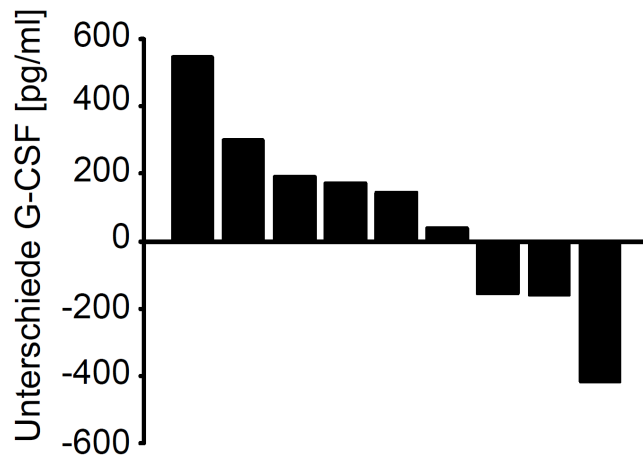


Abbildung 17 Veränderungen des G-CSF Gehalts vor und nach Transfusion von Neutrophilen

Untersuchung des G-CSF Gehalts im Plasma 24 h nach Transfusion von $3,5 \times 10^6$ Neutrophilen in $n = 9$ C57BL/6- Mäuse im Vergleich mit dem G-CSF Gehalt kurz vor Transfusion. Der G-CSF Spiegel wurde mittels ELISA bestimmt und die Differenz vorher vs. nachher gebildet. Es ergeben sich heterogene Daten, ohne signifikante Veränderungen.

3.4 Injektion von rh-G-CSF

3.4.1 Veränderungen im Knochenmark

Um die transkriptionale Regulation von G-CSF als Antwort auf Neutrophilie zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse täglich mit $300 \mu\text{g}$ pro kg Körpergewicht rh-G-CSF s.c. gespritzt.

Nach 5 Tagen wurden die Tiere getötet, analysiert und das Blut und Knochenmark untersucht.

Im Knochenmark war eine Expansion an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (LSK) um das 4-fache in Absolutzahlen ($p < 0,001$) und ein 3-facher

3. Ergebnisse

Anstieg der GMP ($p = 0,007$) auf Kosten der MEP ($p < 5 \times 10^{-5}$) (Abb. 18 und 19) dokumentierbar.

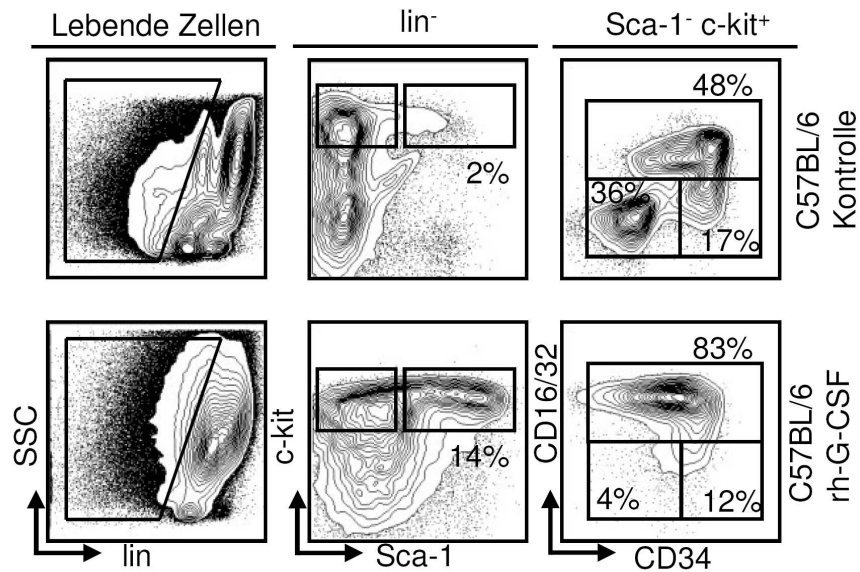


Abbildung 18 Relative Veränderungen im Knochenmark bei rh-G-CSF behandelten Mäusen

An Tag 5 nach der Behandlung mit rh-G-CSF wurden die Tiere geopfert und durchflusszytometrisch analysiert. Bemerkenswert sind die phänotypisch gleichen relativen Veränderungen verglichen mit neutropenen Tieren: ein relativer Anstieg der LSK- Population und GMP, ein Abfall der MEP.

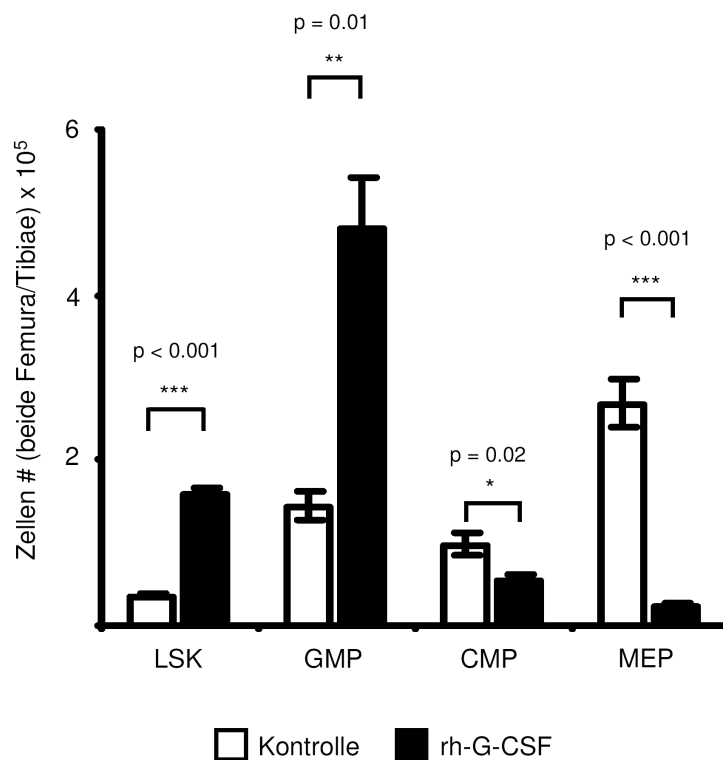


Abbildung 19 Absolute Veränderungen im KM bei rh-G-CSF behandelten C57BL/6 Mäusen

Auch in absoluten Zahlen wurden bei den neutropilen, rh-G-CSF behandelten C57BL/6 Mäusen ähnliche Veränderungen im Vergleich mit neutropenen Wildtypmäusen beobachtet.

3.4.2 G-CSF Gehalt auf Transkriptionsebene

Als nächstes wurde RNA aus kernhaltigen Knochenmarkzellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Der G-CSF Gehalt auf Transkriptionsebene wurde mit dem LC480 System und dem Taqman Gene Expression Assay (Referenzgen β -Actin) bestimmt und quantifiziert.

In den cDNA-Proben der Wildtypmäuse kam es zu einem Anstieg von G-CSF. Bei den Tieren, die mit rh-G-CSF behandelt wurden konnte ein signifikanter Abfall an G-CSF beobachtet werden, obwohl sich die neutrophilen und neutropenen Tiere phänotypisch gesehen nicht voneinander unterscheiden lassen (Abb. 20).

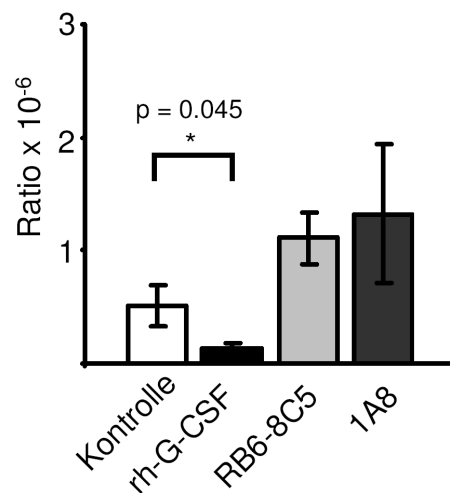


Abbildung 20 Ratio von G-CSF auf Transkriptionsebene

Aus lysierten Knochenmarkzellen unterschiedlich behandelter C57BL/6- Mäuse wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Die Ratio wurde gegenüber dem Referenzgen β -Actin berechnet. Bei der Gabe von exogenem rh-G-CSF wurde eine signifikante Reduktion der G-CSF Transkription detektierbar, wohingegen bei den neutropenen Tieren die Transkription leicht anstieg.

p-Werte: * < 0,05, **<0,01, ***<0,001

Dies deutet auf einen negativen Feedback-Mechanismus hin, bei der die G-CSF induzierte neutrophile Leukocytose zu einer Herabregulierung der G-CSF Transkription im Knochenmark führt.

Diese angestiegene G-CSF Transkription bei Neutropenie und das Absinken nach Gabe von exogenem G-CSF, welches zu einer Neutrophilie führt, ist ein Anzeichen für einen Sensing-Mechanismus der neutrophilen Masse, nachgefolgt von einem negativen regulatorischen transkriptionalen Feedback-Mechanismus.

Durch die vergleichbaren Ergebnisse, welche bei antikörper-induzierter Neutropenie in Wildtyp-Mäusen und NSG Mäusen erhalten wurden kann geschlossen werden, dass der positive Feedback-Mechanismus unabhängig von IL-17 und TH₁₇-Zellen und NK-Zellen ist.

3.5 Germ-free Mäuse (Keimfreie Wildtypmäuse)

Es ist beschrieben, dass die bakterielle Besiedlung bei der Entwicklung der angeborenen und erworbenen Immunantwort einen starken Einfluss hat (reviewed in (Gordon 2002; Medzhitov and Janeway 2002)).

Unsere nächste Hypothese war, dass die steady-state Granulopoese indirekt von der mikrobiellen Besiedlung beeinflusst wird. Daher haben wir keimfrei gehaltene C57BL/6 Mäuse im steady-state untersucht, denen durch eine spezielle Haltung in Isolatoren die komplette bakterielle Besiedlung fehlt.

3.5.1 Neutrophile Depletion in keimfreien C57BL/6 Mäusen

Verglichen mit C57BL/6 Mäusen unter SPF-Bedingungen haben keimfreie C57BL/6 Mäuse eine verminderte Anzahl an Leukozyten (7300 Zellen/ μ l vs. 3400 Zellen/ μ l; $p = 0,045$) und Gr1⁺/CD11b⁺ Neutrophilen (1424 Zellen/ μ l vs. 374 Zellen/ μ l; $p = 0,006$). Diese Ergebnisse spiegeln bereits beschriebene Beobachtungen in keimfrei gehaltenen Ratten wieder, die um 90 % verminderte Neutrophilenzahlen im Blut haben, verglichen mit Ratten in SPF-Haltung (Ohkubo, Tsuda et al. 1999).

Um den Einfluss von mikrobieller Besiedlung in der neutrophilen Homöostase zu untersuchen, wurden die keimfrei gehaltenen Wildtypmäuse mit 1A8-Antikörper bzw.

3. Ergebnisse

PBS i.p. gespritzt. Dabei wurden eine erhöhte Antikörperdosis (1,25 mg) und längere Zeitintervalle zwischen den Injektionen gewählt, da die Tiere nur innerhalb spezieller Isolatoren gespritzt werden konnten, was die Handhabung deutlich erschwerte und die Gefahr von Komplikationen erhöhte.

An Tag 8 wurden die Tiere geopfert, analysiert und das Knochenmark und Blut untersucht.

Die Effizienz der Depletion wurde mittels FACS-Färbung des Blutes (Gr1 und CD11b) ermittelt. Es ergab sich eine fast vollständige Depletion an neutrophilen Granulozyten in der Peripherie (Abb. 21).

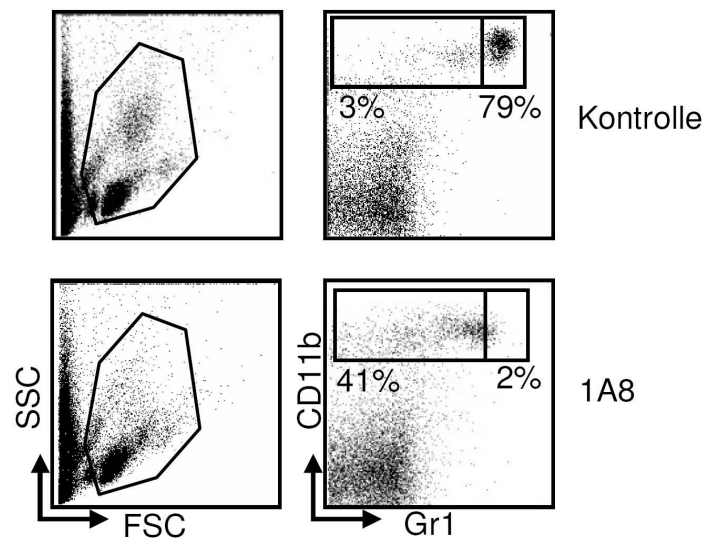


Abbildung 21 Bestimmung der Depletionseffizienz in keimfreien C57BL/6 Mäusen

Die keimfreien C57BL/6 Tiere wurden für 8 Tage mit 1,25 mg 1A8 alle 48 h depletiert. Die erhöhte Dosis und die verlängerten Injektionsintervalle wurden gewählt, um Komplikationen zu vermeiden. Durch das Fehlen der Gr1⁺ und CD11b⁺ doppelpositiven myeloischen Zellen, ist die effektive Neutrophilendepletion nachgewiesen.

3.5.1.1 Knochenmark

Im Knochenmark der keimfreien Wildtypmäuse wurden nach antikörper-induzierter Neutropenie auf Vorläuferebene ähnliche Veränderungen im Vergleich zu SPF-

3. Ergebnisse

gehaltenen Mäusen unter den gleichen Versuchsbedingungen detektierbar. Die Anzahl der LSK- und GMP Zellen stieg sowohl absolut, als auch relativ an.

Die LSK-Zellen stiegen von $0,31 \times 10^5 \pm 0,14 \times 10^5$ Zellen in der PBS-Kontrolle zu $1,72 \times 10^5 \pm 0,54 \times 10^5$ Zellen in den Antikörper-behandelten Tieren an ($p = 0,025$).

Bei den GMP-Zellen konnte ein Anstieg von $3,18 \times 10^5 \pm 0,28 \times 10^5$ (PBS) zu $9,25 \times 10^5 \pm 0,49 \times 10^5$ (1A8), ($p = 0,04$) gezeigt werden (Abb. 22).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der positive Feedback-Mechanismus auf Progenitorebene unabhängig von kommensalen Bakterien verläuft.

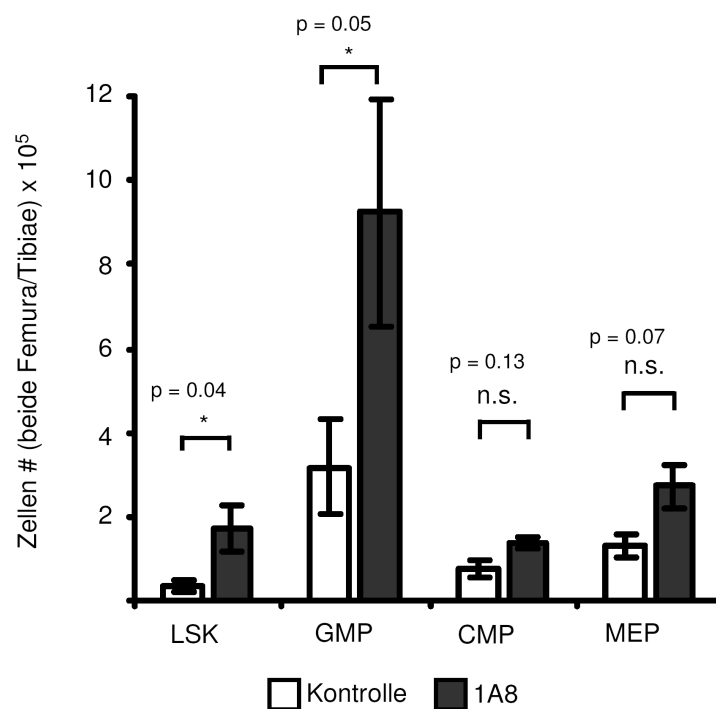


Abbildung 22 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener keimfreier C57BL/6 Mäuse

n = 3 keimfreie C57BL/6 Mäuse wurden mit 1,25 mg 1A8 à 48 h depletiert und an Tag 8 analysiert. Die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark wurden per Durchflusszytometrie detektiert und auf die Gesamtzahl der lebenden Zellen in beiden Hinterläufen umgerechnet. Dabei stiegen die Anzahl der LSK und GMP-Zellen signifikant an.

p-Werte: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001

3.5.1.2 Zytokingehalt im Plasma

Auf Zytokin-Ebene im Plasma wurde eine signifikante Erhöhung des G-CSF Spiegels der keimfreien C57BL/6- Mäuse bezogen auf die Kontrollgruppe vs. 1A8-

3. Ergebnisse

depletierte Gruppe deutlich. Der G-CSF Gehalt stieg um das 8,5-fache von 34 pg/ml auf 293 pg/ml an ($p = 0,015$) (Abb. 23).

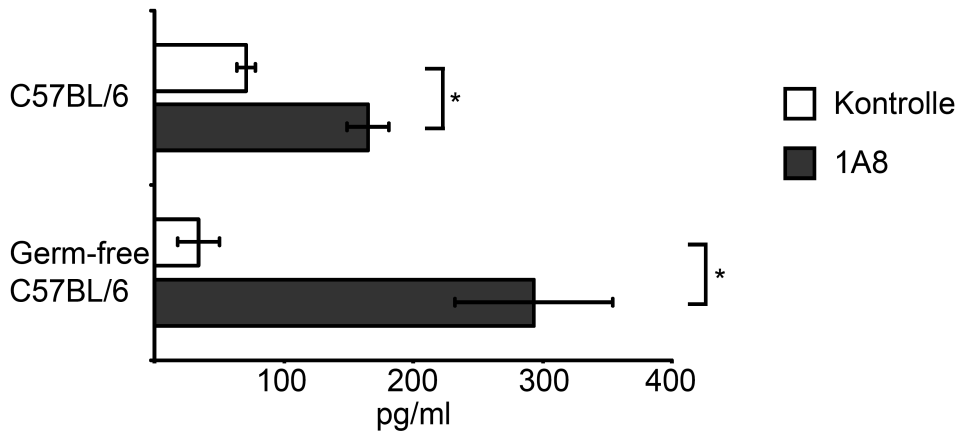


Abbildung 23 G-CSF im Plasma von keimfreien C57BL/6 im Vergleich mit C57BL/6

Jeweils $n = 3$ keimfreie C57BL/6 Mäuse wurden mit 1,25 mg 1A8 alle 48 h depletiert oder erhielten PBS als Kontrolle. An Tag 8 wurden die Tiere analysiert. Das Blutplasma wurde per ELISA auf den G-CSF Gehalt untersucht und mit C57BL/6 Mäusen unter SPF- Bedingungen verglichen. Unter beiden Bedingungen konnte nach Antikörper-induzierter Neutrophilendepletion ein Anstieg an G-CSF dokumentiert werden. Jedoch war der G-CSF Gehalt in den keimfreien C57BL/6 Mäusen im steady-state geringer im Vergleich zu den SPF- C57BL/6 Mäusen.

Es kann somit gezeigt werden, dass der Verlust an mikrobieller Besiedlung zu einem Absinken des G-CSF-Grundspiegels führt (ca. 35 pg/ml), verglichen mit dem G-CSF Gehalt in SPF-gehaltenen Mäusen des selben Stammes (ca. 70 pg/ml).

Da die keimfreien Mäuse aber ähnliche Feedback-Antworten wie Mäuse unter SPF-Bedingungen liefern, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Besiedlung mit kommensalen Bakterien keine unabdingbare Voraussetzung für die homöostatische Feedback-Granulopoese darstellt.

3.5.2 Injektion der maximalen LPS- Dosis im Antikörper

Als *in vivo* verwendete Antikörper wurden „Endotoxin low“ Antikörper verwendet. Allerdings sind auch dort Reste von Endotoxin enthalten, da eine komplette Freiheit

3. Ergebnisse

an Endotoxin in der Umgebung aus technischen Gründen nicht gewährleistet werden kann (Hrncir, Stepankova et al. 2008).

Für die Überprüfung, ob diese geringen Endotoxin-Konzentrationen für die von uns beobachteten Ereignisse verantwortlich sind, wurden C57BL/6 Mäuse mit der maximalen Dosis an LPS, die im Antikörper laut Herstellerfirma vorliegen kann (2 EU/mg Antikörper, LAL Test) behandelt. Nach 8 Tagen intraperitonealer Applikation jede 36 h wurden die Tiere getötet und analysiert.

Es kam auf Knochenmarkebene nicht zu signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS-behandelt) (Abb. 24), so dass davon auszugehen ist, dass die sehr geringe Konzentration an Endotoxin im Antikörper nicht für die zu beobachtenden Verschiebungen im Knochenmark verantwortlich ist.

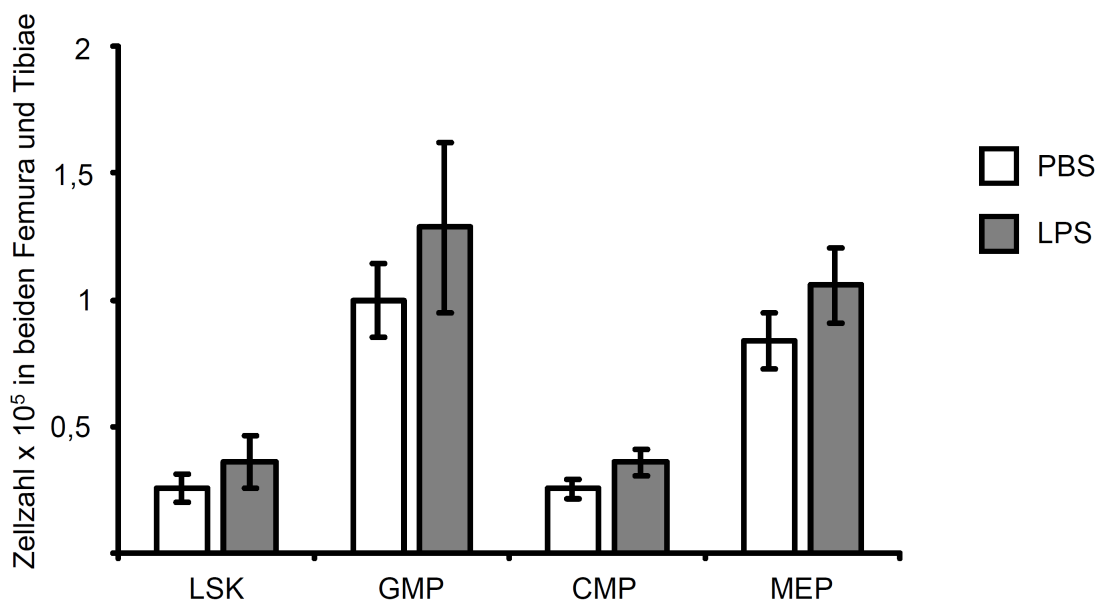


Abbildung 24 Knochenmarkanalyse der mit 2 EU LPS injizierten C57BL/6 Mäuse

N = 5 C57BL/6 Mäuse wurden mit 2EU LPS aus E.coli in 200 µl PBS für 8 Tage i.p behandelt. Nach 8 Tagen wurden die Tiere analysiert und das Knochenmark auf Progenitorebene untersucht. Es fanden sich keine signifikanten Veränderungen im Vergleich mit den PBS behandelten Kontrolltieren.

3.6 Applikation von anti-G-CSF mit gleichzeitiger Neutrophilen-Depletion

Um den Einfluss von zirkulierendem G-CSF in der Peripherie von Wildtypmäusen überprüfen zu können, wurden $n = 8$ C57BL/6 Mäuse mit $10 \mu\text{g}$ anti-G-CSF (Mab 414) täglich über einen Zeitraum von 8 Tagen behandelt (Shojaei, Wu et al. 2009). Gleichzeitig wurde bei $n = 4$ Mäusen eine antikörper-induzierte Neutropenie mit 1 mg Klon 1A8, jede 36 h durchgeführt. $n = 4$ Mäuse bekamen PBS als Kontrolle i.p. gespritzt. Nach 8 Tagen wurden die Tiere analysiert und das Knochenmark auf Progenitorebene per FACS analysiert.

Im peripheren Blut sieht man als einzige Veränderung die erwartete signifikante Reduktion von Neutrophilen in der Versuchs-Gruppe. Die Zahl der Monozyten und Lymphozyten veränderte sich nicht (Abb. 25).

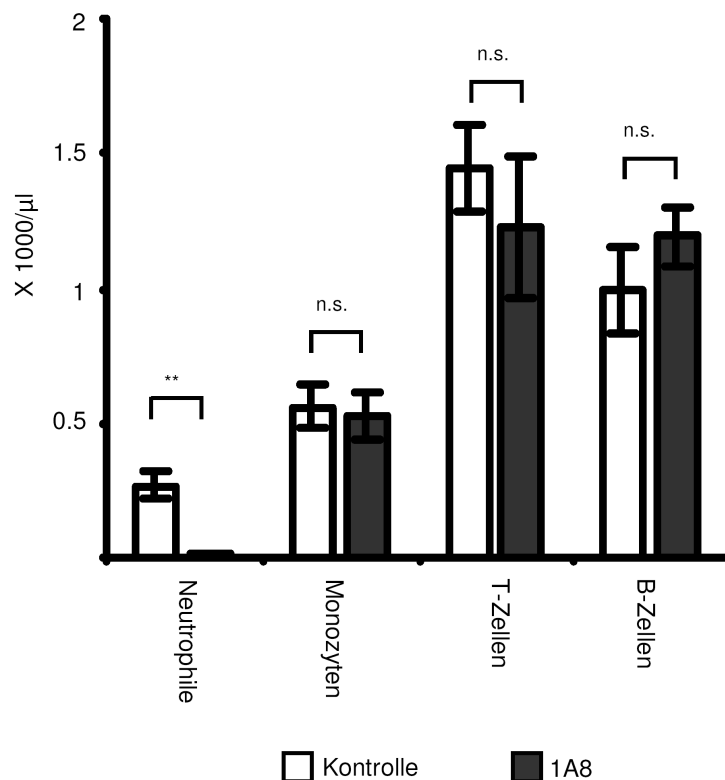


Abbildung 25 Peripheres Blut der anti-G-CSF behandelten und neutrophil-depletierten C57BL/6
Das periphere Blut von anti-G-CSF behandelten und gleichzeitig neutrophil depletierten C57BL/6 Mäuse oder Kontrolltieren wurde an Tag 8 abgenommen und das Differentialblutbild bestimmt. Der erhaltene WBC wurde mit den Prozentzahlen der Subpopulationen aus dem FACS verrechnet und somit auf die Absolutzahlen der Zellen geschlossen.

3. Ergebnisse

Im Knochenmark kam es sowohl bei den LSK-Zellen ($p = 0,92$), als auch bei den GMP ($p = 0,14$), CMP ($p = 0,90$) und MEP- Populationen ($p = 0,16$) nicht zu signifikanten Veränderungen (jeweils $n = 4$ pro Gruppe) (Abb. 26).

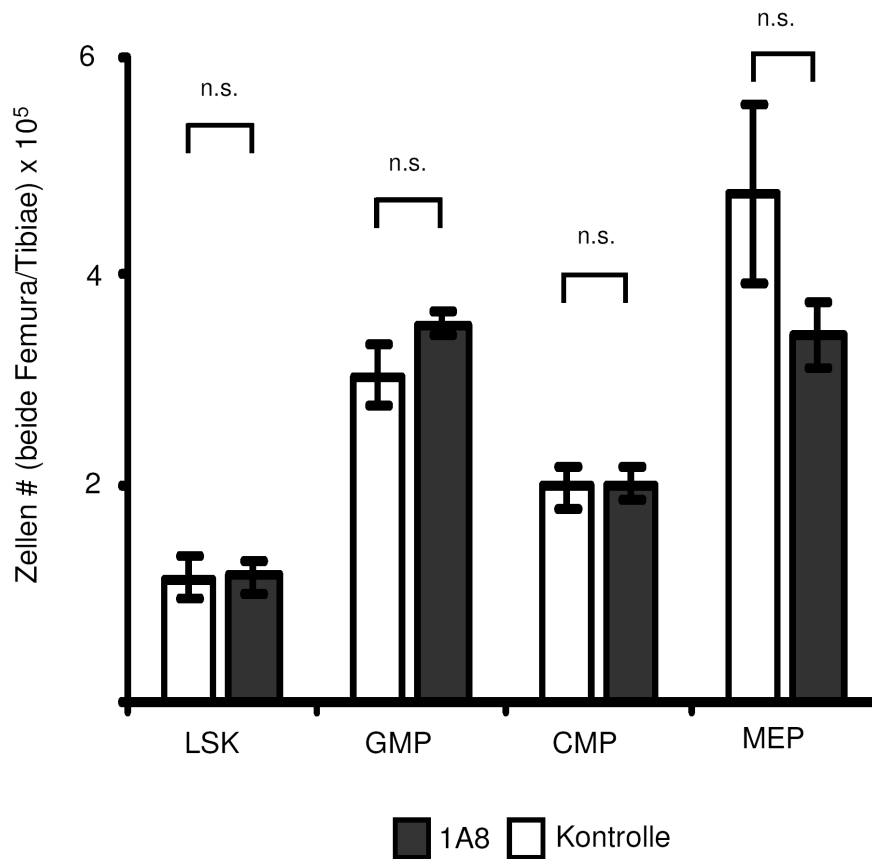


Abbildung 26 Absolute Progenitorzahlen der anti-G-CSF behandelten und neutrophil-depletierten C57BL/6

Das Knochenmark der anti-G-CSF behandelten und neutrophil-depletierten C57BL/6 bzw. der Kontrolltiere wurde an Tag 8 geerntet, die roten Blutzellen lysiert und per FACS der Anteil der Progenitorzahlen ermittelt. Diese Prozentzahlen wurden mit der Gesamtzellzahl in den beiden Hinterläufen verrechnet und so auf die Absolutzahlen geschlossen.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die erhöhten G-CSF Spiegel der neutropenen Tiere ursächlich für Feedback-Phänomene auf Knochenmarkebene verantwortlich sind und eine G-CSF Neutralisation den Feedback komplett unterbindet.

3.7 Einfluss von Toll-Like Rezeptoren

Da auch bei keimfreien Mäusen Endotoxinreste im Wasser und im Futter vorhanden sind (Hrncir, Stepankova et al. 2008), haben wir den Einfluss von Toll-Like Rezeptoren auf die Neutrophilen-Homöostase überprüft.

Endotoxin (LPS) ist der Ligand von TLR 4. Daher haben wir C3H/HeJ Mäuse eingesetzt, die eine Spontanmutation im Tlr4 Gen aufweisen. Diese Tiere sind resistent gegen Endotoxin und auf C3H Hintergrund gezüchtet. Als Kontrolltiere wurden daher C3H/N Mäuse verwendet.

Alle Tiere wurden nach dem üblichen Antikörper-Applikationsschema für 8 Tage mit Klon 1A8 behandelt bzw. mit PBS als Kontrolle gespritzt, danach geopfert und das Blut und Knochenmark auf Knochenmarkprogenitorebene, transkriptionaler Ebene und Proteinebene analysiert.

3.7.1 C3H/N und C3H/HeJ Mäuse

Die Effizienz der Depletion im Blut wurde mittels FACS auf die Gr1⁺ und CD11b⁺ doppeltpositive Zellpopulation überprüft. Im Knochenmark wurden myeloische Progenitorzellen (GMP, CMP und MEP) und LSK-Zellen untersucht.

Bei den C3H/N Mäusen, die als Wildtypkontrollen dienten, wurden erwartungsgemäß ähnliche Veränderungen wie in C57BL/6, NSG und keimfreien C57BL/6 Mäusen detektiert. Es kam zu einem starken, signifikanten Anstieg von LSK und GMP und zu einer Absenkung der MEP-Zellen. Dies war sowohl in relativen als auch in absoluten Zahlen zu beobachten (Abb. 28).

Auch im Blutplasma ließ sich ein signifikanter Anstieg von G-CSF beobachten (Abb. 32).

Eine mäusestammspezifische Phänomenologie des beschriebenen Feedback kann daher ausgeschlossen werden.

3. Ergebnisse

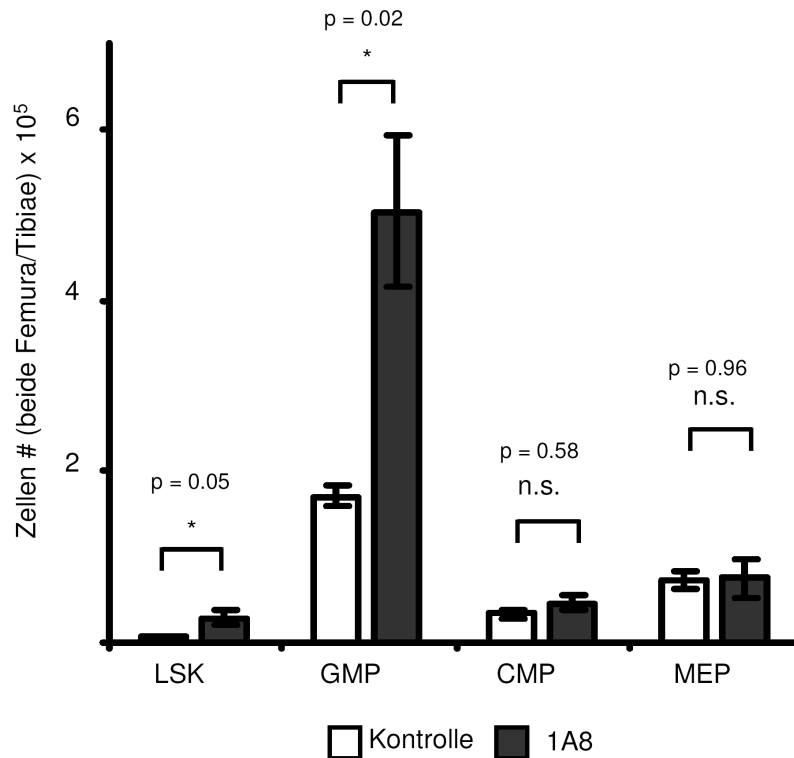


Abbildung 27 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener C3H/N Mäuse

In der Versuchsgruppe wurde eine antikörper-induzierte Neutropenie bei C3H/N Mäusen durchgeführt oder die Kontrollgruppe mit PBS behandelt. An Tag 8 wurden beide Gruppen geopfert und analysiert. Die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark wurden per Durchflusszytometrie bestimmt und auf die Gesamtzahl der lebenden Zellen in beiden Hinterläufen umgerechnet. Dabei stiegen die Anzahl der LSK und GMP-Zellen signifikant an (n = 4 pro Gruppe).

Bei den C3H/HeJ Tieren wurden nach 8 Tagen Depletion der Neutrophilen mit 1A8 vergleichbare Zellzahlen im Knochenmark zwischen der PBS-Gruppe und der Antikörpergruppe erreicht.

Die GMP waren in absoluten Zellzahlen der beiden Hinterläufe vergleichbar $4,2 \times 10^5$ (PBS) und $4,06 \times 10^5$ (1A8) $p = 0,73$ wie auch die Anzahl der MEP $2,41 \times 10^5$ (PBS) und $2,19 \times 10^5$ (1A8) in den beiden Hinterläufen der Mäuse.

Die Anzahl an LSK-Zellen stieg nur leicht und nicht signifikant von $0,14 \times 10^5$ auf $0,28 \times 10^5$ an ($p = 0,17$) (Abb. 28 und 29).

3. Ergebnisse

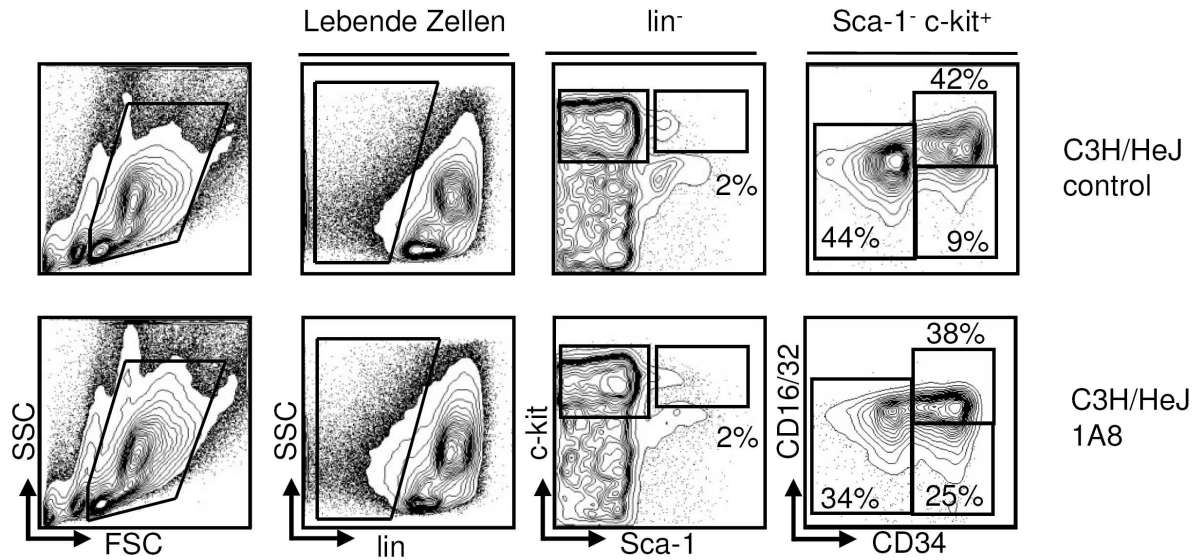


Abbildung 28 Relative Veränderungen im Knochenmark neutropener C3H/HeJ-Mäusen

C3H/HeJ Mäuse wurden mit anti Ly-6G Klon 1A8 depletiert oder mit PBS behandelt. Die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark wurden per Durchflusszytometrie bestimmt und mit der PBS-Kontrollgruppe verglichen. Es kam relativ gesehen zu keinen signifikanten Unterschieden (n = 5 pro Gruppe).

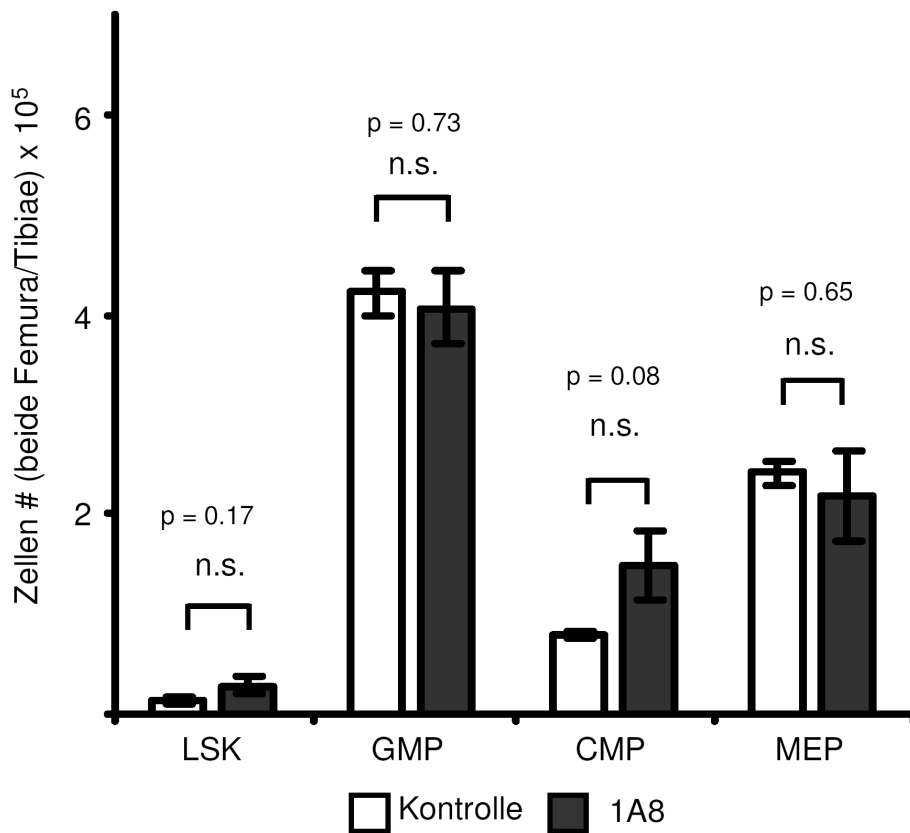


Abbildung 29 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener C3H/HeJ Mäuse

Auch in Absolutzahlen gesehen konnten keine Veränderungen bei den neutropenen C3H/HeJ Mäusen im Vergleich mit der Kontrollgruppe detektiert werden.

3.7.2 C3H/HeJ/TLR2-KO Mäuse

In der nächsten Versuchsreihe wurden C3H/HeJ/TLR2-KO Mäuse, also Tiere mit einer Spontanmutation im Tlr4 Gen und zusätzlichem klassischen knock-out des TLR2 Gens für die Analyse verwendet.

Auch bei diesen Tieren blieb die Anzahl an myeloischen Progenitoren im Knochenmark konstant. Die GMP blieben bei $3,9 \times 10^5$ (Kontrolle) zu $3,55 \times 10^5$ (1A8) recht unverändert, $p = 0,63$, die CMP blieben bei $0,41 \times 10^5$ (PBS) vs. $0,49 \times 10^5$ (1A8) und die MEP bei $1,31 \times 10^5$ (PBS) $0,68 \times 10^5$ (1A8) $p = 0,41$ recht konstant.

Es konnten auch keine Veränderungen der LSK-Zellen detektiert werden. Diese Zellpopulation blieb fast unverändert bei $0,75 \times 10^5$ (PBS) zu $0,68 \times 10^5$ (1A8) bezogen auf die lebenden Zellen in beiden Femura und Tibiae (Abb. 30).

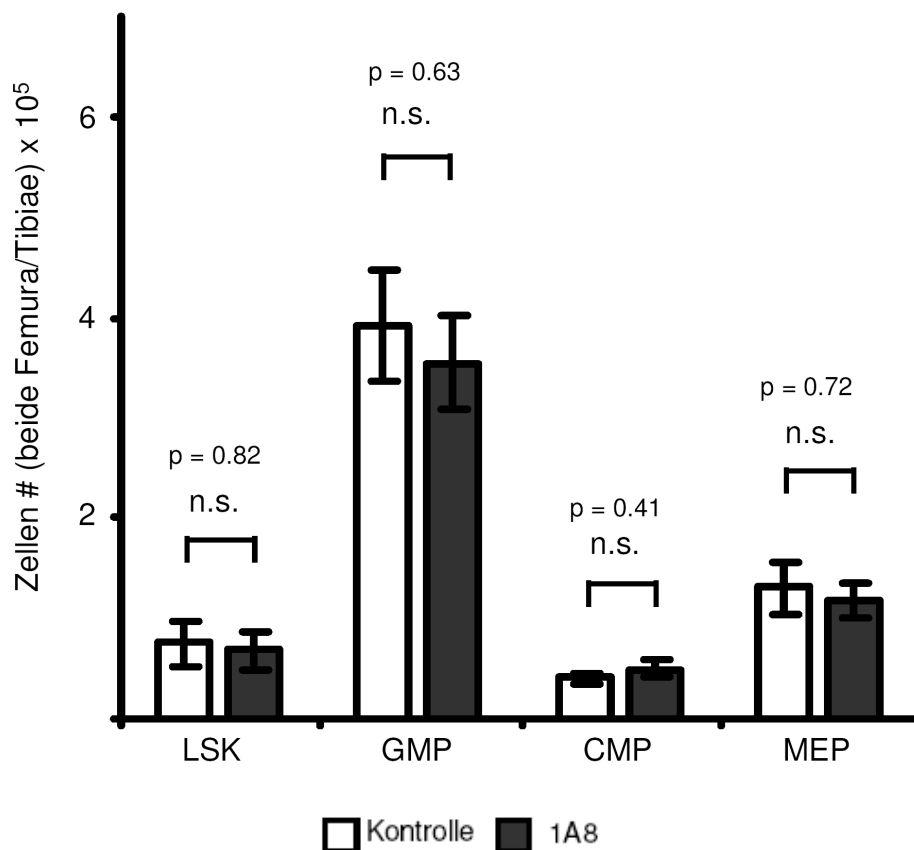


Abbildung 30 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener C3H/HeJ/TLR2-KO Mäuse

In C3H/HeJ/TLR2-KO Mäuse wurden eine antikörper-induzierten Neutropenie durchgeführt und an Tag 8 die hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark per Durchflusszytometrie bestimmt und auf absolute Zellzahlen in beiden Hinterläufen der Mäuse umgerechnet. Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

3. Ergebnisse

Aus dem Blutplasma wurden ELISAs für das Zytokin G-CSF angefertigt. Der G-CSF-Spiegel stieg in den C3H/N Mäusen nach Neutropenie um das 8,5 fache von 156 pg/ml auf 1318 pg/ml an ($p = 0,002$). Die Wildtypmäuse des C3H-Stammes verhielten sich somit ähnlich wie Wildtyptiere des C57BL/6 Stammes. Dahingegen wurde bei den C3H/HeJ Mäusen und den C3H/HeJ/TLR2-KO Mäusen nur ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg detektiert (Abb. 31).

Daraus lässt sich schließen, dass die Erhöhung des G-CSF Spiegels nach antikörper-induzierter Neutropenie abhängig von TLR4 ist.

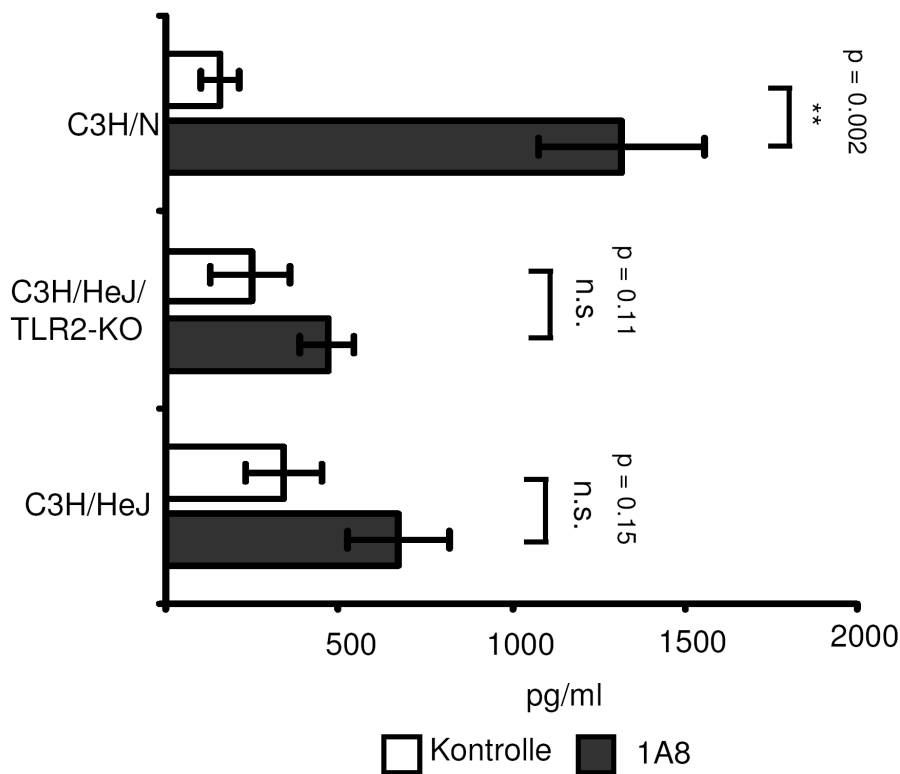


Abbildung 31 G-CSF im Plasma von unterschiedlichen neutropenen Mäusen auf C3H-background

Der G-CSF-Gehalt im Plasma von Kontrolltieren und Antikörper-behandelten C3H/N Wildtyp, C3H/HeJ und C3H/HeJ/TLR2-KO Mäusen wurde mittels ELISA bestimmt. Bemerkenswert ist der signifikante Anstieg an G-CSF in den C3H/N Wildtypmäusen und die nicht signifikanten Veränderungen in den C3H/HeJ und C3H/HeJ/TLR2-KO Mäusen ($n = 5$ pro Gruppe).

Auffallend ist der erhöhte steady-state Level an G-CSF bei den Mäusen mit dem Background des Stammes C3H im Vergleich zu Mäusen des C57BL/6 Stammes. Dies deutet darauf hin, dass unter nicht-infektiösen, steady-state Bedingungen verschiedene Mausstämme unterschiedliche Grundspiegel an G-CSF aufweisen.

3.7.3 TLR4^{-/-} Mäuse

Die Ergebnisse bei den C3H/HeJ Tieren zeigen eine Abhängigkeit des Feedback-Mechanismus von TLR4. Allerdings handelt es sich bei den C3H/HeJ Tieren nicht um klassische knock-out Tiere sondern um mutierte Tiere. Aus diesem Grunde wurden im nächsten Versuch klassische TLR4 knock-out Mäuse auf C57BL/6 background getestet.

Diese Tiere wurden mit Klon 1A8 für 8 Tage neutrophil depletiert und im Anschluss getötet und auf Verschiebungen auf Proteinebene im Plasma und im Knochenmark auf Progenitorebene analysiert.

Erneut stellten sich keine signifikanten Änderungen auf Progenitorebene im Knochenmark dar. Die LSK Zellen stiegen nicht signifikant von $1,26 \times 10^5$ (Kontrolle) auf $1,75 \times 10^5$ an $p = 0,27$, die GMP stiegen von $2,49 \times 10^5$ auf $3,0 \times 10^5$ $p = 0,22$. Die MEP Zellen sanken leicht ab von $2,32 \times 10^5$ auf $1,87 \times 10^5$ Zellen ($p = 0,38$) (Abb. 33).

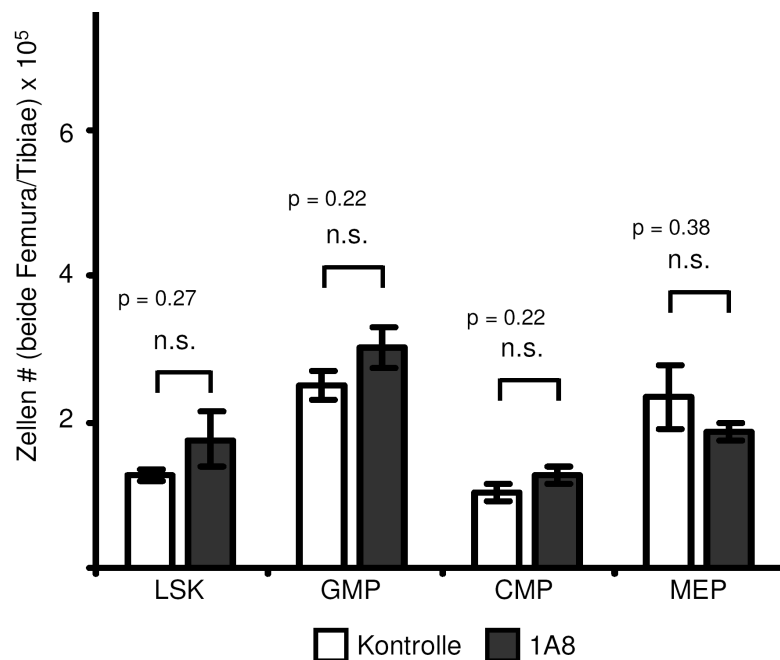


Abbildung 32 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener TLR4^{-/-} Mäuse

Die Neutrophilen im peripheren Blut von je $n = 5$ TLR4^{-/-} Mäuse auf C57BL/6 Background wurden depletiert oder mit PBS behandelt und die Tiere an Tag 8 geopfert und analysiert. Die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark wurden per Durchflusszytometrie bestimmt und umgerechnet auf die Gesamtzahl der lebenden Zellen in beiden Hinterläufen. Bemerkenswert sind die nicht signifikanten Veränderungen der LSK und myeloischen Progenitorzellen.

3. Ergebnisse

Auf Plasmaebene blieb der G-CSF Spiegel unverändert: 78,3 pg/ml in den PBS-behandelten Kontrollen vs. 77,3 pg/ml in den neutropenen Mäusen ($p = 0,38$) (Abb. 34). Diese Levels sind vergleichbar mit den steady-state G-CSF-Spiegeln im Plasma von C57BL/6 Tieren.

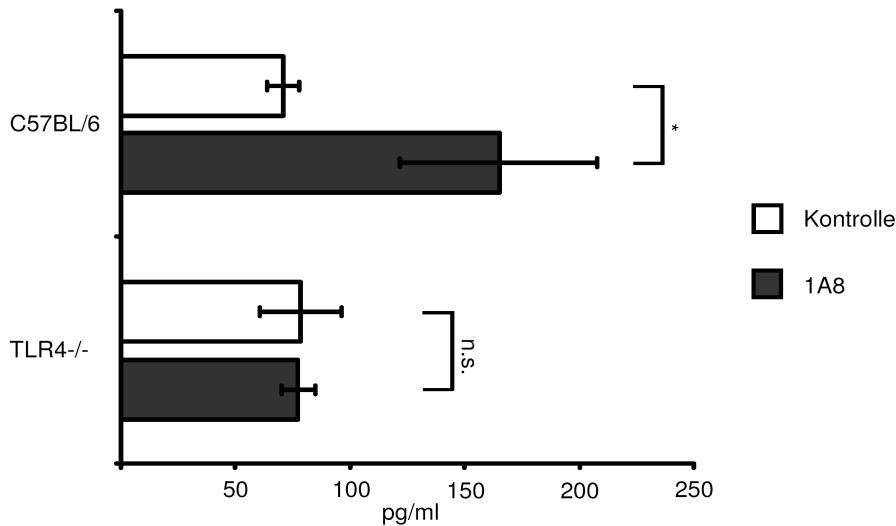


Abbildung 33 G-CSF im Plasma von TLR4^{-/-} Mäusen im Vergleich mit C57BL/6

TLR4^{-/-} Mäuse auf C57BL/6 background wurden mit 1,25 mg 1A8 alle 48 h depletiert und an Tag 8 analysiert. Das Blutplasma wurde per ELISA auf den G-CSF-Gehalt untersucht und mit C57BL/6 Mäusen unter SPF- Bedingungen verglichen. Bei den TLR4^{-/-} Mäusen kam es nicht zu veränderten G-CSF Spiegeln, zudem war im steady-state die Menge an G-CSF vergleichbar mit der Gruppe an C57BL/6 Tieren.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der in dieser Arbeit beschriebene positive Neutrophilen regulierende Feedback-Mechanismus abhängig von TLR4 ist.

3.8 Adaptormolekül-Defiziente Tiere

3.8.1 MyD88-KO Mäuse

Als Adapterproteine für TLR4 dienen MyD88 und TRIF. Es gibt in der Signalkaskade von TLR4 sowohl den MyD88-abhängigen, als auch den MyD88-unabhängigen, dafür TRIF-abhängigen Weg.

3. Ergebnisse

Um zu untersuchen über welchen Signaltransduktionsweg die Weiterleitung *in vivo* erfolgt, wurden MyD88^{-/-} Mäuse neutrophil depletiert und nach 8 Tagen analysiert. Im Blutplasma war ein 6-facher, hochsignifikanter Anstieg von G-CSF von 56 pg/ml auf 347 pg/ml zu beobachten (p = 0,0001) (Abb. 34).

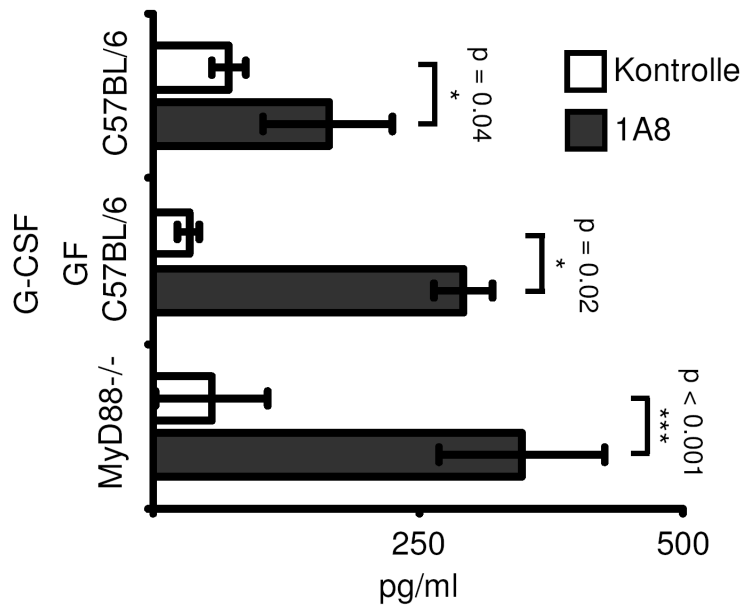


Abbildung 34 G-CSF im Plasma von MyD88^{-/-} Mäusen im Vergleich mit C57BL/6

N = 5 MyD88^{-/-} Mäuse wurden mit 1 mg 1A8 alle 36 h depletiert und an Tag 8 analysiert. Das Blutplasma wurde per ELISA auf G-CSF untersucht und mit C57BL/6 Mäusen unter SPF-Bedingungen und unter keimfreien Bedingungen verglichen. Bei allen Mäusen kam es zu einem signifikanten G-CSF Anstieg, der steady-state Level der MyD88^{-/-} und C57BL/6 Tiere ist vergleichbar.

Im Knochenmark kann man wieder die gleichen Verschiebungsverhältnisse auf Progenitorebene beobachten wie bei den C57BL/6 Wildtyp-Mäusen: einen signifikanten Anstieg der LSK-Zellen und GMP-Zellen und ein Absinken der MEP-Zellen (Abb. 35).

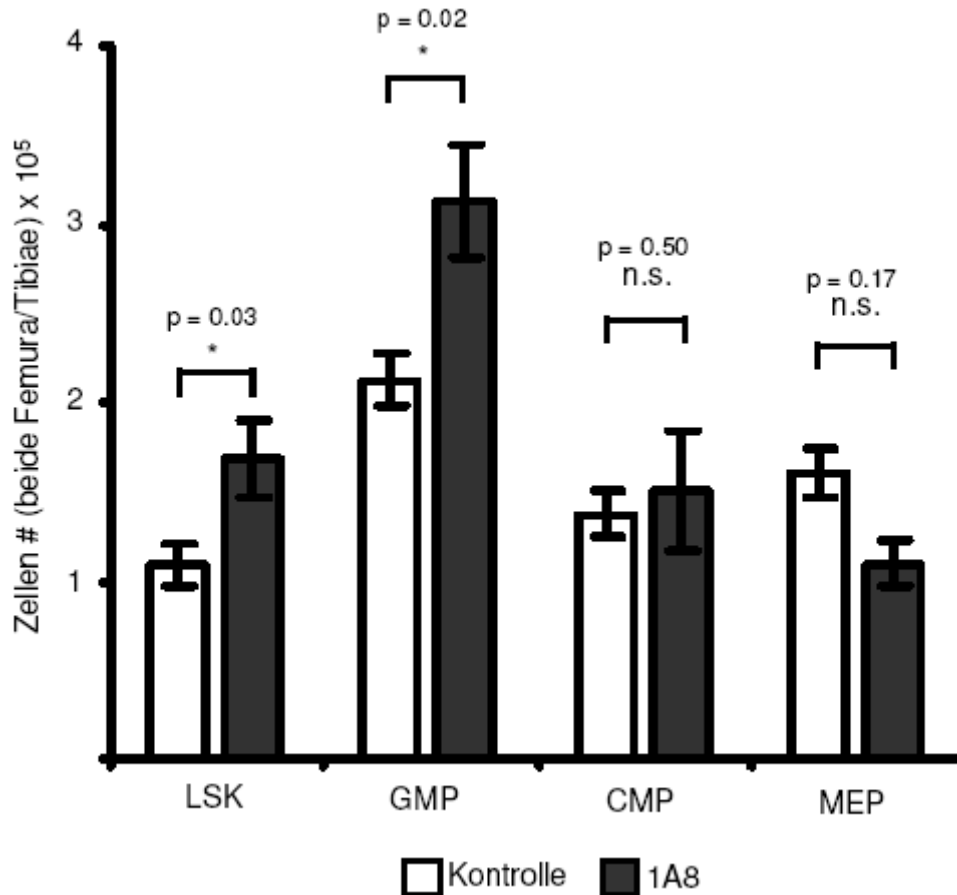


Abbildung 35 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener MyD88^{-/-} Mäuse

MyD88^{-/-} Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund wurden neutrophil depletiert und an Tag 8 analysiert und die Knochenmarkszellen durchflusszytometrisch analysiert. Aufgrund der relativen Verhältnisse der Populationen wurde auf die Gesamtzellzahl in den Hinterläufen geschlossen. Bemerkenswert sind die signifikanten Veränderungen der LSK und GMP- Zellen, vergleichbar mit C57BL/6 Wildtyp-Tieren (n = 5 pro Gruppe).

Diese Ergebnisse in MyD88^{-/-} Mäusen deuten darauf hin, dass der Signalweg zwar über TLR4, aber nicht über das Adaptorprotein MyD88 verläuft.

3.8.2 TRIF^{-/-} Mäuse

Da der gefundene Feedback-Mechanismus unabhängig von MyD88 erscheint, wurden TRIF^{-/-} Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund eingesetzt und mit 1A8 oder PBS behandelt. Nach 8 Tagen antikörper-induzierter Neutropenie wurden die Tiere geopfert und das Knochenmark und Blut analysiert.

3. Ergebnisse

Im Knochenmark stiegen die LSK-Zellen signifikant von $1,06 \times 10^5$ (PBS) auf $2,54 \times 10^5$ (1A8) Zellen in beiden Hinterläufen an ($p = 0,02$). Die myeloischen Progenitoren veränderten sich jedoch kaum. Die GMP stiegen von $4,47 \times 10^5$ auf $6,12 \times 10^5$ Zellen in Femura und Tibiae ($p = 0,46$), die MEP blieben unverändert ($1,89 \times 10^5$ zu $1,93 \times 10^5$; $p = 0,94$) (Abb. 36).

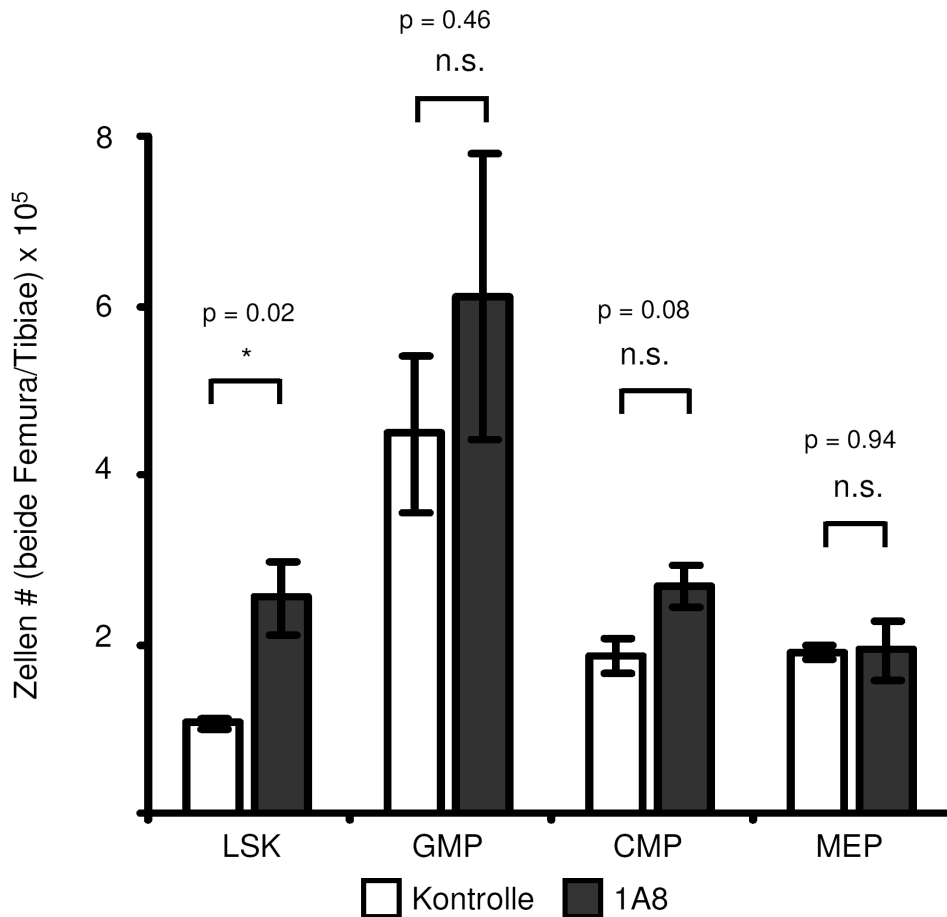


Abbildung 36 Absolute Zahlen im Knochenmark neutropener TRIF^{-/-} Mäuse

TRIF^{-/-} Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund wurden mit 1 mg 1A8 alle 36 h depletiert und an Tag 8 analysiert. Die Kontrollgruppe wurde mit PBS in den gleichen Zeitintervallen behandelt. Die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark wurden per Durchflusszytometrie bestimmt und umgerechnet auf die Gesamtzahl der lebenden Zellen in beiden Hinterläufen. Bemerkenswert sind zwar die signifikanten Veränderungen der LSK- Zellen aber nicht die der myeloischen Progenitoren ($n = 4$ pro Gruppe).

Das Blutplasma der neutropenen TRIF^{-/-} Mäuse wurde auf den Zytokingehalt untersucht, die G-CSF Spiegel stiegen im Vergleich mit den Kontrolltieren nicht signifikant von 184 pg/ml (PBS) auf 422 pg/ml (1A8) an, $p = 0,08$ (Abb. 38).

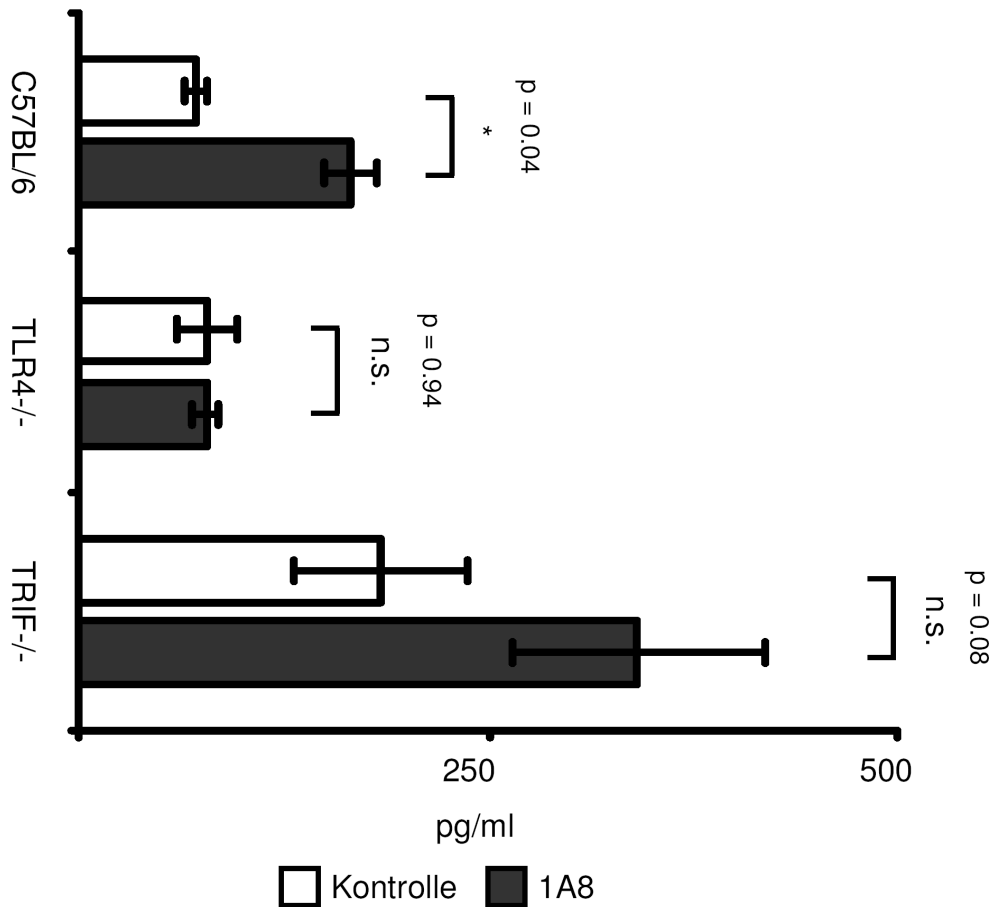


Abbildung 37 G-CSF im Plasma von TLR4^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäusen im Vergleich mit C57BL/6

Das Blutplasma von neutropenen TLR4^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund wurde per ELISA auf den G-CSF Spiegel untersucht und mit C57BL/6 Mäusen unter SPF- Bedingungen verglichen. Bei den TLR4^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäusen kam es nicht zu signifikanten Erhöhung des G-CSF Gehalts nach antikörper-induzierter Neutropenie.

Diese Ergebnisse sind ein starkes Indiz, dass der Neutrophilen regulierende positive Feedback-Mechanismus über TLR4 und TRIF, auf dem MyD88- unabhängigen Signalweg vermittelt werden könnte.

3.9 Die Rolle des Egress

Das Angebot an Neutrophilen hängt zum einen von der Produktion der Neutrophilen, zum anderen von der Freisetzung aus dem Knochenmark ab. Als Regulator für die

3. Ergebnisse

Freisetzung der Neutrophilen aus dem Knochenmark gilt CXCL12. Es wurde bereits gezeigt, dass eine gestiegene Granulopoese mit einer Neutrophilenfreisetzung und einer Herabregulation von CXCL12 im Knochenmark einhergeht (Ueda, Kondo et al. 2005; Eash, Greenbaum et al. 2010; Delano, Kelly-Scumpia et al. 2011).

Aus diesen Gründen wurde die Menge an CXCL12 auf Transkriptionsebene im Knochenmark unter verschiedenen Bedingungen detektiert.

Aus lysierten Knochenmarkszellen wurde wie oben beschrieben cDNA generiert und je 25 ng cDNA für eine qRT-PCR mit SYBR Green eingesetzt. Es wurde bei den mit rh-G-CSF behandelten Tieren eine 10-fache Reduktion an CXCL12 festgestellt, im Vergleich zum steady-state Level in C57BL/6 Mäusen. Bei den keimfreien C57BL/6 und den NSG Mäusen wurden höhere CXCL12-Grundspiegel sichtbar (Abb. 31).

Nach antikörper-induzierter Neutropenie in NSG, C57BL/6 und keimfreien C57BL/6 Mäusen, aber auch in den C3H/HeJ- bzw. TLR4 defizienten Mäusen wurde nach 8 Tagen bei allen Mäusen eine meist signifikante Herabregulierung im Knochenmark beobachtet (Abb. 38).

Daraus kann man schließen, dass bei allen Mäusestämmen die Antikörper induzierte Neutropenie zu einer Herabregulation von CXCL12 auf transkriptionaler Ebene im Knochenmark und in Folge dessen zu einer Freisetzung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark führt.

3. Ergebnisse

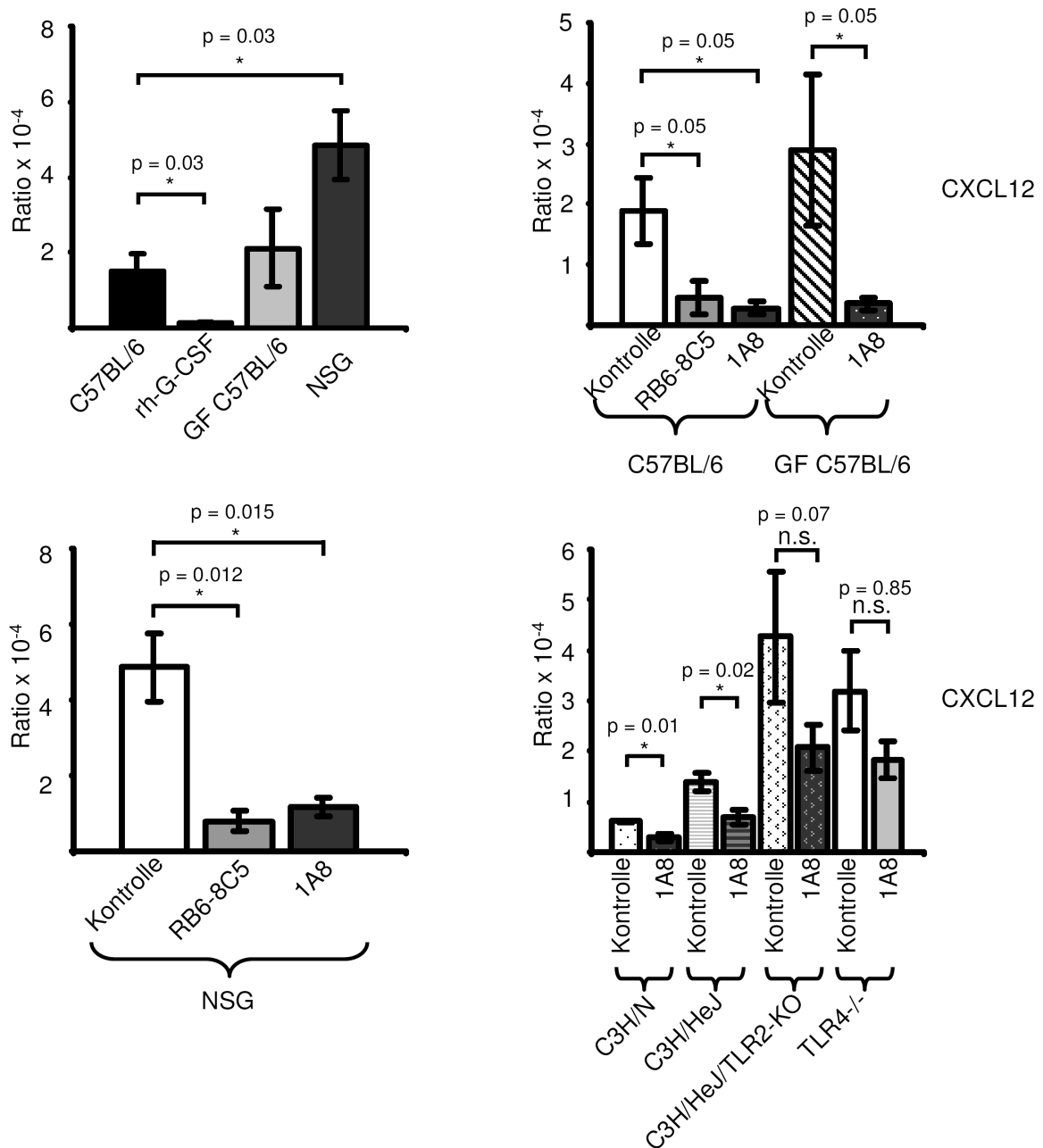


Abbildung 38 CXCL12 Level auf Transkriptionsebene in unterschiedlichen Mäusen

Das Knochenmark von jeweils n = 3 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde geerntet und mittels RNeasy Mini kit RNA isoliert und mit Superscript II in cDNA umgeschrieben. Danach wurde die Ratio im LC 480 mittels SYBR Green und dem Referenzgen β -Actin bestimmt. Bemerkenswert ist die signifikante Herabregulation bei den rh-G-CSF Tieren, wie auch die meist signifikante Herabregulation bei den neutrophil depletierten Tieren im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren.

3.10 MSC in vitro Versuche

Als wichtigste Quelle für G-CSF gelten nicht-hämatopoetische Stromazellen (MSC) aus dem Knochenmark. Es ist jedoch nicht bekannt, welche kultivierbare Zellen den Hauptanteil liefern (Watari, Ozawa et al. 1994; Panopoulos and Watowich 2008). Desweiteren ist bekannt, dass bei Mäusen und Menschen mit einer akuten Infektion der G-CSF Spiegel im Rahmen der emergency Granulopoese erhöht ist (Cheers, Haigh et al. 1988; Watari, Asano et al. 1989; Kawakami, Tsutsumi et al. 1990).

Da TLRs auf hämatopoetischen Stamm-, Progenitorzellen und Stromazellen zu finden sind untersuchten wir, ob die Stimulation von TLR4 auf kultivierten MSC mittels LPS zu einem direkten Anstieg von G-CSF führt.

Aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen und C3H/HeJ/TLR2-KO Mäusen wurden mesenchymale Stromazellen kultiviert und mit LPS behandelt oder unbehandelt gelassen. Die RNA wurde isoliert, DNase I verdaut und in cDNA umgeschrieben.

Die G-CSF Expression auf Transkriptionsebene wurde mit qRT-PCR und eines Taqman Gene expression Assay bestimmt. Dabei wurde die Ratio zum housekeeping Gen β -Actin berechnet.

Bei den LPS- behandelten MSCs aus C57BL/6 Mäusen fand man einen mehr als 1000-fachen Anstieg an G-CSF im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Bei den MSC-Zellen der C3H/HeJ/TLR2-KO Mäusen (defizient für LPS-Antwort) kam es jedoch zu keiner Expansion des G-CSF Gehalts im Vergleich der LPS-behandelten Zellen vs. den unbehandelten Kontrollzellen. Desweiteren war der Grundspiegel im Vergleich mit der G-CSF Expression aus den MSCs der C57BL/6 Mäuse deutlich reduziert (Abb. 40).

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass mesenchymale Stromazellen G-CSF transkribieren und dass es über TLR4 gelingt, eine massive transkriptionelle Hochregulation zu erreichen.

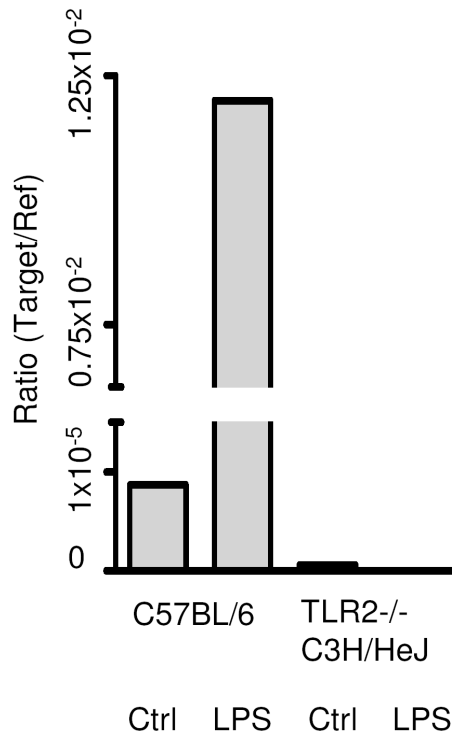


Abbildung 39 G-CSF Transkription der LPS stimulierten MSC

MSC von C57BL/6 und C3H/HeJ/TLR2-KO Mäusen wurden kultiviert und der TLR4-Signalweg durch Zugabe von $c = 10 \mu\text{g/ml}$ LPS für 24 h stimuliert. Danach wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR für G-CSF durchgeführt. Der G-CSF Level stieg in den C57BL/6 MSC um das 1000x an, wohingegen der Level in C3H/HeJ/TLR2-KO MSC nicht beeinflusst wurde.

3.11 Transplantation von Knochenmark

Der Feedback-Mechanismus wurde in Wildtypmäusen, immundefizienten NSG, keimfreien C57BL/6 und auch in C3H/N Mäusen gefunden, aber nicht in TLR4-defizienten Mäusen, oder in Mäusen mit einer Spontanmutation im Tlr4 Gen (C3H/HeJ).

Um zu analysieren, ob das hämatopoetische oder das stromale Kompartiment für diese Effekte verantwortlich sind, wurden Transplantationsexperimente mit dem Knochenmark von C3H/N Mäusen und C3H/HeJ Mäusen durchgeführt, bei denen

3. Ergebnisse

jeweils das Knochenmark von einer Mäuselinie in lethal bestrahlte Empfängermäuse der anderen Linie transplantiert wurde.

Nach der vollständigen Rekonstitution des Knochenmarks wurden die Tiere für 8 Tage mit einem Neutrophilen-depletierenden Antikörper (Klon 1A8) behandelt und danach geopfert und analysiert.

Bei der Analyse sollte überprüft werden, ob der Feedback-Mechanismus von den Spendertieren oder den Empfängertieren übertragen werden kann, um die Aussage treffen zu können, ob Stromazellen oder hämatopoetische Zellen für die Effekte verantwortlich sind.

Allerdings konnten die Ergebnisse aus diesem Experiment nicht verwertet werden, da die Tiere eine Graft-versus-Host-Disease (GvHD) aufgrund eines background-mismatch bekamen, so dass diese Fragestellung noch unbeantwortet ist.

4 Diskussion

4.1 Regulation der Neutrophilen-Homöostase im steady-state

Der Mechanismus der Neutrophilen-Homöostase ist im Gegensatz zur Erythropoese und zur Thrombopoese noch nicht vollständig verstanden. Bei der Erythropoese reguliert der Sauerstoffpartialdruck den EPO-Spiegel (McDonald, Lin et al. 1986; Lacombe and Mayeux 1998; Jelkmann 2004) und somit die Menge an zu produzierenden Erythrozyten.

Bei der Thrombopoese wird TPO konstitutionell in Hepatozyten exprimiert und indirekt über die Masse thrombopoetischer Zellen reguliert (Lok, Kaushansky et al. 1994; McCarty, Sprugel et al. 1995; Stoffel, Wiestner et al. 1996; Kaushansky 2009) und beeinflusst so die Menge an neu zu produzierenden Thrombozyten.

4.1.1 Neutrophiler Drehkreuzmechanismus

Frühere Beobachtung mit einer Heraufregulation von G-CSF in neutropenen Patienten nach einer myelosuppressiven Chemotherapie und Neutropenie führten zu der Idee, dass es einen Neutrostat geben muss, der die Freisetzung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark kontrolliert.

Allgemein zirkulieren nur 1-2 % der Neutrophilen in der Peripherie. Der Hauptanteil der neutrophilen Masse befindet sich „ruhend“ im Knochenmark und wird erst bei Infektionen bzw. im Bedarfsfall freigesetzt. Dies nennt sich „Egress“ (lat. „Auswandern“) (Semerad, Liu et al. 2002).

Dieser Neutrostat kann entweder mit einem Sensor ausgestattet sein, der den Neutrophilen-Spiegel überprüft oder sogar einen Drehkreuzmechanismus an der Schwelle zwischen Blut und Knochenmark darstellen, der die Anzahl der Neutrophilen, die in die Peripherie abgegeben werden, zählt.

Zur Regulation der Neutrophilen-Homöostase wurde schon 1991 (Demetri and Griffin 1991) der obig kurz angerissene neutrophile Drehkreuzmechanismus vorgeschlagen. Allerdings konnte zu diesem Zeitpunkt keine Lokalisation geklärt werden.

Auf der Suche nach dem Sensor schlugen Stark et al. (Stark, Huo et al. 2005) im Jahr 2005 ein Drehkreuz mit der Lokalisation im Gastrointestinaltrakt vor, da das meiste IL-17 in den Mesenteriallymphknoten gebildet wird. Desweiteren werden Bakterien im Gastrointestinaltrakt getriggert um die Produktion von IL-23 in den dendritischen Zellen und Makrophagen anzuregen (Stark, Huo et al. 2005).

Stark et al. und andere Arbeitsgruppen nahmen dabei an, dass IL-17 ausschließlich von T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen gebildet werden. Allerdings sind mittlerweile einige andere IL-17 produzierende Zelltypen gefunden worden, wie unter anderem auch myeloische Zellen (Michel, Keller et al. 2007; Cella, Fuchs et al. 2009; Hayday 2009; Takatori, Kanno et al. 2009; Passos, Silver et al. 2010).

In einem Modell einer akuten Infektion in Mäusen wurde gezeigt, dass IL-23 die downstream-liegenden IL-17-vermittelnde Pathways aktiviert (Li, Huang et al. 2010). Dies führt zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen, wie auch zur Bereitstellung von Neutrophilen. Interessanterweise wurde der Hauptanteil des initialen IL-17 in der Niere dabei nicht von Lymphozyten, sondern von CD11b⁺Gr1⁺ Zellen produziert (Li, Huang et al. 2010).

Durch die in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass der beschriebene positive Feedback-Mechanismus nicht nur unabhängig von T- und B-Zellen verläuft, wie auch die Ergebnisse mit RAG1^{-/-} Mäusen zeigen (Cain, Snowden et al. 2011), sondern auch unabhängig von NK-Zellen ist.

Dies konnte von uns durch die Verwendung von NSG Mäusen gezeigt werden (Bugl, Wiesner et al. 2010). Diese Tiere besitzen weder reife B- und T-Zellen, noch reife NK-Zellen (Shultz, Lyons et al. 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in Wildtyp-Mäusen, aber nicht in NSG Mäusen IL-23 und IL-17 als Antwort auf Antikörper-induzierte Neutropenie hochreguliert werden und somit keine unabdingbare Voraussetzung darstellen.

Zudem sind die Ergebnisse ein Hinweis darauf, dass der Feedback-Mechanismus auch unabhängig von myeloischen Gr1⁺CD11b⁺ Zellen in der Peripherie ist, da diese Zellen aus der Peripherie mittels antikörper-induzierter Neutropenie depletiert wurden.

4.1.2 Zellularität im Knochenmark und Spezifität

In dem von uns verwendeten Tiermodell kann von einer vollständigen antikörper-induzierten Neutropenie in der Peripherie ausgegangen werden. Jedoch wurde im Knochenmark keine Depletion der neutrophilen Granulozyten erreicht. In Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen der Femurschnitte wurden zudem keine Veränderungen der Zellularität festgestellt. Ebenso konnte bei der Knochenmarkszellanalyse im FACS eine Granulozytenpopulation weiterhin detektiert werden.

Das grenzt unsere beschriebenen Ergebnisse von den Ergebnissen von Scumpia et al. ab (Scumpia, Kelly-Scumpia et al. 2010), die zum Teil ähnliche Versuche (Gabe von anti-Gr-1 in unterschiedliche Mausstämmen, Blick auf hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen) durchgeführt haben und dabei eine Reduktion der Zellularität im Knochen nach Antikörperapplikation beschrieben haben. Durch die Hypozellularität und den daher entstehenden Veränderungen in der Knochenmarkszellumgebung wird aus der Sicht von Scumpia et al. die Erhöhung der LSK-Zellpopulation ausgelöst.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Veränderung nur von einer Störung in der Umgebung des Knochenmarks abhängig sind bzw. von beispielsweise inflammatorischen Milieu bedingt durch die FcR-abhängige Phagozytose AK-opsonisierter Zellen, wurden für einen Zeitraum von 7 Tagen C57BL/6 Mäuse täglich mit 300 µg eines NK-Zell-depletierenden Antikörper (Nishikado, Mukai et al. 2011) behandelt. Die Effektivität dieser Depletion konnte im peripheren Blut durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

Im Knochenmark kam es dabei nicht zu Veränderungen der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellpopulationen, sodass man von einem spezifischen, Neutrophilen-abhängigen positiven Feedback- Mechanismus sprechen kann.

4.1.3 Antikörperwahl zur *in vivo* Neutrophilen-Depletion

Zur Erzeugung der peripheren Neutropenie wurde zur Beginn dieser Dissertation der anti-Gr1 Antikörper, Klon RB6-8C5 eingesetzt. Dieser Antikörper depletiert nicht nur neutrophile Granulozyten, sondern zum Teil auch Monozyten und Makrophagen, da er nicht nur an Ly-6G bindet sondern auch an Ly-6C, welcher auf Monozyten, Makrophagen und CD8+ T-Zellen exprimiert ist (Curtsinger, Lins et al. 1998), und einen Einfluss auf das STAT- Signaling hat (Ribechini, Leenen et al. 2009).

Zudem führt die Verwendung dieses Antikörpers zu einer reduzierten Mobilisierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen durch G-CSF (Pelus, Bian et al. 2004). Daher wurde im Verlauf der Dissertation der spezifischere Antikörper 1A8 verwendet, der ausschließlich neutrophile Granulozyten bindet (Ribechini, Leenen et al. 2009). Mit diesem Antikörper wurden die mit dem Klon RB6-8C5 erhaltenen Ergebnisse verifiziert und zudem die späteren Versuche nur noch mit diesem Antikörperklon durchgeführt.

4.1.4 Transkriptionales G-CSF

Die Menge an G-CSF auf transkriptionaler Ebene im Knochenmark ist bei antikörper-induzierten, neutropenen Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren erhöht. Bei Tieren die mit rh-G-CSF behandelt wurden, sank der G-CSF Gehalt auf RNA-Ebene signifikant ab.

Dies zeigt einen negativen Feedback-Mechanismus auf Transkriptionsebene im steady-state.

In NSG Mäusen findet man im steady-state geringere Neutrophilenzahlen als in C57BL/6 Wildtypkontrollen. Dies wird mit einer gesenkten Granulopoese im steady-state in Verbindung gebracht.

Bei diesen immundefizienten Mäusen ist die Transkription von G-CSF um ein 3-faches im Vergleich mit C57BL/6 Tieren verstärkt.

Die verstärkte Transkription deutet darauf hin, dass die Neutropenie im steady-state der immundefizienten Tiere sowohl durch eine verminderte Produktion, als auch durch eine verminderte Freisetzung aus dem Knochenmark zustande kommt.

4.2 Einfluss von TLRs

Es ist nicht einfach die Granulopoese im steady-state von der Granulopoese im Infektionsfall abzugrenzen. Die erhaltenen Ergebnisse mit der Erhöhung der hämatopoetischen Stammzellen und G-CSF spiegeln ähnliche Veränderungen wieder, die auch im Entzündungsfall auftreten könnten (Cain, Snowden et al. 2011). Allerdings handelt es sich bei unseren neutrophilen-depletierenden Modellen um Versuche, für die nur eine minimale Inflammation beschrieben wird (Cain, Snowden et al. 2011).

Des Weiteren wurde zur Vermeidung einer Infektion stets Amoxicillin als Antibiotikaprophylaxe ins Trinkwasser gegeben und der Zustand der Mäuse per Sichtkontrolle überprüft, so dass ein Infektionsfall ausgeschlossen werden kann.

4.2.1 Keimfreie Tiere und Endotoxin

Entzündungen werden hauptsächlich über TLR4 und TLR 2 vermittelt, und führen wie oben beschrieben zu ähnlichen Veränderungen auf Progenitorebene im Knochenmark und bei G-CSF. Wir haben aus diesem Grunde einen Einfluss von TLR2 und TLR 4 vermutet. Diese beiden Toll-Like Rezeptoren können durch Bakterien bzw. durch Bestandteile der Bakterienwand getriggert werden und somit eine Immunantwort auslösen (Morrison and Ryan 1987; Medvedev, Kopydlowski et al. 2000). LPS ist ein Agonist für TLR 4 (Poltorak, He et al. 1998; Hoshino, Takeuchi et al. 1999; Qureshi, Lariviere et al. 1999). TLR 2 gilt als ein verstärkender Mediator (Underhill, Ozinsky et al. 1999; Yang, Mark et al. 1999).

Um den Einfluss von kommensalen Bakterien zu überprüfen, wurden keimfreie Mäuse, welche frei von Bakterien leben, für 8 Tage mit dem Antikörperklon 1A8 behandelt, im Anschluss geopfert und analysiert.

Eigentlich haben wir erwartet, dass der Feedback-Mechanismus abhängig von kommensalen Bakterien sein müsste, da bei diesen Tieren eigentlich kein LPS aus Bakterien vorliegt, welches TLR4 triggern könnte.

Der dennoch auftretende positive Feedback-Mechanismus in diesen Mäusen lässt sich dadurch erklären, dass die Mäuse zwar eigentlich keimfrei gehalten werden und somit keine Bakterien den TLR4 Signaltransduktionsweg direkt triggern können. Allerdings kann eine komplette Freiheit an Endotoxin in unserer Umgebung nicht gewährleistet werden, da Endotoxin außerordentlich stabil ist.

Endotoxin kommt in der Bakterienwand von gram-negativen Bakterien vor und ist thermostabil (Rylander 2002). Reste sind auch in autoklaviertem Futter und Trinkwasser detektierbar (Rylander 2002; Hrnčir, Stepankova et al. 2008; Fagundes, Amaral et al. 2012).

Bei keimfreien Mäusen finden sich im Grundzustand niedrigere Level an G-CSF. Dies kann dadurch erklärt werden, dass diese Tiere in einer großteils bakterienfreien Umgebung leben und dadurch niedrigere Neutrophilenzahlen benötigen, da die Gefahr recht gering ist, dass sich das Immunsystem mit eindringenden Pathogenen auseinandersetzen muss. Dadurch sind auch die G-CSF Grundspiegel im Vergleich mit Mäusen des gleichen Stammes unter SPF- Bedingungen vermindert.

4.2.2 Einfluss von Endotoxin im Antikörper

Der Antikörper zur Induktion der peripheren Neutropenie gilt zwar als „Endotoxin low“, allerdings enthält er noch Restmengen Endotoxin. Jedoch kann Endotoxin laut Datenblatt des Antikörpers nur in sehr kleinen Mengen vorhanden sein.

Um auszuschließen, ob dieser Endotoxingehalt ausreicht, um die Verschiebungen der Progenitoren und die Erhöhung der LSK-Population im Knochenmark zu erzeugen, wurden Wildtypiere für die Dauer von 7 Tagen mit der Höchstmenge LPS die in dem eingesetzten Antikörper vorliegen kann (2 EU/mg Antikörper, LAL Test) i.p injiziert, danach die Tiere geopfert und analysiert.

Es konnten dabei keine Verschiebungen auf Knochenmarkebene im Vergleich zu den PBS- injizierten Kontrollmäusen gefunden werden, so dass davon auszugehen

ist, dass diese Konzentration an Endotoxin nicht ausreicht, um diese Verschiebungen zu erzielen.

4.2.3 Einfluss von TLR4 und TLR2

Um den Einfluss von TLR4 und TLR2 bei der Neutrophilen-Homöostase zu überprüfen wurden C3H/HeJ (Poltorak, He et al. 1998; Qureshi, Lariviere et al. 1999) Mäuse und C3H/HeJ/TLR2-KO Mäuse (Takeuchi, Hoshino et al. 1999; Ronnefarth, Erbacher et al. 2006) neutrophil depletiert. Die C3H/HeJ-Tiere sind durch eine Spontanmutation im Tlr4 Gen resistenter gegen LPS (Poltorak, He et al. 1998; Qureshi, Lariviere et al. 1999). Die C3H/HeJ/TLR2-KO Mäuse haben zusätzlich noch einen klassischen knock-out des Tlr2 Gens.

Bei diesen Tieren konnten nach antikörper-induzierter Neutropenie keine Verschiebungen im Knochenmark auf myeloischer Progenitorenebene beobachtet werden, sowie kein Anstieg des G-CSF-Spiegels im Blutplasma detektiert werden.

Allerdings kam es bei den neutropenen C3H/HeJ Mäusen zu einer leichten Erhöhung der LSK-Population im Vergleich zu den Kontrolltieren der gleichen Linie.

Bei den C3H/HeJ/TLR2-KO Mäusen schien die Abhängigkeit des positiven Feedback-Mechanismus noch etwas deutlicher auszufallen, da noch geringere Veränderungen im Vergleich der Kontrollgruppe mit der neutrophilen-depletierten Gruppe auftraten, als bei den C3H/HeJ Tieren beobachtet werden konnte.

Somit kann davon ausgegangen werden dass der positive feedback loop abhängig von TLR 4 ist. Möglicherweise wird dieser Effekt durch den zusätzlichen knock-out von TLR2 noch in seiner Deutlichkeit verstärkt.

Dies würde darauf hindeuten, dass zusätzlich zu Endotoxin auch grampositive Bakterien einen verstärkenden Einfluss haben können, da TLR 2 ein Mediator der Immunantwort auf gram-positive Bakterien ist (Underhill, Ozinsky et al. 1999; Yoshimura, Lien et al. 1999).

Interessanterweise verstärkt bakterielles Peptidoglykan die Neutrophilenfunktion durch NOD 1, aber nicht über NOD 2 oder den TLR 4 Signaltransduktionsweg ((Clarke, Davis et al. 2010)). Agonisten gegen TLR 2 und 4 regulieren die Funktion

der Neutrophilen und wirken bei der Inhibierung der Neutrophilen-Apoptose bei der antimikrobiellen Immunantwort mit (Radsak, Hilf et al. 2003; Radsak, Salih et al. 2004).

Da diese Tiere auf einem anderen Hintergrund (C3H), als die anderen bisher eingesetzten Wildtypiere sind (C57BL/6) wurden auch C3H/N Tiere untersucht. Diese Tiere stellen die Wildtypkontrolle dieses Stammes dar. Diese Tiere verhalten sich nach Depletion gleich wie C57BL/6 Wildtyp-Tiere, haben aber andere baseline Zytokin-Grundspiegel. Als Beispiel kann erwähnt werden, dass der Grundspiegel an G-CSF gegenüber C57BL/6 Tieren erhöht ist. Diesen erhöhten Spiegel findet man aber konsistent bei allen Tieren des Hintergrundstammes, d.h. es handelt sich um einen mäusestammspezifischen Marker und verhält sich somit ähnlich wie Leukozyten – oder Thrombozytenzahlen, welche stammspezifisch variieren (Datenblätter Jackson),

4.2.4 TLR4 knock-out Tiere

Da es sich bei den C3H/HeJ Mäusen nicht um einen TLR4 knock-out im klassischen Sinne handelt, sondern nur um eine Mutation im Tlr4 Gen, haben wir TLR4^{-/-} Mäuse untersucht, die zudem auf C57BL/6 Background waren (Hoshino, Takeuchi et al. 1999).

Bei diesen Mäusen konnte wiederum kein positiver Feedback-Mechanismus beobachtet werden: die myeloischen Progenitoren waren im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert, die G-CSF Spiegel wurden nicht erhöht. Dadurch kann der Schluss gezogen werden, dass der Feedback-Mechanismus tatsächlich unabhängig von TLR 4 ist.

4.2.5 Adaptorproteine MyD88 und TRIF

Toll-like-Rezeptoren benötigen ein Adapterprotein um nach Bindung ihres Liganden ein Signal weiter zu leiten. Bei TLR4 gibt es zwei unterschiedliche Wege: den MyD88

abhängigen und den MyD88-unabhängigen Weg (Yamamoto, Sato et al. 2002). Der MyD88-unabhängige Weg ist TRIF-abhängig (Yamamoto, Sato et al. 2003) (Okazaki, Furuno et al. 2002) und stimuliert Typ 1 Interferone.

4.2.5.1 MyD88^{-/-} Tiere

MyD88 knock-out Mäuse (Lord, Hoffman-Liebermann et al. 1990) besitzen eine Deletion im Exon 3 des myeloid differentiation primary response gene 88 locus (Adachi, Kawai et al. 1998). Diese Tiere wurden auf C57BL/6 Background generiert und haben einen ähnlichen G-CSF Spiegel im Plasma im Vergleich zu C57BL/6 Wildtypkontrollen.

Bei den MyD88^{-/-} Tieren fand sich nach antikörper-induzierter Neutropenie im Vergleich mit Kontrolltieren ein Anstieg an G-CSF und eine Verschiebung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Richtung GMP, auf Kosten der CMP. Zudem war ein Anstieg von LSK- Zellen zu erkennen.

Dies spricht für die Unabhängigkeit des TLR4 vermittelten Feedback-Mechanismus von MyD88, und dient als Indiz für eine somit endosomale Beteiligung über TRIF.

4.2.5.2 TRIF^{-/-} Tiere

Aus diesem Grunde wurden TRIF^{-/-} Mäuse (Yamamoto, Sato et al. 2003) eingesetzt, die wiederum auf C57BL/6 Background sind. Diese Tiere zeigten keinen signifikanten Veränderungen auf Knochenmarkprogenitorebene und auf Proteinebene. Da bei den TRIF^{-/-} Mäusen der G-CSF Anstieg im Plasma allerdings nur knapp nicht signifikant war, könnte dies darauf hindeuten, dass der Transkriptionsweg sowohl vom MyD88-abhängigen als auch vom MyD88-unabhängigen Signalweg vermittelt werden könnte. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Mechanismus TLR4 abhängig ist und möglicherweise über das Adaptorprotein TRIF vermittelt wird.

4.2.5.3 Möglicher weiterer Mechanismus über Autophagie

Autophagie ist ein Teil der angeborenen Immunantwort (Walker, Popov et al. 1997; Kobayashi, Sunako et al. 2001). Die Gruppe um Xu et al. definiert einen neuen Pathway bei dem eine durch LPS ausgelöste Autophagie in Makrophagen durch einen MyD88-unabhängigen aber TRIF-abhängigen TLR4 Signalweg reguliert wird (Xu, Jagannath et al. 2007). Somit spielt dort LPS die Rolle als Sensor.

Der beschriebene Signalweg unterscheidet sich vom autophagischen Todessignal Signaltransduktionsweg (Gozuacik and Kimchi 2004; Yu, Lenardo et al. 2004) dadurch, dass die Zellviabilität nicht beeinträchtigt wird.

Ob dies auch bei der antikörper-induzierten Neutropenie auftreten kann, wurde während dieser Dissertation nicht überprüft.

Daher könnten die nächsten Versuche in diese Richtung zielen, Mäuse unterschiedlichen Stammes während der Neutropenie oder zum Analysezeitpunkt auf Autophagiemerkmale zu untersuchen.

Allerdings wurde *in vitro* die LPS- induzierte Autophagie durch die Zugabe von Polymyxin B, einem Antibiotikum welches die biologischen Effekte von LPS durch Bindung an Lipid A blockiert, gehemmt (Duff and Atkins 1982; Palsson-McDermott and O'Neill 2004; Xu, Jagannath et al. 2007). In den durchgeführten Versuchen der vorliegenden Dissertation wurde als Antibiotikaphylaxe Amoxicillin eingesetzt, welches gegen gram-positive und einige gram-negative Bakterien wirkt.

Ob Amoxicillin eine Autophagie hemmende Wirkung besitzt, wurde noch nicht untersucht.

4.2.6 Rolle des Egress

CXCL12 spielt bei der Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark eine entscheidende Rolle. Das größte Anteil der Neutrophilen befindet sich im Knochenmark und wird erst bei Bedarf z.B. während der emergency Granulopoese in die Peripherie abgegeben (Semerad, Liu et al. 2002).

Eine gesteigerte Granulopoese wird mit der Herabregulation von CXCL12 in Verbindung gebracht (Semerad, Liu et al. 2002; Link 2005; Eash, Greenbaum et al. 2010). Zudem setzt G-CSF Neutrophile aus dem Knochenmark frei, indem die Verbindung zu CXCL12-positiven Knochenmarknischen durch CXCR4, welches auf der Oberfläche von Neutrophilen exprimiert wird, gestört wird (Ma, Jones et al. 1999). Dies ist konform mit den hier detektierten CXCL12-Leveln nach antikörper-induzierter Neutropenie. In allen Mäusen wurde CXCL12 herabreguliert wenn man neutropene Tiere mit Kontrolltieren vergleicht.

4.3 Transplantation Knochenmark von C3H/N in C3H/HeJ

Bei einer allogenen Knochenmarktransplantation wurden Knochenmarkzellen aus C3H/N Wildtypmäuse in bestrahlte C3H/HeJ Mäuse transplantiert und umgekehrt. Nach 4-wöchigem Engraftment wurden in den Empfänger-mäusen beider Stämme neutrophile Granulozyten depletiert und nach 8 Tagen die Tiere geopfert. In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob Knochenmarkzellen oder Stromazellen für den homöostatischen Feedback-Mechanismus verantwortlich sind.

Allerdings konnte nicht ausgewertet werden, welche Knochenmarkzellen für den homöostatischen Feedback-Mechanismus verantwortlich sind, da die Tiere eine Graft-versus-Host-Disease (GvHD) bekamen.

Bei einer GvHD greifen immunkompetente Zellen des Spenders die Empfängermaus an. Die immunkomprimierte Maus stößt die Zellen nicht ab und exprimiert Gewebeantigene die nicht im Donor vorkommen (Billingham 1966; Pidala 2011). Hauptsächlich tritt dieses Problem bei nicht zusammenpassenden MHC auf (Korngold 1993).

Die C3H/HeJ Maus hat einen H2 Haplotyp k. Bei der C3H/N Maus sollte eigentlich der gleiche Haplotyp vorliegen. Es wurden allerdings nur die Haplotypen von C3H Mäusen der Firma Jackson beschrieben. Da die C3H/N Tiere von der Firma Charles River stammten muss davon ausgegangen werden, dass eine vollständige Histokompatibilität nicht gegeben ist (Daten Jackson und Charles River).

Um die Gefahr einer GvHD in Zukunft zu verringern, sollen in kommenden Versuchen das Knochenmark von TLR4^{-/-} Mäusen in C57BL/6 Mäuse transplantiert werden, und umgekehrt. Bei der Transplantation zwischen diesen Tieren handelt es sich um eine syngene Transplantation, da die Tiere bis auf dem klassischen knock-out von TLR4 genetisch identisch sind. Diese Tiere haben den Haplotyp2b (Daten Jackson). Damit kann die Gefahr einer GvHD nahezu ausgeschlossen werden.

4.4 *In vitro* Experimente mit MSC

Die *in vitro* Experimente mit kultivierten MSCs aus dem Knochenmark von C3H/HeJ/TLR2-KO Mäusen und C57BL/6 Mäusen deuten auf einen Produktionsort von G-CSF in mesenchymalen Stromazellen hin. Der G-CSF Spiegel steigt stark nach Exposition mit LPS an. Nach Stimulation des TLR4 Signalweges mit LPS kommt es bei den MSCs aus C57BL/6 Tieren zu einem 1000-fachen Anstieg der G-CSF Transkription, bei den stimulierten Zellen der C3H/HeJ/TLR2-KO Mäuse kam es jedoch zu keinem Anstieg der Regulation der G-CSF Transkription.

Dies deutet auf die Funktion von TLR4-positivem Knochenmarkstroma als Sensor hin, welches G-CSF in einer TRIF-abhängigen Weise hochreguliert.

Dies führt somit zu einen **positiven feedback loop** der über die Expansion von LSK und GMP Zellen und einer Verminderung von CXCL12 reguliert wird.

5 Literatur

- Abbitt, K. B., M. J. Cotter, et al. (2009). "Antibody ligation of murine Ly-6G induces neutropenia, blood flow cessation, and death via complement-dependent and independent mechanisms." J Leukoc Biol **85**(1): 55-63.
- Adachi, O., T. Kawai, et al. (1998). "Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function." Immunity **9**(1): 143-150.
- Adachi, S., M. Kubota, et al. (1994). "In vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor promotes neutrophil survival in vitro." Eur J Haematol **53**(3): 129-134.
- Akashi, K., D. Traver, et al. (1999). "Lymphoid development from hematopoietic stem cells." Int J Hematol **69**(4): 217-226.
- Akashi, K., D. Traver, et al. (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." Nature **404**(6774): 193-197.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Basu, S., G. Hodgson, et al. (2000). "'Emergency' granulopoiesis in G-CSF-deficient mice in response to *Candida albicans* infection." Blood **95**(12): 3725-3733.
- Beru, N., J. McDonald, et al. (1987). "Expression of the erythropoietin gene." Blood Cells **13**(1-2): 263-268.
- Billingham, R. E. (1966). "The biology of graft-versus-host reactions." Harvey Lect **62**: 21-78.
- Blasius, A. L. and B. Beutler (2010). "Intracellular toll-like receptors." Immunity **32**(3): 305-315.
- Bliss, S. K., B. A. Butcher, et al. (2000). "Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection." J Immunol **165**(8): 4515-4521.

- Bliss, S. K., L. C. Gavrilescu, et al. (2001). "Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology." Infect Immun **69**(8): 4898-4905.
- Bugl, S., T. Wiesner, et al. (2010). "Lymphocytes Are Dispensable In Neutrophil Homeostasis." ASH Annual Meeting Abstracts **116**(21): 2613-.
- Cain, D. W., P. B. Snowden, et al. (2011). "Inflammation triggers emergency granulopoiesis through a density-dependent feedback mechanism." PLoS One **6**(5): e19957.
- Cella, M., A. Fuchs, et al. (2009). "A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity." Nature **457**(7230): 722-725.
- Ceredig, R., A. G. Rolink, et al. (2009). "Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees." Nat Rev Immunol **9**(4): 293-300.
- Cheers, C., A. M. Haigh, et al. (1988). "Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs." Infect Immun **56**(1): 247-251.
- Clarke, T. B., K. M. Davis, et al. (2010). "Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity." Nat Med **16**(2): 228-231.
- Cua, D. J. and C. M. Tato (2010). "Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system." Nat Rev Immunol **10**(7): 479-489.
- Curtsinger, J. M., D. C. Lins, et al. (1998). "CD8+ memory T cells (CD44^{high}, Ly-6C⁺) are more sensitive than naive cells to (CD44^{low}, Ly-6C⁻) to TCR/CD8 signaling in response to antigen." J Immunol **160**(7): 3236-3243.
- Czuprynski, C. J., J. F. Brown, et al. (1994). "Administration of antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 prevents expression of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* infection in previously immunized mice." Infect Immun **62**(11): 5161-5163.

- Daley, J. M., A. A. Thomay, et al. (2008). "Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice." J Leukoc Biol **83**(1): 64-70.
- Dancey, J. T., K. A. Deubelbeiss, et al. (1976). "Neutrophil kinetics in man." J Clin Invest **58**(3): 705-715.
- Delano, M. J., K. M. Kelly-Scumpia, et al. (2011). "Neutrophil mobilization from the bone marrow during polymicrobial sepsis is dependent on CXCL12 signaling." J Immunol **187**(2): 911-918.
- Demetri, G. D. and J. D. Griffin (1991). "Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor." Blood **78**(11): 2791-2808.
- Deschamps, P., S. Pedailles, et al. (1984). "Photo-induction of lesions in a patient with pemphigus erythematosus." Photodermatol **1**(1): 38-41.
- Duff, G. W. and E. Atkins (1982). "The inhibitory effect of polymyxin B on endotoxin-induced endogenous pyrogen production." J Immunol Methods **52**(3): 333-340.
- Dunn, S. M., L. S. Coles, et al. (1994). "Requirement for nuclear factor (NF)-kappa B p65 and NF-interleukin-6 binding elements in the tumor necrosis factor response region of the granulocyte colony-stimulating factor promoter." Blood **83**(9): 2469-2479.
- Eash, K. J., A. M. Greenbaum, et al. (2010). "CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow." J Clin Invest **120**(7): 2423-2431.
- Ernst, T. J., A. R. Ritchie, et al. (1989). "Regulation of granulocyte- and monocyte-colony stimulating factor mRNA levels in human blood monocytes is mediated primarily at a post-transcriptional level." J Biol Chem **264**(10): 5700-5703.
- Fagundes, C. T., F. A. Amaral, et al. (2012). "Transient TLR Activation Restores Inflammatory Response and Ability To Control Pulmonary Bacterial Infection in Germfree Mice." J Immunol **188**(3): 1411-1420.

- Falkenburg, J. H., M. A. Harrington, et al. (1991). "Differential transcriptional and posttranscriptional regulation of gene expression of the colony-stimulating factors by interleukin-1 and fetal bovine serum in murine fibroblasts." Blood **78**(3): 658-665.
- Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, et al. (2003). "LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF." J Exp Med **198**(7): 1043-1055.
- Fleming, T. J., M. L. Fleming, et al. (1993). "Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family." J Immunol **151**(5): 2399-2408.
- Forlow, S. B., J. R. Schurr, et al. (2001). "Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice." Blood **98**(12): 3309-3314.
- Fossiez, F., O. Djossou, et al. (1996). "T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines." J Exp Med **183**(6): 2593-2603.
- Furze, R. C. and S. M. Rankin (2008). "The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse." FASEB J **22**(9): 3111-3119.
- Gioannini, T. L. and J. P. Weiss (2007). "Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells." Immunol Res **39**(1-3): 249-260.
- Goossens, P. L., H. Jouin, et al. (1991). "Dynamics of lymphocytes and inflammatory cells recruited in liver during murine listeriosis. A cytofluorimetric study." J Immunol **147**(10): 3514-3520.
- Gordon, S. (2002). "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response." Cell **111**(7): 927-930.
- Gordy, C., H. Pua, et al. (2011). "Regulation of steady-state neutrophil homeostasis by macrophages." Blood **117**(2): 618-629.

- Gozuacik, D. and A. Kimchi (2004). "Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism." Oncogene **23**(16): 2891-2906.
- Hatakeyama, S., K. Iwabuchi, et al. (1994). "The murine c-fgr gene product associated with Ly6C and p70 integral membrane protein is expressed in cells of a monocyte/macrophage lineage." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 3458-3462.
- Hayday, A. C. (2009). "Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response." Immunity **31**(2): 184-196.
- Horwitz, B. H., J. P. Mizgerd, et al. (2001). "Mechanisms of granulocytosis in the absence of CD18." Blood **97**(6): 1578-1583.
- Hoshino, K., O. Takeuchi, et al. (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." J Immunol **162**(7): 3749-3752.
- Hrncir, T., R. Stepankova, et al. (2008). "Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ-free mice." BMC Immunol **9**: 65.
- Inohara, N., Y. Ogura, et al. (2001). "Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides." J Biol Chem **276**(4): 2551-2554.
- Inzunza, J., T. Midtvedt, et al. (2005). "Germfree status of mice obtained by embryo transfer in an isolator environment." Lab Anim **39**(4): 421-427.
- Jelkmann, W. (2004). "Molecular biology of erythropoietin." Intern Med **43**(8): 649-659.
- Jelkmann, W. (2011). "Regulation of erythropoietin production." J Physiol **589**(Pt 6): 1251-1258.
- Kaushansky, K. (2009). "Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 147-152.
- Kawai, T. and S. Akira (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." Immunity **34**(5): 637-650.

- Kawakami, M., H. Tsutsumi, et al. (1990). "Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections." Blood **76**(10): 1962-1964.
- Kobayashi, H., M. Sunako, et al. (2001). "DNA synthesis and fragmentation in bacteroids during *Astragalus sinicus* root nodule development." Biosci Biotechnol Biochem **65**(3): 510-515.
- Korngold, R. (1993). "Biology of graft-vs.-host disease." Am J Pediatr Hematol Oncol **15**(1): 18-27.
- Lacombe, C. and P. Mayeux (1998). "Biology of erythropoietin." Haematologica **83**(8): 724-732.
- Li, L., L. Huang, et al. (2010). "IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury." J Clin Invest **120**(1): 331-342.
- Lieschke, G. J., D. Grail, et al. (1994). "Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization." Blood **84**(6): 1737-1746.
- Link, D. C. (2005). "Neutrophil homeostasis: a new role for stromal cell-derived factor-1." Immunol Res **32**(1-3): 169-178.
- Lok, S., K. Kaushansky, et al. (1994). "Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo." Nature **369**(6481): 565-568.
- Lord, K. A., B. Hoffman-Liebermann, et al. (1990). "Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6." Oncogene **5**(7): 1095-1097.
- Lu, Y. C., W. C. Yeh, et al. (2008). "LPS/TLR4 signal transduction pathway." Cytokine **42**(2): 145-151.
- Ma, Q., D. Jones, et al. (1999). "The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment." Immunity **10**(4): 463-471.

- Matsuzaki, J., T. Tsuji, et al. (2003). "Successful elimination of memory-type CD8+ T cell subsets by the administration of anti-Gr-1 monoclonal antibody in vivo." Cell Immunol **224**(2): 98-105.
- McCarty, J. M., K. H. Sprugel, et al. (1995). "Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count." Blood **86**(10): 3668-3675.
- McCoy, C. E. and L. A. O'Neill (2008). "The role of toll-like receptors in macrophages." Front Biosci **13**: 62-70.
- McDonald, J. D., F. K. Lin, et al. (1986). "Cloning, sequencing, and evolutionary analysis of the mouse erythropoietin gene." Mol Cell Biol **6**(3): 842-848.
- Medvedev, A. E., K. M. Kopydlowski, et al. (2000). "Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression." J Immunol **164**(11): 5564-5574.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (2002). "Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system." Science **296**(5566): 298-300.
- Michel, M. L., A. C. Keller, et al. (2007). "Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia." J Exp Med **204**(5): 995-1001.
- Morrison, D. C. and J. L. Ryan (1987). "Endotoxins and disease mechanisms." Annu Rev Med **38**: 417-432.
- Nishikado, H., K. Mukai, et al. (2011). "NK cell-depleting anti-asialo GM1 antibody exhibits a lethal off-target effect on basophils in vivo." J Immunol **186**(10): 5766-5771.
- Nishizawa, M., M. Tsuchiya, et al. (1990). "Multiple elements in the promoter of granulocyte colony-stimulating factor gene regulate its constitutive expression in human carcinoma cells." J Biol Chem **265**(10): 5897-5902.
- O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **7**(5): 353-364.

- Ohkubo, T., M. Tsuda, et al. (1999). "Peripheral blood neutrophils of germ-free rats modified by in vivo granulocyte-colony-stimulating factor and exposure to natural environment." Scand J Immunol **49**(1): 73-77.
- Okada, S., H. Nakauchi, et al. (1992). "In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells." Blood **80**(12): 3044-3050.
- Okazaki, Y., M. Furuno, et al. (2002). "Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs." Nature **420**(6915): 563-573.
- Oppmann, B., R. Lesley, et al. (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." Immunity **13**(5): 715-725.
- Osawa, M., K. Hanada, et al. (1996). "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell." Science **273**(5272): 242-245.
- Osawa, M., K. Nakamura, et al. (1996). "In vivo self-renewal of c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin^(low/-) hemopoietic stem cells." J Immunol **156**(9): 3207-3214.
- Palsson-McDermott, E. M. and L. A. O'Neill (2004). "Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4." Immunology **113**(2): 153-162.
- Panopoulos, A. D. and S. S. Watowich (2008). "Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis." Cytokine **42**(3): 277-288.
- Pappu, R., V. Ramirez-Carrozzi, et al. (2011). "The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases." Immunology **134**(1): 8-16.
- Passos, S. T., J. S. Silver, et al. (2010). "IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis." J Immunol **184**(4): 1776-1783.

- Pelus, L. M., H. Bian, et al. (2004). "Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRObeta/CXCL2 and GRObetaT/CXCL2delta4." Blood **103**(1): 110-119.
- Petit, I., M. Szyper-Kravitz, et al. (2002). "G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4." Nat Immunol **3**(7): 687-694.
- Pidala, J. (2011). "Graft-vs-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation." Cancer Control **18**(4): 268-276.
- Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-2088.
- Pradervand, S., M. R. Maurya, et al. (2006). "Identification of signaling components required for the prediction of cytokine release in RAW 264.7 macrophages." Genome Biol **7**(2): R11.
- Qureshi, S. T., L. Lariviere, et al. (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." J Exp Med **189**(4): 615-625.
- Radsak, M. P., N. Hilf, et al. (2003). "The heat shock protein Gp96 binds to human neutrophils and monocytes and stimulates effector functions." Blood **101**(7): 2810-2815.
- Radsak, M. P., H. R. Salih, et al. (2004). "Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival." J Immunol **172**(8): 4956-4963.
- Ribechini, E., P. J. Leenen, et al. (2009). "Gr-1 antibody induces STAT signaling, macrophage marker expression and abrogation of myeloid-derived suppressor cell activity in BM cells." Eur J Immunol **39**(12): 3538-3551.
- Rodriguez, N., F. Fend, et al. (2005). "Polymorphonuclear neutrophils improve replication of Chlamydia pneumoniae in vivo upon MyD88-dependent attraction." J Immunol **174**(8): 4836-4844.

- Ronnefarth, V. M., A. I. Erbacher, et al. (2006). "TLR2/TLR4-independent neutrophil activation and recruitment upon endocytosis of nucleosomes reveals a new pathway of innate immunity in systemic lupus erythematosus." J Immunol **177**(11): 7740-7749.
- Rylander, R. (2002). "Endotoxin in the environment--exposure and effects." J Endotoxin Res **8**(4): 241-252.
- Scheding, S., M. Bergmann, et al. (2002). "Human plasma thrombopoietin levels are regulated by binding to platelet thrombopoietin receptors in vivo." Transfusion **42**(3): 321-327.
- Schlueter, A. J., T. R. Malek, et al. (1997). "Distribution of Ly-6C on lymphocyte subsets: I. Influence of allotype on T lymphocyte expression." J Immunol **158**(9): 4211-4222.
- Screpanti, I., L. Romani, et al. (1995). "Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice." EMBO J **14**(9): 1932-1941.
- Scumpia, P. O., K. M. Kelly-Scumpia, et al. (2010). "Cutting edge: bacterial infection induces hematopoietic stem and progenitor cell expansion in the absence of TLR signaling." J Immunol **184**(5): 2247-2251.
- Semerad, C. L., F. Liu, et al. (2002). "G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood." Immunity **17**(4): 413-423.
- Shojaei, F., X. Wu, et al. (2009). "G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(16): 6742-6747.
- Shultz, L. D., B. L. Lyons, et al. (2005). "Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells." J Immunol **174**(10): 6477-6489.
- Smith, E., A. Zarbock, et al. (2007). "IL-23 is required for neutrophil homeostasis in normal and neutrophilic mice." J Immunol **179**(12): 8274-8279.

- Smith, K., K. D. McCoy, et al. (2007). "Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota." Semin Immunol **19**(2): 59-69.
- Stark, M. A., Y. Huo, et al. (2005). "Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17." Immunity **22**(3): 285-294.
- Stoffel, R., A. Wiestner, et al. (1996). "Thrombopoietin in thrombocytopenic mice: evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets." Blood **87**(2): 567-573.
- Takatori, H., Y. Kanno, et al. (2009). "Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22." J Exp Med **206**(1): 35-41.
- Takeda, K. and S. Akira (2004). "TLR signaling pathways." Semin Immunol **16**(1): 3-9.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, et al. (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." Immunity **11**(4): 443-451.
- Tete, S., D. Tripodi, et al. (2012). "IL-37 (IL-1F7) the newest anti-inflammatory cytokine which suppresses immune responses and inflammation." Int J Immunopathol Pharmacol **25**(1): 31-38.
- Ueda, Y., M. Kondo, et al. (2005). "Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow." J Exp Med **201**(11): 1771-1780.
- Uhlig, H. H., B. S. McKenzie, et al. (2006). "Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology." Immunity **25**(2): 309-318.
- Underhill, D. M., A. Ozinsky, et al. (1999). "The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens." Nature **401**(6755): 811-815.

- Walker, D. H., V. L. Popov, et al. (1997). "Cytokine-induced, nitric oxide-dependent, intracellular antirickettsial activity of mouse endothelial cells." Lab Invest **76**(1): 129-138.
- Watari, K., S. Asano, et al. (1989). "Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay." Blood **73**(1): 117-122.
- Watari, K., K. Ozawa, et al. (1994). "Production of human granulocyte colony stimulating factor by various kinds of stromal cells in vitro detected by enzyme immunoassay and in situ hybridization." Stem Cells **12**(4): 416-423.
- Welte, K., M. A. Bonilla, et al. (1987). "Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor: in vitro and in vivo effects on myelopoiesis." Blood Cells **13**(1-2): 17-30.
- Xu, Y., C. Jagannath, et al. (2007). "Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity." Immunity **27**(1): 135-144.
- Yamamoto, M., S. Sato, et al. (2003). "Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway." Science **301**(5633): 640-643.
- Yamamoto, M., S. Sato, et al. (2002). "Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling." J Immunol **169**(12): 6668-6672.
- Yang, R. B., M. R. Mark, et al. (1999). "Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2." J Immunol **163**(2): 639-643.
- Ye, P., F. H. Rodriguez, et al. (2001). "Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense." J Exp Med **194**(4): 519-527.
- Yoshimura, A., E. Lien, et al. (1999). "Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2." J Immunol **163**(1): 1-5.

- Yu, L., M. J. Lenardo, et al. (2004). "Autophagy and caspases: a new cell death program." Cell Cycle **3**(9): 1124-1126.
- Zhang, D. E., P. Zhang, et al. (1997). "Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 569-574.
- Zhang, F. X., C. J. Kirschning, et al. (1999). "Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes." J Biol Chem **274**(12): 7611-7614.
- Zhang, P., J. Iwasaki-Arai, et al. (2004). "Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha." Immunity **21**(6): 853-863.

5.1 Weitere Literatur

Kenneth M. Murphy, Paul Travers, Mark Walport und Kerstin Mahlke
Janeway, Lehrbuch der Immunologie (2009), Spektrum Verlag, 7. Auflage

Produktmonographie Filgrastim HEXAL, HEXAL, 2010

Proteindatenbank: <http://modbase.compbio.ucsf.edu/>, Swissprot

Jackson, Physiologisches Datenblatt: (phenome.jax.org)

6 Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten werden durch einen weitgehend unverstandenen homöostatischen Feedback-Mechanismus reguliert. Diese Regulation richtet sich nach dem Bedarf in der Peripherie. Es wird sozusagen nur die Anzahl an Neutrophilen produziert bzw. freigesetzt, die wirklich benötigt wird.

Es ist schon lange bekannt, dass die Knochenmarkzellularität invers mit dem G-CSF-Spiegel korreliert. Allerdings ist der Mechanismus, der die Produktion mit der Freisetzung verbindet, noch unbekannt.

In dieser Arbeit wird ein positiver Feedback-Mechanismus beschrieben, der mit einem Anstieg von G-CSF im Plasma und starken Verschiebungen auf der Ebene von myeloischen Knochenmarkprogenitorzellen und hämatopoetischen Stammzellen einhergeht.

Nach Antikörper-vermittelter Depletion der Neutrophilen entsteht ein Anstieg der GMP-Population (Granulozyten/Makrophagen-Progenitoren) auf Kosten der MEP-Population (Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitoren). Desweiteren findet man eine starke Expansion an hämatopoetischen Stammzellen, den sogenannten LSK-Zellen.

Der Mechanismus ähnelt den beobachtbaren Veränderungen nach Gabe von rekombinanten G-CSF und ist in der Tat mit einem starken Anstieg des Plasma G-CSF assoziiert. Die hier gezeigten Daten unterstreichen sogar die Kausalität des G-CSF Anstiegs (G-CSF unterbindet komplett den Feedback).

Dieser Mechanismus ist unabhängig von Lymphozyten, kommensalen Bakterien und dem Adaptorprotein MyD88.

Vermittelt wird dieser Feedback-Mechanismus über TLR4 in einem MyD88-unabhängigen, dafür TRIF-abhängigen Signaltransduktionsweg.

Ein möglicher Sensor bei der Regulation der Neutrophilen-Homöostase für diesen TLR4/TRIF-abhängigen regulatorischen Feedback-Mechanismus im steady-state

könnten, abgeleitet aus unseren Ergebnissen, mesenchymale Stroma Zellen aus dem Knochenmark darstellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit kann durch folgende Abbildung zusammengefasst werden:

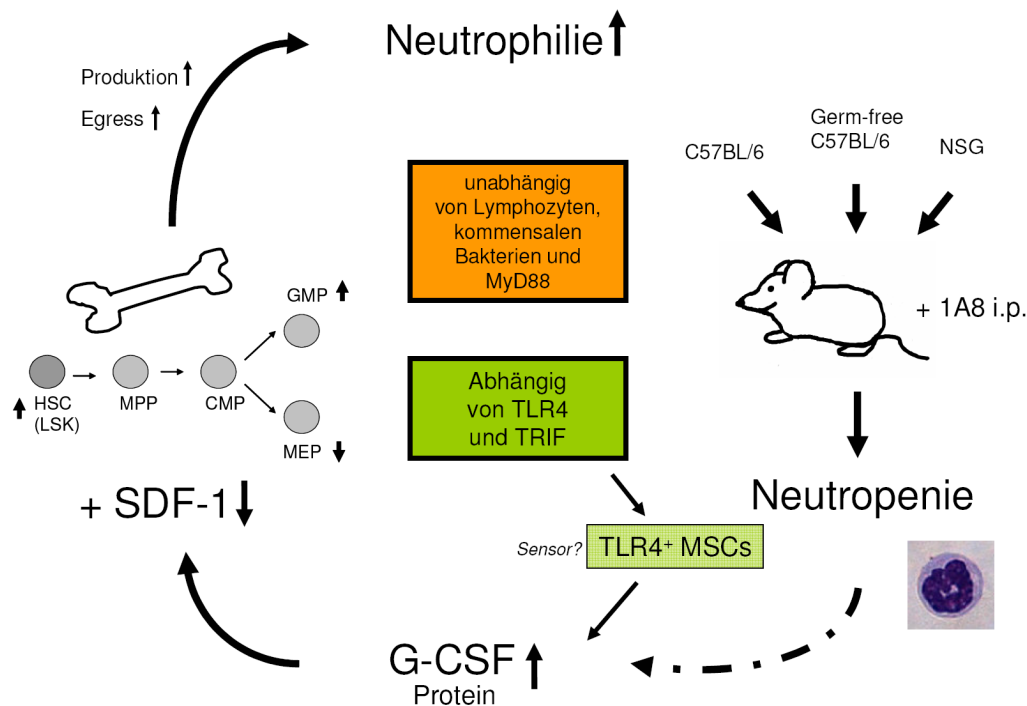


Abbildung 40 Zusammenfassende Abbildung des positiven Feedback-Mechanismus

Nach Injektion des neutrophilen-depletierenden Antikörpers (Klon 1A8) kommt es zu einer peripheren Neutropenie. Dies führt zu einem Anstieg des G-CSF Spiegel im Plasma. Durch den erhöhten G-CSF-Spiegel kommt es zu einer Erhöhung der hämatopoetischen Stammzellpopulation (LSK-Zellen) und zu einem Anstieg der GMP Population auf Kosten der MEP Population.

Dieser positive Feedback-Mechanismus ist unabhängig von Lymphozyten, kommensalen Bakterien und MyD88, dafür abhängig von TLR4 und TRIF.

Der Sensor dieses positiven Feedback-Mechanismus könnte sich im mesenchymalen Knochenmarkstroma befinden.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Alum	hydratisiertes Kalium-Aluminiumsulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
C/EBP	CCAAT- enhancer binding protein
	Zelluläre FADD-like interleukin-1 beta-converting Enzym
C-FLIP	inhibitorische Proteine
c-kit	Stammzellfaktor, CD 117
CD	Cluster of Differentiation
CLP	gemeinsame lymphoide Progenitoren
CMP	gemeinsame myeloische Progenitoren
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR 4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EPO	Erythropoietin
FACS	Fluoreszenz Aktiviertes Zell Sorting
fwd	forward
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GMP	Granulozyten-Makrophagen Progenitoren
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
h	Stunde
HSC	hämatopoetische Stammzellen
HSPC	hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
IFN β	Interferon β
IL	Interleukin
IRF-3	Interferon regulatory factor- 3
KM	Knochenmark
lin neg	CD3- B220- Ter-119- Gr-1- CD11b-

7. Akademische Lehrer

LPS	Lipopolysaccharid
LSK	lin neg c-kit+ Sca-1+ - Zellen
Lys	Lysozym
MACS	Magnetische Zellseparation
MAP-Kinase	mitogen-activated protein
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitoren
min	Minute
MPP	multipotente Progenitorzellen
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein
NOD	Non obese diabetic
NSG	NOD SCID γ -/- Mäuse
PAMP	pattern associated molecular pattern
PRR	pattern recognition Rezeptor
qRT-PCR	quantitative Real-Time- PCR
RAG	Recombination activating gene
rev	reverse
rh-G-CSF	rekombinantes humanes G-CSF
RNA	Ribonukleinsäure
SARM	Sterile α and HEAT-Armadillo motifs containing protein
Sca-1	Stammzellantigen 1
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SPF	Spezifiziert pathogenfrei
TIR	Toll-interleukin-1 Rezeptor
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLR	Toll like Rezeptor
TPO	Thrombopoietin
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR domain containing adaptor inducing IFN β
WBC	whole blood count

7.2 Akademische Lehrer

Prof. Dr. Klaus Albert (Organische Chemie), Dr. Ernst O. Bayer (Organische Biochemie), Prof. Dr. Christian F. Bardele (Zoologie), Prof. Dr. Hans Bisswanger (Biochemie), Prof. Dr. Peter Bohley (Biochemie), Prof. Dr. Gabriele Dodt (Biochemie), Prof. Dr. Ulrich Drews (Anatomie), Prof. Dr. Michael Duszenko (Biochemie), Prof. Dr. Robert Feil (Biochemie), Prof. Dr. Günter Gauglitz (Physikalische Chemie), Prof. Dr. Günter Häfelinger (Organische Chemie), Prof. Dr. Bernd Hamprecht (Biochemie), Prof. Dr. Thomas Iftner (Experimentelle Virologie), Prof. Dr. Walter Jäger (Gesetzeskunde), Prof. Dr. Lothar Kanz (Innere Medizin), PD Dr. Hans-Georg Kopp (Innere Medizin), Prof. Dr. Detlef Krug (Anorganische Chemie), Prof. Dr. Ekkehard Lindner (Anorganische Chemie), Prof. Dr. Martin E. Maier (Organische Chemie), Prof. Dr. Gregor Meyers (Virologie), Prof. Dr. Helga Ninnemann (Biochemische Pflanzenphysiologie), Prof. Dr. Heinz Oberhammer (Physikalische Chemie), Prof. Dr. Eberhard Pfaff (Virologie), PD Dr. Helmut Pommer (Mathematik), Prof. Dr. Hansgeorg Probst (Biochemie), Prof. Dr. Peter Ruth (Pharmakologie), Prof. Dr. Werner J. Schmidt (Neuropharmakologie), Prof. Dr. Herbert Schott (Organische Chemie), Prof. Dr. Michael Schwarz (Toxikologie), Prof. Dr. Eberhard Schweda (Anorganische Chemie), Prof. Dr. Thilo Stehle (Biochemie), Prof. Dr. Joachim Strähle (Anorganische Chemie), Prof. Dr. Wolfgang Voelter (Physikalische Biochemie), Prof. Dr. Gerhard J. Wagner (Physik), Prof. Dr. Ulrich Weser (Biochemie), Prof. Dr. Klaus-Peter Zeller (Organische Chemie), Prof. Dr. Thomas Ziegler (Organische Chemie).

8 Lebenslauf

Name	Stefanie Bugl
Geburtsname	Lehnert
Anschrift	Friedrich-Ebert- Strasse 15 72108 Rottenburg am Neckar
Geburtsdatum und -ort	05. Oktober 1981 in Nürtingen
Familienstand	verheiratet
Berufsabschluss	Diplom-Biochemikerin

Beruflicher Werdegang

Promotion

Juni 2008 – September 2012	Promotion bei PD Dr. med. Hans-Georg Kopp (Medizinische Klinik, Abt. II, Tübingen) „Untersuchungen zur homöostatischen Regulation der neutrophilen Granulozyten im Mausmodell“
----------------------------	---

Studium

Mai – Dezember 2007	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Michael Duszenko (Interfakultäres Institut für Biochemie, Tübingen) „Untersuchungen zur Osmoregulation bei Trypanosoma brucei“
---------------------	--

April 2007	Abschluss der Diplomprüfungen Hauptfach: Biochemie Chemisches Nebenfach: Organische Chemie Biologisches Nebenfach: Virologie
------------	---

November 2004	Abschluss der Diplomvorprüfungen
Ab April 2002	Studium der Biochemie in Tübingen
Oktober 2001 – März 2002	Studium der Chemie in Tübingen

Schulausbildung

August 1992- Juni 2001	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Metzingen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
August 1988 – Juli 1992	Grundschule Kohlberg

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

1) Wiesner T, Bugl S, Mayer F, Hartmann JT, Kopp HG.

“Differential changes in platelet VEGF, Tsp, CXCL12, and CXCL4 in patients with metastatic cancer”

Clin Exp Metastasis. 2010 Mar; 27(3):141-9. Epub 2010 Feb 25.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert in:

A) Bugl S*, Wirths S*, Radsak MP, Müller MR, Kopp HG

“Current insights into neutrophil homeostasis”

(Ann N Y Acad Sci. 2012 Aug;1266:171-8, Review)

B) Bugl S*, Wirths S*, Radsak MP, Schild H, Stein P, André MC, Müller MR, Malenke E, Wiesner T, Märklin M, Frick JS, Handgretinger R, Rammensee HG, Kanz L, Kopp HG

“Steady-state neutrophil homeostasis is dependent on TLR4/TRIF signaling”

(Blood, accepted)

* gleichberechtigte Erstautorenschaft

Vorträge

1) Bugl S, Wirths S, Wiesner T, Kanz L and Kopp HG (2010)

„Die Bildung neutrophiler Granulozyten wird über multiple, von Lymphozyten unabhängige Rückkopplungssignalwege reguliert“

2) Bugl S, Wirths S, Märklin M, Müller MR, Wiesner T, Frick JS, Malenke E, Kanz L and Kopp HG (2011)

„Neutropenie induziert G-CSF Transkription unabhängig von kommensaler Flora“

(Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2010 und 2011)

Poster

Bugl S, Wiesner T, Kanz L, Kopp HG and Wirths S

“Lymphocytes Are Dispensable In Neutrophil Homeostasis”

(Jahrestagung der American Society of Hematology 2010)

9 Contributions

Die Femura wurden in Kooperation mit der Pathologie Tübingen in Paraffin eingebettet. Die Paraffinschnitte wurden von Tina Wiesner angefertigt. Hämatoxylin-/Eosin-Färbungen und Photographien wurden von Tina Wiesner und Elke Malenke durchgeführt (Abbildung 10, S.47).

Teilweise wurden Mäuse von Kooperationspartnern neutrophil depletiert:

Nicole Kosgalwis (Universität Ulm) behandelte die keimfreien C57BL/6 Mäuse, Dr. Pamela Stein (Universität Mainz) behandelte die TLR4^{-/-} Mäuse.