AUS DER KLINIK FÜR ANÄSTHESIOLOGIE

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard M. Graf, MSc.

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHOLINERGE IMMUNMODULATION HUMANER NEUTROPHILER GRANULOZYTEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christoph Paech

2015

AUS DER KLINIK FÜR ANÄSTHESIOLOGIE

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard M. Graf, MSc.

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHOLINERGE IMMUNMODULATION HUMANER NEUTROPHILER GRANULOZYTEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christoph Paech

2015

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. Benedikt Trabold
2. Berichterstatter:	PD Dr. Bernhard Flörchinger
Tag der mündlichen Prüfung:	02. Dezember 2015

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern als Dank für ihre stete Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Sepsis und Inflammation 1
1.2 Neutrophile Granulozyten und Endothel 1
1.2.1 Selektine 3
1.2.2 Selektin-Liganden 4
1.2.3 Integrine 4
1.2.4 Immunglobulin-Superfamilie 5
1.2.5 Mehrstufenmodell der Leukozytenadhäsion und -migration 6
1.3 Sauerstoffradikalbildung 9
1.4 Die Proteinkinase C 10
1.5 Das non-neuronale cholinerge System 11
1.6 Fragestellung 14
2 Material und Methoden 16
2.1 Material 16
2.1.1 Geräte 16
2.1.2 Verbrauchsmaterial 17
2.1.3 Reagenzien 17
2.1.4 Puffer-Lösungen 19
2.2 Methoden 19
2.2.1 Probanden 19
2.2.2 Getestete Substanzen und Konzentrationen 20
2.2.3 Isolation der neutrophilen Granulozyten 21
2.2.3.1 Durchflusszytometrie 21
2.2.3.2 ELISA 21
2.2.4 Messung der Sauerstoffradikalbildung 22
2.2.4.1 Theoretische Grundlagen der Messung 22
2.2.4.2 Ablauf der Messung 22
2.2.5 Messung der CD11b- und CD62l-Expression 24

2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS-Messung) 24
2.2.7 Quantifizierung der Proteinkinase C - Aktivität 26
2.2.7.1 Der ELISA 26
2.2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration 28
2.2.7.3 Probandenproteine 28
2.2.7.4 Gereinigte Proteinkinase C - delta 29
2.2.8 Versuche mit HUVEC 29
2.2.8.1 An- und Aufzucht 29
2.2.8.2 Versuchsdurchführung mit Acetylcholinchlorid 32
2.2.9 Statistische Analyse 33
3 Ergebnisse 34
3.1 Durchflusszytometrie 34
3.1.1 Physostigminsalicylat 34
3.1.2 Acetylcholinchlorid 36
3.1.3 Nikotin 37
3.1.4 Anteil toter Zellen 42
3.1.5 Acetylcholinwirkung auf die HUVEC-Antigenexpression 43
3.2 Proteinkinase C - ELISA 44
3.2.1 Probandenproteine 44
3.2.2 Gereinigte Proteinkinase C - delta 45
4 Diskussion 46
4.1 Durchflusszytometrie 46
4.1.1 Physostigminsalicylat 46
4.1.2 Nikotin 47
4.1.3 Acetylcholinchlorid 50
4.1.3.1 Neutrophile Granulozyten 50
4.1.3.2 HUVECs 51
4.2 Proteinkinase C-ELISA 53
4.3 Schlussfolgerungen für die zelluläre Ebene des „cholinergic antiinflammatory pathway“ 55

5 Zusammenfassung 58
6 Literaturverzeichnis 60
7 Abbildungsverzeichnis 70
8 Tabellenverzeichnis 72
9 Abkürzungsverzeichnis 73
10 Danksagung 75

Anhang .....
Erklärung zum Promotionsverfahren I

1 Einleitung

1.1 Sepsis und Inflammation

Jeder Mensch ist tagtäglich einer Vielzahl verschiedenster Noxen ausgesetzt. Nebst effektiven Schutzbarrieren wie der Haut, ist ein funktionierendes und universell agierendes Immunsystem daher unabdingbar. Auf der einen Seite müssen effiziente Abwehrstrategien vorhanden sein, auf der anderen Seite dürfen selbige nicht den eigenen Organismus schädigen. Wie der menschliche Körper diese Balance regelt, ist Gegenstand intensiver Forschung. Fest steht, dass eine überschießende Immunreaktion des Organismus fatale Folgen haben kann.

Die systemische Inflammation stellt trotz aller hochtechnologisierter Medizin noch immer eine große Herausforderung in der intensivmedizinischen Betreuung dar. Dabei zählt die infektbedingte systemische Inflammation (Sepsis) zu den zehnthäufigsten Todesursachen in den USA und setzt sich somit noch vor schlaganfall- und krebsassoziierte Todesfälle.[1]

1.2 Neutrophile Granulozyten und Endothel

Gewebeschäden jedweder Genese (Trauma, Infektionen etc.) bewirken ein komplexes Zusammenspiel aus immunologischen Effektorzellen, Endothel und umliegendem Gewebe. Eine Schlüsselrolle bei inflammatorischen Prozessen spielen die neutrophilen Granulozyten.[2]

Als neutrophile Granulozyten wird eine Subpopulation leukozytärer Blutzellen bezeichnet. Dabei handelt es sich um phagozytäre Zellen der angeborenen Immunabwehr, die mit 50% – 65% den größten Anteil der weißen Blutkörperchen bilden. Sie treten aus der Blutbahn in das geschädigte Gewebe über und entfalten dort ihre immunologische Funktion.

Die Leukozyten-Endothel-Adhäsion stellt einen frühen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Leukozyten-Infiltration dar. Hierbei

bewirken zeitlich sowie örtlich genau abgestimmte physikalische und chemische Mediatoren eine Herauf- oder Herunterregulation der Immunantwort. Zunächst kommt es zu einem „Entlangrollen" der Neutrophilen auf der Endotheloberfläche, dies wird durch schwache Adhäsionskräfte ermöglicht. Sobald der Leukozyt ausreichend aktiviert ist, stellt sich eine feste Adhäsionsbindung zwischen ihm und dem Endothel ein. Kurz darauf erfolgt die Diapedese in subendotheliales Gewebe.

Im Folgenden sollen die relevanten Familien der Adhäsionsmoleküle sowie deren wichtigste Vertreter kurz vorgestellt (s. Tabelle 1) und anschließend detaillierter auf das Mehrstufen-modell des Zellübertritts vom Blutstrom in das umgebende Gewebe eingegangen werden.

Adhäsions-molekül	**Zellart**	**Expression**		**Ligand**	**Funktion**
		Ruhe-zustand	**Induzierbar**		
Selektine					
L-Selektin (CD62l)	Alle Leukozyten	✓	Zellaktivierung: Expression↓	P-,E-Selektin CD34	Rollen
P-Selektin	Endothel, Thrombozyten	✓	✓	L-Selektin	Rollen
E-Selektin	Endothel	Nein	✓	L-Selektin	Rollen
Integrine					
CD11a/CD18	Alle Leukozyten	✓	Nein	ICAM-1,-2	Adhäsion, Migration
CD11b/CD18	Granulozyten, Monozyten	✓	✓	ICAM-1, C3b	Adhäsion, Migration
CD11c/CD18	Granulozyten, Monozyten	✓	✓	ICAM-1, Fibrin	Adhäsion, Migration

Immunglobulin Superfamilie					
ICAM-1	Endothel	✓	✓	LFA-1, Mac-1	Adhäsion, Migration
ICAM-2	Endothel	✓	Nein	LFA-1	Adhäsion, Migration
VCAM-1	Endothel	Nein	✓	VLA-4	Adhäsion, Migration
PECAM-1	Endothel, Leukozyten, Thrombozyten	✓	Nein	PECAM-1	Adhäsion, Migration

Tabelle 1 – Übersicht der wichtigsten humanen Adhäsionsmoleküle [19]

1.2.1 Selektine

Die Gruppe der Selektine wird unterteilt in L-, E- und P-Selektine. Diese Bezeichnungen ergeben sich aus ihrer vorrangigen Präsenz auf Leukozyten (L-Selektine), Endothelzellen (E-Selektine) sowie Blutplättchen und Endothelzellen (P-Selektine).[3] Selektine gehören chemisch betrachtet zu den Glycoproteinen und sind ausschließlich im Gefäßsystem funktionell aktiv.

Monozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten sind in der Regel L-Selektin-positiv. Die L-Selektine spielen hier bei der Bindung von den entsprechenden Immunzellen an aktivierte Endothelzellen eine Rolle. An unstimulierten Gefäßwänden konnte dieser Effekt hingegen nicht beobachtet werden, was wiederum als ein Indiz für die fehlende Expression des entsprechenden Liganden an ruhenden Gefäßzellen zu werten ist.[4] Leukozyten benötigen selbst keinen aktivierenden Stimulus für die selektinvermittelte Interaktion mit dem Endothel. Im Gegenteil, eine Stimulation führt zu einer Reduktion der auf der Plasmamembran exprimierten L-Selektine.[5,6]

P-Selektine finden sich, wie schon erwähnt, gleichermaßen am Endothel, wie auch an Blutplättchen und fungieren als Rezeptoren für Makrophagen und neutrophile Granulozyten.[7,8] Auf Endothel exprimierte P-Selektine dienen der

Rekrutierung von Leukozyten zu entsprechenden Entzündungsherden.[9] Zudem wurde auch die Initiierung der Sauerstoffradikalbildung durch Neutrophile und Monozyten an aktivierten Thrombozyten beobachtet, während dies an den ruhenden Thrombozyten sowie nach Gabe gegen P-Selektin gerichteter Antikörper nicht der Fall war.[10] Die synthetisierten P-Selektine werden in den Weibel-Palade-Körperchen und Alpha-Granula der entsprechenden Immunzellen gespeichert.[7] Diese Speicher werden innerhalb weniger Minuten nach Aktivierung durch Histamin, Komplementfaktor C5q oder Superoxidanionen in die Plasmamembran integriert und die darin enthaltenen Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche präsentiert.[11] Aufgrund von Internalisierung und Abstoßung verringert sich die P-Selektin-Dichte nach 30 Minuten wieder zurück auf das Ausgangsniveau.[12] Des Weiteren findet auch eine transkriptionsgebundene Expression von P-Selektin statt. Dies wurde beobachtet, nachdem Endothelzellen vier Stunden zuvor mit bakteriellen Lipopolysacchariden beimpft wurden.[13]
Die dritte Gruppe der Selektinfamilie, die E-Selektine, sind physiologischerweise nicht auf unstimulierten Endothelzellen zu finden. Ihre Expression findet mittels induzierter Transkription nach Stimulation mit Zytokinen statt.[14] Hierbei zeigte sich im Mausmodell ein Expressionspeak nach zwei sowie eine Normalisierung nach acht Stunden.[15,16]

1.2.2 Selektin-Liganden

Der am weitesten verbreitete L-Selektin-Ligand im Blutgefäßsystem ist CD34. Er dient als Ligand für Lymphozyten und Neutrophile in der Peripherie.[2]
Ähnlich wie bei E- und P-Selektin steht die Expression von CD34 unter Zytokineinfluss. Jedoch bewirken Interferon-γ, Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) bei Konzentrationen, die positiv auf die endothelexprimierten Selektine E und P wirken, eine herunterregulierte CD34-Expression. Dies erscheint zunächst unlogisch. Doch die Selektine weisen auch untereinander Bindungseigenschaften auf. So wirkt L-Selektin sowohl als

Bindungspartner für E-, als auch P-Selektin und vice versa.[17,18] Die nach Stimulation vermehrt exprimierten Selektine des Endothels erzeugen in der Interaktion mit den L-Selektinen der Immunzellen ausreichend starke Bindungskräfte, um die nachfolgenden Schritte der Leukozyten-Endothel-Interaktion zu ermöglichen.

1.2.3 Integrine

Einen weiteren wichtigen Baustein in der Leukozyten-Endothel-Adhäsionskaskade bilden die Integrine. Dabei handelt es sich um heterodimere Proteine, die aus zwei nicht-kovalent gebundenen Untereinheiten bestehen, wobei derzeit 15 α und 8 β Untereinheiten bekannt sind. Leukozyten exprimieren unter anderem fünf Integrine. Diese werden den β1, β2 und β7-Subtypen zugeordnet und gehören somit zu den an der Leukozyten-Endothel-Interaktion beteiligten Untergruppen.[19]

Für die Ligandenspezifität der β1- und β2-Integrine ist insbesondere die variierende alpha-Untereinheit von Bedeutung.[19] Der β2-Grundbaustein (CD18) tritt im Komplex mit drei immunologisch unterscheidbaren alpha-Ketten auf: CD11a, CD11b und CD11c. Das Expressionsmuster unterscheidet sich bei den einzelnen Leukozytenarten, wobei die neutrophilen Granulozyten jedoch alle drei β2-Subtypen ausprägen.[19]

CD11a/CD18 ist konstitutiv exprimiert, also auch an immunologisch unstimulierten Zellen und interagiert mit endothelialem „intercellular adhesion molecule“ (ICAM)-1 und -2.[20] Dieser Integrin-Subtyp verfügt nicht über eine intrazelluläre Reserve in Form von Speichergranula, welche nach Stimulation in die leukozytäre Plasmamembran integriert und somit zu einer Zunahme der Leukozyten-Endothel-Adhäsion führen würde. Dennoch bewirkt eine Stimulation mit Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) oder Interleukin-8 eine rapide Adhäsionszunahme der Leukozyten am Endothel, welche am ehesten durch eine konformative Veränderung der Integrin-Affinität zu erklären ist.[21]

Demgegenüber stehen CD11b/CD18 und CD11c/CD18. Sie besitzen eine intrazelluläre Reserve, die nach Stimulation zur Verfügung steht.[22] Die Expressionsdichte kann nach Stimulation mit TNF-alpha oder anderen Stimuli auf das Drei- bis Achtfache ansteigen.[23] CD11b/CD18 interagiert ebenfalls mit ICAM-1, während CD11c/CD18 zusätzlich an Heparin und Komplementfaktoren bindet. [24,25,26]

Die Adhäsion aktivierter neutrophiler Granulozyten an zytokinstimuliertem Endothel lässt sich sowohl durch anti-CD11a, als auch durch anti-CD11b Antikörper verhindern. Hierbei bewirkt die simultane Gabe beider Antikörper einen additiven Hemmeffekt.[27] Diese Beobachtungen unterstreichen die Relevanz der Integrine im immunologischen Abwehrprozess.

1.2.4 Immunglobulin-Superfamilie

Als drittes und letztes Adhäsionsmolekül möchte ich kurz auf die Immunglobulin-Superfamilie eingehen. Diese besteht aus mehreren Vertretern, denen alle eine Immunglobulin-ähnliche Domäne gemein ist. Für die Leukozyten-Endothel-Interaktion sind dabei die folgenden fünf Subtypen relevant, von denen zuvor schon einige genannt wurden: ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), VCAM-1 („vascular cell adhesion molecule“, CD106), PECAM-1 („plateled-endothelial cell adhesion molecule“, CD31) und MAdCAM-1 („mucosal adressin cell adhesion molecule“).

Da sich unser Projekt auf neutrophile Granulozyten bezieht, beschränken sich die anschließenden Erläuterungen auf ICAM-1 und VCAM-1 – den getesteten Parametern. Schon im Ruhezustand wird ICAM–1 auf Leukozyten, Endothelzellen und anderen Zellarten exprimiert. Hierbei kann die Rezeptordichte auf Endothelzellen durch deren Aktivierung via LPS oder Zytokine erhöht werden.[13,28] Sowohl die Funktion als auch die physiologische Relevanz dieses Adhäsionsmoleküls erklärt sich durch die Beobachtung, dass eine

erhöhte Rezeptordichte mit einer signifikant höheren Leukozytenadhäsion am Endothel einhergeht.[29]

Ähnlich verhält es sich mit dem „vascular cell adhesion molecule – 1“(VCAM-1). Hierbei handelt es sich um ein Endothelzell-spezifisches Adhäsionsmolekül, welches auf unstimulierten HUVECs („human umbilical-vein endothelial cell“) nicht nachweisbar ist. Erst durch Stimulation mit LPS oder Zytokinen erfolgt die transkriptionsabhängige Expression.[30,31] Daher ist der Expressionspeak auch erst fünf bis neun Stunden nach Zytokin-Stimulation nachweisbar und liegt dabei noch deutlich unter der Zelloberflächendichte von ICAM-1.[32] VCAM-1 ist ein wichtiger Modulator der Leukozytenadhäsion und dient als Ligand sowohl für $\alpha_4\beta_1$-Integrin[33] als auch für $\alpha_4\beta_7$ -Integrin[34], wobei die letztgenannte Bindung weniger stark ausfällt. Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass zahlreiche Faktoren auf die Oberflächendichte dieser Immunglobulin-Superfamilie Einfluss nehmen.

So können LPS sowie die Zytokine TNFα, Interleukin-1β, Interleukin-4 und Interferon-γ die Expression von P- und E-Selektin, als auch von VCAM-1 und ICAM-1 signifikant erhöhen.[13,35,36] Auf HUVEC-Monozellschichten konnte hierbei beobachtet werden, dass die Zelloberflächendichte von P- und E-Selektin drei bis fünf Stunden, von VCAM-1 sechs Stunden und von ICAM-1 zwölf Stunden nach Stimulation am höchsten ist.[37,38,39]

1.2.5 Mehrstufenmodell der Leukozytenadhäsion und -migration

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die einzelnen molekularen Faktoren, welche für die Leukozyten-Endothel-Interaktion relevant sind, kurz vorgestellt. Im Folgenden soll nun deren komplexes Zusammenspiel anhand des Mehrstufenmodells erläutert werden. Denn nur durch das chronologisch aufeinander abgestimmte Zusammenwirken aller Gruppen, können der Übertritt der immunologischen Effektorzellen aus dem Gefäßsystem in das erkrankte Gewebe erfolgen und die effektiven Abwehrmechanismen greifen.

Um überhaupt eine Adhäsion der Leukozyten mit der Gefäßwand zu erreichen, müssen diese in einem initialen Schritt vom Zentralstrom des Blutes in die langsameren peripheren Strömungen der Blutgefäßwände abgelenkt werden. Dies geschieht während des Übertritts von den kleineren Kapillaren zu den größeren postkapillaren Venolen.[40] Hierbei werden die Leukozyten durch Erythrozyten aus dem axialen Blutstrom in Richtung des venösen Endothels verdrängt.[41] Daraufhin kommt es zum sogenannten „Rollen". Verantwortlich dafür sind schwache Interaktionen zwischen den Leukozyten und den Endothelzellen. Diese Effekte sind gerade groß genug, um die Scherkräfte zu übertreffen und werden durch Selektine bzw. ihre Liganden vermittelt.

Das Rollphänomen von neutrophilen Granulozyten wurde anschaulich an künstlichen Oberflächen nachgestellt, welche mit P-Selektin[42] und E-Selektin[43] beschichtet waren. Somit konnte deren Beteiligung an dieser Interaktion nachgewiesen werden.

Mikroskopische in vivo Untersuchungen an mesenterialen Gefäßen zeigten, dass monoklonale Antikörper gegen P-, E- und L-Selektin das Rollen der Leukozyten signifikant hemmen konnten.[44,45,46] Entsprechende Ergebnisse wurden später auch bei Untersuchungen an gendefizienten Mausmodellen beobachtet.[47]

In einem nächsten Schritt der Leukozytenadhäsion muss die Bindung derart verstärkt werden, dass die rollenden Leukozyten auf dem Endothel zum Stehen kommen. Hierbei spielen die Integrine eine entscheidende Rolle.

Wie schon erwähnt, werden Integrine auch basal exprimiert. Jedoch sind diese im unstimulierten Zustand der Zelle nicht aktiv bzw. affin. Sobald die Leukozyten durch geringe Konzentrationen von Zytokinen, chemoattraktiven Substanzen oder ähnlichem angeregt werden, wird die Oberflächendichte von L-Selektin drastisch verringert und sowohl die biologische Aktivität als auch die Oberflächendichte der Integrine erhöht.[48] Diese aktivierenden Mediatoren werden durch Endothelzellen und andere Immunzellen ausgeschüttet. Der immunologische Aktivierungszustand des Neutrophilen folgt somit in gewisser Weise dem

Konzentrationsgradienten der ihn umgebenden Mediatoren. Vereinfacht kann man sagen, je mehr sich der Granulozyt dem inflammatorischen Focus annähert, desto stärker wird er aktiviert und ändert dementsprechend sein Oberflächenantigen-Expressionsmuster.

Neutrophile Granulozyten können darüber hinaus auch durch Interaktionen mit PECAM-1 aktiviert werden, was ebenfalls zu entsprechenden Veränderungen der Integrine führt.[49] Einmal aktiviert, führen die Integrine zur stationären Adhäsion der Leukozyten an den Endothelzellen. Die Endothelien weisen in ihrer Plasmamembran wiederum ein Oberflächenantigen-Expressionsmuster auf, das ebenfalls ihrem Erregungszustand angepasst ist. Daher verfügt eine stimulierte Gefäßwandzelle über eine sehr viel höhere Dichte von Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie als ihr unstimuliertes Pendant in einem Gebiet, das nicht unmittelbar mit dem entzündlichen Focus assoziiert ist. Folglich wird der Leukozyt zielgerichtet zum Entzündungsherd geführt und kann dann eine feste Bindung eingehen, um gegebenenfalls im weiteren Verlauf in das perivasale Gewebe überzutreten.

Diese starke Bindung ist an allen Leukozytenarten durch folgende Partner vermittelt: CD11a/CD18-ICAM1 sowie CD11a/CD18-ICAM2. Neutrophile Granulozyten interagieren zusätzlich über CD11b/CD18-ICAM1 und CD11c/CD18-ICAM1 mit den Endothelzellen. (vgl. Tabelle 1)

Dies wurde durch zahlreiche Untersuchungen an isolierten humanen Leukozyten und Endothelzellschichten bzw. zirkulierenden Leukozyten in postkapillaren Venolen evaluiert.[21,39] Hierbei wurde eine Vielzahl von Substanzen identifiziert, die regulatorisch in diesen, als feste Adhäsion bezeichneten, Schritt eingreifen. (s. Tabelle 2)

	Wirkort	
	Leukozyt	**Endothel**
Proadhäsiv		
Zytokine	TNF-α, IL-1, -3, -5, -8	TNF-α, TNF-ϒ, IL-1, IL4, IFN-ϒ
Lipide	LPS, Leukotrien B_4	LPS, Leukotrien B_4
Peptide	C3b, C5a, Neuropeptide	Histamin
Antiadhäsiv		
Zytokine	IL-4, -10, -13	IL-4, -10, -13
Prostaglandine	Prostaglandin I_2	
Andere	Adenosin, Stickstoffoxid	Adenosin, Stickstoffoxid

Tabelle 2 – Übersicht der adhäsionsregulierenden Signalmoleküle (Auszug) [19]

Im letzten Schritt der Leukozytenrekrutierung gelangen die aktivierten Leukozyten an den inflammatorischen Herd, indem sie durch die Endothelzellschicht migrieren. Dabei müssen die Leukozyten durch die Interzellular-Lücken des Endothels gelangen. Dies geschieht indem neue, starke Bindungen in progressiver Richtung geschaffen und in der Gegenrichtung gelöst werden. Hierbei dürfen die Bindungskräfte aber nicht zu stark sein, da hieraus sonst eine Immobilisation resultieren würde. In diesem Kontext zeigten Untersuchungen, dass die biologische Aktivität der Integrine auf den Leukozytenoberflächen nach der Stimulation durch PECAM-1 bzw. Zytokine sehr schnell wieder rapide abnimmt. Somit existiert eine Steuerungsgröße für die Schaffung und Lösung dieser starken Adhäsionskräfte.[50] Des Weiteren spielt wahrscheinlich auch die herunterregulierte L-Selektin-Expression eine Rolle bei der Diapedese (Durchwanderung) der Leukozyten.[5]

Da die transendotheliale Migration durch monoklonale Antikörper gegen ICAM-1 und CD11/CD18 effektiv gehemmt werden konnte, scheint dies ein weiterer Beweis für die Beteiligung dieser „festen Adhäsionsmoleküle“ zu sein.[51] Zusätzlich führt die einsetzende Kontraktion der Endothelzellen zu einer

Vergrößerung des interzellulären Spaltes und erleichtert somit die Diapedese der Leukozyten.[52]

Weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen wiesen auch auf die Möglichkeit einer transendothelialen Diapedese auf transzellulärem – statt interzellulärem – Wege hin.[53] Die weitere Migration im subendothelialen Gewebe wird durch die Bindung von β_1-Integrinen an Proteine der extrazellulären Matrix vermittelt.[54]

1.3 Sauerstoffradikalbildung

Nachdem der Leukozyt das Gefäßsystem verlassen hat und in den inflammatorischen Focus eingewandert ist, treten nun die direkt gegen den auslösenden Faktor gerichteten Abwehrmechanismen in den Vordergrund der Abwehrstrategie. Nebst der Phagozytose stellt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (sog. „oxidativer Burst“) eine wichtige und entscheidende immunologische Funktion des neutrophilen Granulozyten dar.

Zur Bildung dieser Sauerstoffradikale wird die NADPH-Oxidase benötigt. Sie besteht aus einer membrangebundenen und vier zytosolischen Komponenten, welche nach Aktivierung des Neutrophilen an die Membraneinheit binden.[55] Hierbei wird molekularer Sauerstoff mittels NADPH als Elektronendonor reduziert und die Sauerstoffradikale dann in intrazelluläre Kompartimente (Phagosomen) oder extrazellulär entlassen.[56] Diese Superoxidanionen können dann wiederum mit Wasser zu Wasserstoffperoxid reagieren. Im weiteren Verlauf reagiert das gebildete Wasserstoffperoxid intrazellulär mittels der Myeloperoxidase aus den azurophilen Vakuolen der Granulozyten mit freien Chloridanionen zu hypochloriger Säure, dem vermutlich eigentlichen zelltoxischen Effektor.[57]

Dabei wird jedoch auch deutlich, dass die reaktiven Sauerstoffspezies aufgrund fehlender Selektivität nicht nur antimikrobiell wirken, sondern auch umliegende Gewebe schädigen können – und es auch tun. Konkret bedeutet dies, dass

neutrophile Granulozyten vor und bis zu sechs Stunden nach experimentell herbeigeführter Sepsis einen protektiven Effekt auf den Organismus haben. Danach kommt es allerdings zu einer Akkumulation im geschädigten Gewebe, welche bis zu Organsdysfunktionen (MODS) und damit verbundener erhöhter Letalität führen kann.[58] Die Tatsache, dass dieser dramatische Verlauf eher selten auftritt, ist das Ergebnis eines komplexen immunregulatorischen Systems. Hierbei werden protektive Mechanismen der Immunabwehr gefördert und Kollateralschäden frühzeitig vermieden. Eine Säule dieser Regulatoren könnte der „cholinerge antiinflammatorische Signalweg" darstellen, welcher wiederum in Abschnitt 1.5 näher erläutert wird.
Ergänzend und rein informativ sei erwähnt, dass eine insuffiziente NADPH-Oxidase indes zu dem Krankheitsbild der chronischen Granulomatose führt.[59]

1.4 Die Proteinkinase C

Die Proteinkinase C (PKC) bezeichnet eine Enzymfamilie mit mehreren Subtypen. Dabei handelt es sich um wichtige intrazelluläre Signalmoleküle, die eine Rolle bei der Differenzierung, Proliferation und Aktivierung spezifischer Funktionen spielen. Diese Seronin/Threonin-Kinasen können sowohl von G-Protein-gekoppelten als auch von Tyrosinkinase- und wachstumshormonell-sensitiven Rezeptoren reguliert werden.[60] Derzeit sind zwölf Isoformen bekannt, welche wiederum in drei Hauptgruppen eingeteilt werden. Die Einteilung erfolgt auf Basis struktureller Gemeinsamkeiten. Hierbei ist die Präsenz der regulatorisch-wirksamen C1– bzw. C2–Domäne entscheidend.
Zu der ersten Gruppe, den konventionellen Proteinkinase C Subtypen (cPKC), zählen die Proteinkinase C–alpha, –beta1, –beta2 und -gamma. Sie besitzen sowohl die C1– als auch die C2–Domäne, daher benötigen sie zur physiologischen Aktivierung Diacylglycerol (C1–Domäne) und Calcium (C2–Domäne).

Eine zweite Gruppe bilden die neuen oder auch als nicht-konventionell bezeichneten Proteinkinasen C (nPKC), deren Vertreter sich aus Proteinkinase C –delta, –epsilon, –eta und –theta zusammensetzen. Bei diesen Subtypen ist ebenfalls eine C1-Domäne vorhanden, jedoch fehlt die C2-Domäne. Somit fungiert diese Isoform Calcium-unabhängig.

Die dritte Gruppe bilden die atypischen PKC (aPKC). Ihr werden die Proteinkinase C –iota, –zeta und –lambda zugeordnet. Hier finden sich strukturell weder eine C1– noch eine C2–Domäne. In der Literatur wird zudem oft eine PKC–my [μ] beschrieben, die auch als Proteinkinase D1 geführt und den aPKC zugerechnet wird. [61,62]

In der Vergangenheit konnten PKC–alpha, –beta1, –beta2, –delta und auch –zeta in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden.[63] Die PKC–Isoforme in neutrophilen Granulozyten sind unter anderem Teil des Signalwegs, der letztlich in der Produktion von Sauerstoffradikalen mündet. Hierzu phosphorylieren sie nach Aktivierung die zytosolische Untereinheit der NADPH-Oxidase ($p47^{phox}$), was wiederum zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führt.[64] Proteinkinase C–alpha wurde im Zusammenhang mit der gesteigerten Superoxidanion-Produktion nach PMA- und fMLP-Stimulus beschrieben.[65] Ebenfalls in die PMA-stimulierte Sauerstoffradikalbildung scheint die PKC–delta involviert zu sein. Zudem wurde ihrerseits eine erhöhte Aktivität nach TNF-alpha-Stimulus nachgewiesen.[66,67]

PMA ist ein PKC-Aktivator, dessen Funktionsweise sich durch die agonistische Bindung an die C1-Domäne der Kinase erklärt.[68] Bei fMLP handelt es sich hingegen um ein bakterielles Peptid, welches von Bakterien als Initiatorsequenz der prokaryotischen Proteinsynthese gebildet wird.[69] Dieses Peptid wirkt chemoattraktiv auf neutrophile Granulozyten, indem es an die beiden Rezeptoren „formyl peptide receptor“ (FPR) und „formyl peptide receptor – like 1“ (FPRL1) bindet.[70] Dadurch wird unter anderem die PKC–delta phosphoryliert, was wiederum über einige Zwischenschritte zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führt.[71]

1.5 Das non-neuronale cholinerge System

Wie eingangs beschrieben, ist das Immunsystem ein essenzieller Faktor des Überlebens. Mindestens genauso wichtig ist jedoch auch die Kontrolle dieses Abwehrsystems, um Schäden am umliegenden Gewebe zu minimieren.
1975 schrieb Lewis Thomas in seinem Buch „The lives of a cell“:

„*When we sense lipopolysaccharide, we are likely to turn on every defense at our disposal; we will bomb, defoliate, blockade, seal off, and destroy all the tissues in the area. All of this seems unnecessary, panicdriven… The self-disintegration of the whole animal that follows a systemic injection can be interpreted as a well-intentioned but lethal error. The mechanism is itself quite a good one, when used with precision and restraint.*“ [72]

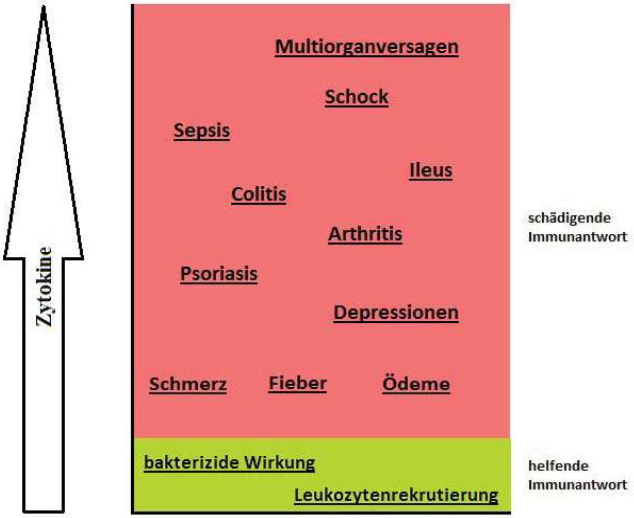

Abbildung 1 – Folgen der unkontrollierten Zytokinausschüttung (nach Anlehnung an Tracey et al. [74])

Viele Symptome wie Fieber, Gewichtsverlust, Hypotonie, Koagulationsstörungen und andere Zeichen teils letaler Krankheitsbilder werden nicht direkt durch die Pathogene, sondern durch die humorale Immunantwort und inflammatorische Mediatoren wie IL-1, IL-6, TNFα und andere ausgelöst.[73] (s. Abb. 1)

Der Tumornekrosefaktor-alpha (TNFα) ist ein Zytokin, das als Reaktion auf eine Infektion mit gram-negativen Bakterien bzw. deren Lipopolysaccharide (vorwiegend von Makrophagen) ausgeschüttet wird.[74] Gleichzeitig ist dieser wichtige Bestandteil des Immunsystems von entscheidender Bedeutung für die Entstehung des septischen Schocks.[75] Gestützt werden diese Beobachtungen von Untersuchungen, in denen die intravenöse Gabe von TNFα in physiologischen Mengen zu denselben hämodynamischen, metabolischen und immunologischen Konsequenzen führte, wie sie in einer Infektsituation zu beobachten sind.[76] Des Weiteren konnte diese Entwicklung durch pharmakologische TNF-Rezeptor-Blockade und bei gendefizienten Mäusen unterbunden werden.[77,78]

Wie schon im Abschnitt der Leukozytenadhäsion erwähnt, gibt es eine ganze Reihe humoraler antiinflammatorischer Mediatoren, die in der Regel die Wirkung proinflammatorischer Mediatoren auf einen sicheren und vorrangig schützenden Bereich beschränken.[79] Hinzu kommen noch weitere eindämmende Mechanismen wie die hypothalamisch-hypophysäre-adrenale Achse. Letztgenannte kann über eine kortikoide Immunsuppression den Abwehrmechanismen des Körpers entgegenwirken, sofern selbige eine schädigende Dynamik entwickeln. All diese Systeme reagieren jedoch langsam und entfalten eine systemische Wirkung. Sehr viel schneller und vor allem lokal, direkt am Ort der Entzündung, wirkt der sogenannte „cholinergic antiinflammatory pathway“ (CAP). [80]

Das cholinerge System des Menschen wurde bis Ende des letzten Jahrtausends auf die neuronale Ebene beschränkt. Acetylcholin ist ein wichtiger Neurotransmitter. Über muskarinerge bzw. nikotinerge Acetylcholinrezeptoren wirkt es im menschlichen Nervensystem an Ganglien, Interneuronen und der

motorischen Endplatte. Von besonderer Bedeutung ist der zehnte Hirnnerv, der N. vagus, da er vom Kopf bis hin zur linken Colonflexur mäandert und dabei zahlreiche Gewebe hauptsächlich parasympathisch innerviert.

Studien haben gezeigt, dass die elektrische Stimulation des efferenten Vagusanteils zu einer verminderten, systemischen TNF-Ausschüttung während einer Endotoxämie (via LPS-Gabe) führt. In weiteren Studien wurde eine verminderte Zytokinaktivität sowie ein verbessertes Outcome nach physikalischer bzw. pharmakologischer Vagusstimulation bei experimentellen Sepsismodellen, hämorrhagischem Schock, Pankreatitis, Ileus, myokardialer Ischämie und Arthritis beobachtet.[81,82,83,84,85,86,87]

Die morphologischen Grundlagen dieser Beobachtungen stellt das non-neuronale cholinerge System dar. Zahlreiche Zellarten exprimieren abgekoppelt von neuronalen Einflüssen sowohl muskarinerge (mAChR) als auch nikotinerge (nAChR) Acetylcholinrezeptoren. Einen kurzen Überblick liefert die Tabelle 3.

Zellart	**Acetylcholinrezeptor**		**Literaturverweis**
	Muskarinerg	**nikotinerg**	
humane Endothelzellen	M1 – M5	α_3, α_5, α_7, β_2, β_4	[89,90,91,92,93]
Immunzellen			
Mononukleäre Zellen	M1 – M5 (variabel)	α_2, α_4, α_5, α_6, α_7, α_9, α_{10}, β_2, β_4 (variabel, dominante Subtypen: α_2, α_5, α_7)	[94,95,96,97,98,99,100,101,130]
Eosinophile Granulozyten	M2, M3	α_3, α_4, α_7	
Neutrophile Granulozyten	M3	α_3, α_4, α_7, β_2, β_4	

Makrophagen	M2, M3	α_1, α_7, α_{10}	
Mastzellen	M1 – M5	α_3, α_5, α_{10}	

Tabelle 3 – Übersicht Acetylcholinrezeptoren: Expressionsort und Subtypen [88]

Im letzten Jahrzehnt wurde der nikotinerge Acetylcholinrezeptor vom alpha-7-Subtyp (α7nAChR) besonders intensiv erforscht. Bis heute konnte er auf beinahe allen Immunzelltypen nachgewiesen werden (s. Tabelle 3) und scheint eine regulatorische Funktion in der Immunantwort einzunehmen. Zunächst wurde beobachtet, dass die Ausschüttung von TNFα und anderen Zytokinen durch humane Makrophagen mittels Acetylcholin verringert werden konnte. Dieser Mechanismus schien post-translational über einen α-Bungarotoxin-sensitiven Nikotinrezeptor ausgelöst zu werden.[101] Wang et al. gelang es 2001 diesen Rezeptor als α7nAChR zu identifizieren.[98] Zudem zeigte die Vagusstimulation bei endotoxämischen Mausmodellen eine verringerte proinflammatorische Zytokinausschüttung, während bei α7nAChR-defiziente Knockout-Mäusen dieser Effekt nicht mehr erzielt werden konnte.[98]

In weiteren Studien kamen direkte α7nAChR-Agonisten zum Einsatz. Nach Applikation konnten im Vergleich zu unbehandelten Gruppen signifikant verringerte Serumspiegel von TNFα und proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1, IL-6 und HMGB-1 (high mobility group box 1) nachgewiesen werden.[82,102] Eine grafische Zusammenfassung des cholinergen antiinflammatorischen Signalweges zeigt die Abbildung 2.

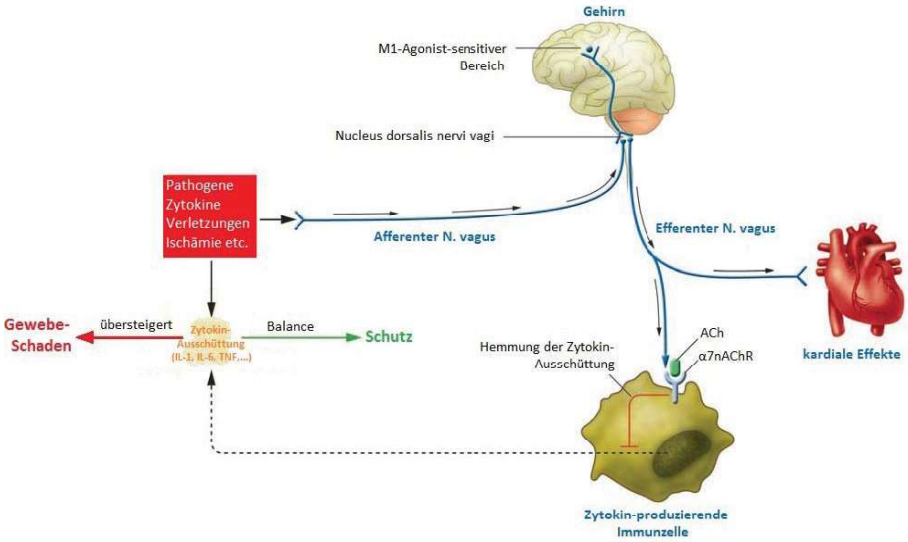

Abbildung 2 – Übersicht des CAP (in Anlehnung an Tracey et al. [74])

1.6 Fragestellung

Wie zuvor beschrieben, wurden schon zahlreiche Untersuchungen zur Aufklärung der Funktionsweise des CAP durchgeführt. Der nervus Vagus wurde sowohl physikalisch als auch pharmakologisch stimuliert. Die systemische Gabe von Cholinergika und direkten α7nAChR-Agonisten fand schon im Tiermodell Anwendung. Was jedoch unklar bleibt, ist die Wirkungsweise des CAP auf zellulärer Ebene abgekoppelt von neuronalen Einflüssen. Zwar wurden schon zahlreiche Rezeptortypen auf der Oberfläche von Immunzellen identifiziert, eine weitere Investigation des Zusammenspiels der einzelnen Komponenten blieb jedoch bisher aus.

Neutrophile Granulozyten sind ein wichtiger Bestandteil der zellulären Immunabwehr und übernehmen hierbei eine zentrale Rolle in der Abtötung und Beseitigung pathologischer Erreger. Aufgrund der zuvor beschriebenen

pathophysiologischen Überlegungen und Hintergründe, versuchen wir die folgenden Fragen zu klären:

- Wirken Acetylcholin, Nikotin oder Physostigmin in einer in vitro Studie modulatorisch auf die Sauerstoffradikalbildung von stimulierten und unstimulierten neutrophilen Granulozyten?
- Ändert sich durch die Zugabe der genannten Cholinergika die Expression von CD11b oder CD62l auf neutrophilen Granulozyten?
- Inwieweit haben die unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen der getesten Stimulantien PMA, fMLP und TNF-alpha Einfluss auf eine etwaige cholinerge Immunmodulation an neutrophilen Granulozyten?

In einem weiteren Schritt wird dann der Effekt von Acetylcholin auf das Bindungsverhalten von neutrophilen Granulozyten an humanen, umbilical-venösen Endothelzellen (HUVEC) mit Fokus auf die endotheliale Antigenexpression näher beleuchtet. Diese Endothel-Granulozyten-Interaktion gilt als Grundvoraussetzung der granulozytären Immunantwort. Hierbei eignen sich die endothelialen Adhäsionsmoleküle CD54 und CD106 als Messparameter des immunologischen Funktionszustandes der Endothelzellen, da diese mit den zuvor genannten Oberflächenantigenen der neutrophilen Granulozyten interagieren und somit den Übertritt der immunologischen Effektorzellen in das perivasale Gewebe ermöglichen. Dadurch beabsichtigen wir die folgenden Fragen zu klären:

- Wirkt Acetylcholin modulatorisch auf das CD54- bzw. CD106-Expressionsverhalten von IL1-stimulierten oder unstimulierten humanen, umbilical-venösen Endothelzellen?
- Wirken sich etwaige Beobachtungen, bzgl. eines cholinergen Effektes auf die Antigenexpression der neutrophilen Granulozyten oder der humanen,

umbilical-venösen Endothelzellen, tatsächlich auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion aus?

Hierbei finden alle Untersuchungen in vitro statt, da der Einfluss neuronaler Netzwerke ausgeschaltet und isoliert die zelluläre Ebene des CAP untersucht werden soll.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Name	Hersteller
Heraeus Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland
Heraeus Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland
HAAKE Schüttelwasserbad SWB25	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
LabTherm Schüttelgerät	Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz
BD FACSCalibur Durchflusszytometer	BD Biosciences , Franklin Lakes, New Jersey, USA
MS 2 Minishaker	IKA – Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Varioskan Flash	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
LaminAir HB2448	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland
accuJet pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
HandyStep Pipette	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Eppendorf Research 20µl, 200µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FunctionLine CO_2-Inkubator	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland
Glaspipette 5ml, 10ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 4 – verwendete Geräte

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
Pipettenspitzen, unsteril, 10µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen, 5ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Reagenzröhrchen, 10ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal-Reagiergefäß, 1,5ml, 2ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Parafilm "M" Laboratory Film	Pechiney Plastic Packing, Chicago, USA
96-well Mikrotestplatte	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Peha-Soft, Latex-Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Combitips plus® biopur, 0,5ml, 10ml, 50ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multiwell 24-well Platte	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Tabelle 5 – verwendetes Verbrauchsmaterial

2.1.3 Reagenzien

Name	Hersteller
Dulbecco's PBS w/o Ca+Mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Carboxy SNARF®-1 Acetoxymethyl Ester Acetate (Seminaphtharhodafluor)	Invitrogen Corporation, Grand Island, New York, USA
Dihydrorhodamine 123	Cayman Chemical Company, Michigan , USA

Acetylcholinchlorid, 98+%	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
humaner TNF-α	PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland
Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin (fMLP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Propidiumiodid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Physostigminsalicylat	Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Deutschland
FITC anti-human CD11b	BioLegend, San Diego, California ,USA
FITC anti-human CD62L	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Histopaque-1077	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dextran T500	Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden
NaCl 0,9% B. Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PhosStop (Phosphatase-Inhibitor)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
cOmplete,Mini,EDTA-free,EASYpack (Protease-Inhibitor)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecyl-sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aqua dest.	Laboreigene Herstellung
Pestanal®, (-)-Nikotin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
BD FACSFlow™	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
BD FACSRinse™ Solution	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Endothelial cell growth medium	Provitro GmbH, Berlin, Deutschland
Supplement kit for endothelial cell groth medium, FCS-Kit	Provitro GmbH, Berlin, Deutschland
0,5%Trypsin/EDTA (10x)	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Hank's BSS w/o Calcium/Magnesium, w/o phenol red	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Human Interleukin-1beta	EnzoLifesciences
FITC anti-human CD54	BioLegend, San Diego, California, USA
PE anti-human CD106	BioLegend, San Diego, California, USA
Gentamicin 10mg/ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Gelatine from bovine skin, Type B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

PKC kinase activity kit	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Humane PKC-delta recombinant	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland

Tabelle 6 – verwendete Reagenzien

2.1.4 Puffer-Lösungen

RIPA-Puffer:

- Lösungsmittel: Dulbecco's PBS („phosphat buffered saline")
- 0,1% Natriumdodecylsulfat
- 0,5% Natrium-Desoxycholsäure
- 1% Triton X-100
- Protease-Inhibitor (Dosierung nach Herstellerangaben)
- Phosphatase-Inhibitor (Dosierung nach Herstellerangaben)

RBCL-Puffer:

- Lösungsmittel: destilliertes Wasser
- 0,9% Ammoniumchlorid
- 0,2% Natriumhydrogencarbonat
- 30% EDTA (Ethylendiamintetraacetat)

2.2 Methoden

2.2.1 Probanden

Die neutrophilen Granulozyten wurden gemäß unten stehendem Protokoll aus dem Vollblut von freiwilligen, aufgeklärten Probanden isoliert. Alle Probanden waren männlich, Nichtraucher, Nichtdiabetiker und zum Zeitpunkt der Blutentnahme augenscheinlich gesund. Des Weiteren war die Krankheitsanamnese der letzten 14 Tage negativ. Gleiches galt für die Einnahme von Medikamenten, die zur Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika und den

Antihistaminika gehören. Je Versuchsanordnung wurden zehn Probanden akquiriert, deren Alter zwischen 20 und 26 Jahren lag. Etwaige Abweichungen hiervon werden an den entsprechenden Stellen ausgewiesen.

2.2.2 Getestete Substanzen und Konzentrationen

In dieser Studie wurde die Wirkung von Acetylcholinchlorid, (-)-Nikotin und Physostigminsalicylat untersucht. Bei den Messungen zur Sauerstoffradikalbildung, der CD11b- und der CD62l-Expression kamen folgende finale Konzentrationen zum Einsatz:

	Acetylcholinchlorid	**Physostigminsalicylat**	**(-)-Nikotin**
Konzentration 1	0,1 µM	2,4 µM	1 µM
Konzentration 2	1 µM	9,6 µM	10 µM
Konzentration 3	10 µM	22 µM	100 µM
Konzentration 4	100 µM	88 µM	1000 µM
Konzentration 5	-	-	10000 µM

Tabelle 7 – Übersicht der getesteten Substanzen und Konzentrationen

Während der Versuchsreihen zur CD54- und CD106-Expression an humanen, umbilical-venösen Endothelzellen wurde ausschließlich Acetylcholinchlorid in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM und 1000 µM genutzt. Da die Versuche mit dem ELISA zur Quantifizierung der Proteinkinase C – Aktivität auf den Ergebnissen der vorangehenden Durchflusszytometrie beruhten, fand hier wiederum nur Physostigminsalicylat in den Konzentrationen 2,4 µM, 9,6 µM, 22 µM, 88 µM und zusätzlich 242 µM Anwendung.

Die untersuchten Physostigminkonzentrationen entstammten Versuchen mit neutrophilen Granulozyten am Rattenmodell[107], während die eingesetzten Nikotinmengen auf Publikationen von Pabst et al.[104] sowie Speer[105] basieren. Bei

den Acetylcholin-Versuchen waren uns indes keine Publikationen mit ähnlichem Versuchsaufbau bekannt, daher wurden die eingesetzten Acetylcholin-Mengen frei gewählt und möglichst breit gefächert.
Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Versuche im Doppelansatz durchgeführt.

2.2.3 Isolation der neutrophilen Granulozyten

2.2.3.1 Durchflusszytometrie

Zur Gewinnung von humanem Vollblut wurde den Probanden etwa 15ml Blut aus den antekubitalen Venen entnommen und in drei 5,5ml Lithium-heparinisierten Blutentnahme-Röhrchen gesammelt. Danach wurden je 3ml eines Histopaque®-Gradienten (1077g/ml) mit 3ml des heparinisierten Vollblutes überschichtet und 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem sich eine untere erythrozytenreiche, eine mittlere leukozyten- und lymphozytenreiche sowie eine obere Histopaque-Schicht voneinander getrennt hatten, wurde je 1ml der mittleren Schicht abpipettiert und in einem 5ml FACS-Röhrchen gesammelt. Der Rest wurde verworfen.

2.2.3.2 ELISA

Die Blutentnahme erfolgte analog zu den durchflusszytometrischen Versuchsaufbauten mit dem einzigen Unterschied, dass für die ELISA-Versuche 20ml Blut entnommen wurden.
Es wurden ebenfalls 3ml eines Histopaque®-Gradienten (1077g/ml) mit 3ml des heparinisierten Vollblutes überschichtet, dann allerdings für 45 Minuten bei 4°C und 400x g zentrifugiert. Die beiden oberen Schichten, bestehend aus Plasma und

Monozyten bzw. dem Histopaque®, wurden verworfen und der Rest (vornehmlich Granulozyten und Erythrozyten) in einer 6%igen Dextran-Lösung (aufgelöst in 0,15M NaCl-Lösung) resuspendiert sowie mit weiteren 2ml Dulbecco's PBS (Phosphatpuffer) homogenisiert.
Nach 20 Minuten Inkubation im 37°C Wasserbad wurde der Überstand gesammelt und für 10 Minuten bei 4°C und 270x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2ml RBCL-Puffer („red blood cell lysis puffer") aufgelöst. Nach achtminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurde die Suspension wiederum mit 2ml PBS homogenisiert und für 5 Minuten bei 4°C und 350x g zentrifugiert.
Das Zellpellet wurde daraufhin mit 1ml PBS gewaschen, wiederum zentrifugiert (3 Minuten, 4°C, 350x g) und in 800µl PBS resuspendiert.
Das so gewonnene Granulozyten-Konzentrat wurde nun lysiert. Hierzu wurde es zunächst auf 2ml Eppendorf-Cups verteilt und bei 16200x g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 100µl RIPA-Puffer überschichtet. Nach sorgfältiger Durchmischung mittels eines Vortex, wurde die Lösung einem dreimaligen Einfrier-Auftauzyklus in flüssigem Stickstoff unterzogen.
Zum Schluss wurden die nun lysierten Zellen bei 16200x g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert, die flüssige Phase mitsamt den darin enthaltenen Proteinen abgehoben und bis zur weiteren Verarbeitung bei -86°C eingelagert.

2.2.4 Messung der Sauerstoffradikalbildung

2.2.4.1 Theoretische Grundlagen der Messung

Wie schon beschrieben, gehört die Sauerstoffradikalbildung zu den wichtigsten Abwehrmaßnahmen der neutrophilen Granulozyten. Die durch die NADPH-

Oxidase produzierten Sauerstoffradikale verbinden sich mit intrazellulärem Wasser zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Als Messsubstanz wird das nichtfluoreszierende, zellmembranpermeable Dihydrorhodamin-123 (DHR) eingesetzt. Es wird durch das anfallende Wasserstoffperoxid zu Rhodamin-123 oxidiert – einem bei 488nm Wellenlänge durch Licht anregbaren Fluoreszenzfarbstoff. Hierbei ist das gebildete Rhodamin-123 annähernd proportional zu dem entstehenden Wasserstoffperoxid und somit auch zu den von der NADPH-Oxidase produzierten reaktiven Sauerstoffspezies. Im Vergleich zu 2',7'-Dichlorofluorescindiacetat gilt die Messung der Sauerstoffradikalbildung mittels Dihydrorhodamin-123 als weitaus sensitiver.[106]

2.2.4.2 Ablauf der Messung

Zur Messung der Sauerstoffradikalbildung wurden FACS-Röhrchen mit 950µl Dulbecco's PBS befüllt und anschließend je 20µl leukozytenreiches Plasma hinzupipettiert. Danach wurden je 10µl Dihydrorhodamin 123 (DHR) sowie 10µl SNARF® hinzugefügt und für 10 Minuten in einem 37° C warmen Wasserbad inkubiert. Dies entspricht einer finalen DHR- und SNARF-Konzentration von je 100nmol/l.

In einem nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 10µl der zu testenden Substanz in der entsprechenden Konzentration (s. Abbildung 3) und daraufhin wiederum eine 10-minütige Inkubation im 37°C-Wasserbad. Nach 5 Minuten der Wasserbad-Inkubation wurden der „fMLP plus TNFα"-Gruppe 10µl humaner Tumornekrosefaktor-α (TNFα) hinzugefügt, was die finale TNFα-Konzentration von 10ng/ml ergab.

	Ohne Stimulus		PMA		fMLP		fMLP plus TNFα	
Ohne Testsubstanz	O	O	O	O	O	O	O	O
Konzentration 1	O	O	O	O	O	O	O	O
Konzentration 2	O	O	O	O	O	O	O	O
Konzentration 3	O	O	O	O	O	O	O	O
Konzentration 4	O	O	O	O	O	O	O	O
(evtl. Konzentration 5)	O	O	O	O	O	O	O	O

Abbildung 3 – Schema des Probenansatzes und verwendete Stimulantien

Zuletzt wurden entsprechend Abbildung 3 die jeweiligen Stimuli hinzupipettiert. Die entsprechenden finalen Konzentrationen beliefen sich für PMA und für die beiden Gruppen mit fMLP-Stimulus auf je 100 nM pro Ansatz.

Alle Proben wurden 15 Minuten im 37°C-Wasserbad inkubiert und danach die Reaktion unverzüglich durch Lagerung auf Eis abgestoppt. Nach Zugabe von 10µl Propidiumiodid (finale Konzentration: 150nM) wurden die Proben als Vorbereitung auf die durchflusszytometrischen Messungen bei 400x g und 4°C für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Zellpellet in 200µl Dulbecco's PBS resuspendiert. Im Anschluss erfolgten die FACS-Messungen.

2.2.5 Messung der CD11b- und CD62l-Expression

Die Messung der Oberflächenantigen-Expression erfolgte fast analog zu der oben beschriebenen Vorgehensweise. Es wurden FACS-Röhrchen mit 980µl Dulbecco's PBS befüllt und 20µl des leukozytenreichen Plasmas hinzugefügt. Direkt hierauf erfolgte die Applikation der zu testenden Substanzen nach o.g. Schema und eine 10-minütige Inkubationsphase. Darauf folgend wurden wiederum die Stimuli hinzupipettiert. Auf TNFα wurde jedoch verzichtet, so dass nur PMA sowie fMLP Anwendung fanden. Die Konzentrationen und ebenso die anschließende Inkubationszeit von 15 Minuten orientierten sich an dem Versuchsablauf zur Sauerstoffradikal-Messung.
Im Anschluss wurden alle Proben bei 400x g und 4°C für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 10µl fluorescein-isothiocyanate (FITC)-konjugierte CD11b- bzw. CD62l-Antikörper (je nach Ansatz) zu allen Proben hinzupipettiert und das Zellpellet in Suspension gebracht. Anschließend fand eine 30-minütige Inkubationsphase bei 4°C statt.
Schlussendlich wurden die Proben mit 1ml Dulbecco's PBS verdünnt, bei 400x g für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand wiederum verworfen und das Zellpellet in 200µl PBS resuspendiert. Im Anschluss erfolgten auch hier die FACS-Messungen.

2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS-Messung)

Die Durchflusszytometrie ist eine elektro-optische Messmethode bei der sowohl Lichtstreuung als auch Fluoreszenzen eine Rolle spielen.
Während der Messung werden die Zellproben mittels eines Hüllstroms verdünnt und fokussiert, so dass die Zellen kettenförmig, nacheinander einen Messpunkt passieren. An diesem Messpunkt trifft ein Laserstrahl rechtwinklig auf die Proben. Dies hat zur Folge, dass dieser in einer für viele Zellen charakteristischen

Art und Weise gestreut wird. Hierbei unterscheidet man die Vorwärtslichtstreuung („front scatter“, FSC) und die Seitwärtsstreuung („side scatter“, SSC), welche Auskunft über Zellgröße (FSC) bzw. Zellgranularität (SSC) geben. Zeitgleich erfolgt durch die Belichtung mit dem monochromatischen Licht des Laserstrahls eine Anregung der evtl. verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

Durch die Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe für unterschiedliche Fragestellungen

(s. Tabelle 8) ist es notwendig, die verschiedenen Emissionsspektren aufzutrennen.

Hierzu werden Bandpassfilter und Farbteilerspiegel eingesetzt. Sie leiten die optischen Signale zu Photomultipliern (Detektoren), welche wiederum spezifische Lichtspektren detektieren.

Farbstoff	**Extinktionsmaximum (nm)**	**Emissionsmaximum (nm)**
Fluorescein (FITC)	495	519
Dihydrorhodamin (DHR)	505	534
SNARF	548	587
R-Phycoerythrin (PE)	480, 565	578
Propidiumiodid (PI)	536	617

Tabelle 8 – Übersicht der Fluoreszenzfarbstoffe und ihrer Farbspektren[123]

Dadurch ist es beispielsweise möglich, zwei verschiedenartige Oberflächenproteine gleichzeitig auf einer Zelle sichtbar zu machen. In der Praxis verwendet man bei dieser Fragestellung für Antigen 1 einen Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoff 1 und parallel für Antigen 2 einen Antikörper mit

Fluoreszenzfarbstoff 2. Hierbei können jedoch Probleme auftreten, wenn sich Emissionsspektren überschneiden. Diese kann man aber durch Kompensationsmechanismen weitgehend ausgleichen.

Der Nomenklatur folgend werden die einzelnen Detektoren nach zunehmendem Abstand zum anregenden Wellenlängenbereich geordnet und dementsprechend mit FL1, FL2 und so weiter benannt. FL steht hierbei lediglich für „fluorescent light“. In unserem Fall handelte es sich bei dem Laser um einen Argonlaser mit einem Wellenlängenbereich von 488nm (blau-grün). Der Detektor FL1 war für blaues Licht, FL2 für orangenes und FL3 für das rote Lichtspektrum zuständig.

An die Detektoren ist ein Signalwandler angeschlossen. Hier werden aus den optischen Signalen elektrische Impulse erzeugt und dann, mittels eines mit dem Zytometer verbundenen Computersystems, in multiparametrischen Dateien abgelegt. Dank der direkten Speicherung der reinen Messdaten kann ein Datensatz für unterschiedliche Fragestellungen herangezogen werden.

Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau eines solchen Durchflusszytometers. Hierbei wird der Strahlengang und dessen Aufspaltung in die einzelnen Emissionsspektren deutlich.

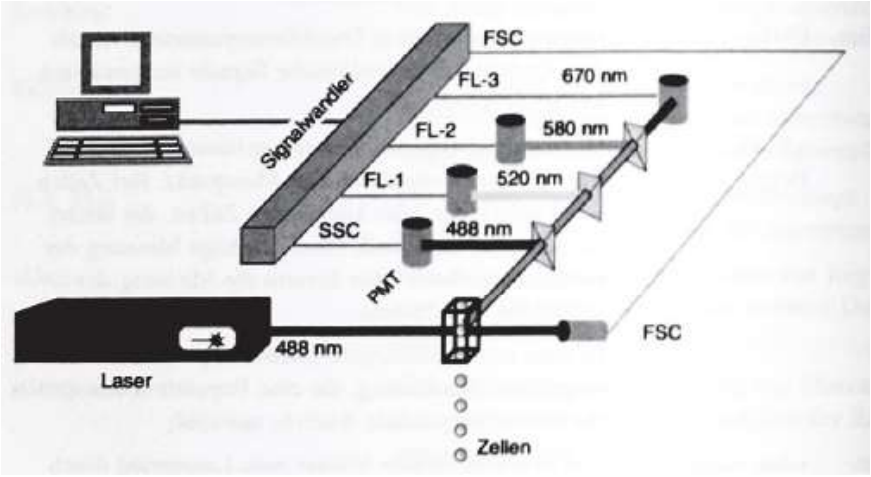

Abbildung 4 – entnommen aus „Zelluläre Diagnostik“ von Ulrich Sack [123]

2.2.7 Quantifizierung der Proteinkinase C – Aktivität

2.2.7.1 Der ELISA

Die Messung der Proteinkinase C – Aktivität erfolgte mittels eines speziellen ELISA-Kits.

ELISA ist die Abkürzung für „enzyme-linked immunosorbent assay“. Hierbei handelt es sich um eine mehrstufige Antigen-Antikörper-Reaktion mit konjugierten Enzymen, deren Substratumsatz schlussendlich photometrisch gemessen und somit indirekt Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene Substratmenge, Enzymaktivität oder ähnliches gezogen werden können. Im Folgenden sei die Funktionsweise des von uns genutzten PKC-Activity KIT erläutert.

Die dem ELISA beiliegende 96-Well Mikrotiterplatte wurde herstellerseitig mit einem phosphorylierbaren Peptid beschichtet. Nach Einpipettieren des zu testenden Materials (Proteinproben) in die Wells, wurde die Reaktion durch Zugabe einer definierten Menge ATP gestartet. Nach einer 90-minütigen Inkubationsphase bei 30°C und kontinuierlichem Schwenken mit 60 Umdrehungen pro Minute, wurde die Mikrotiterplatte gewaschen und dadurch die Reaktion abgestoppt.

Je nach Aktivitätsgrad und Menge des in der Proteinprobe enthaltenen PKC-Anteils, befand sich nun mehr oder weniger phosphoryliertes, immobilisiertes Substrat am Boden der einzelnen Wells.

Im nächsten Schritt wurde die Mikrotiterplatte mit einem Primärantikörper gegen das phosphorylierte Substrat (=Produkt) beimpft und für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken ruhen gelassen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Wells entleert, sowie überschüssige Antikörpermengen durch mehrfaches Spülen entfernt.

Danach wurden die Wells mit einem Sekundärantikörper beschichtet, welcher spezifisch an den zuvor erwähnten Primärantikörper bindet und an dem zusätzlich

ein Enzym konjugiert ist. Bei diesem Enzym handelte es sich um die Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP).

Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und gelegentlichem Schwenken wurden die Wells im Zuge eines mehrmaligen Waschvorganges wieder entleert und Überschüsse weggespült. In den Wells der Mikrotiterplatte befanden sich nun das phosphorylierte, fest an der Platte haftende Substrat, der daran gebundene Primärantikörper sowie der an den Primärantikörper gebundene Sekundärantikörper mitsamt der daran konjugierten HRP. (s. Abbildung 5)

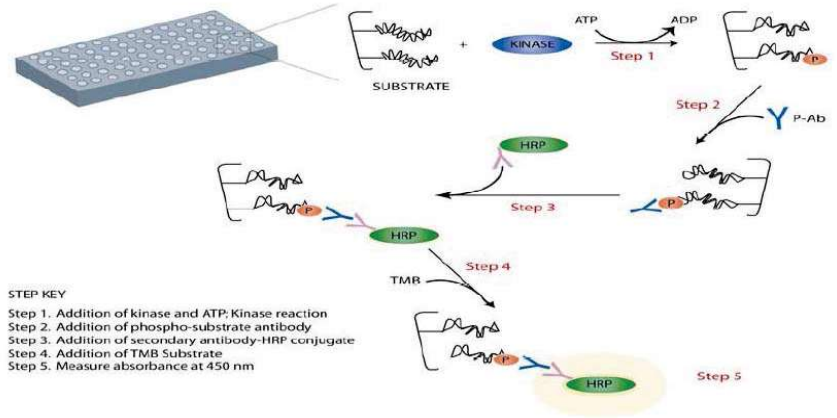

Abbildung 5 – Prinzip des ELISA (Auszug aus beiliegender Bedienungsanleitung der Fa. Enzo Life Sciences GmbH)

Nun erfolgte die Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid - den Substraten der HRP. Das farblose TMB dient hierbei als Elektronendonor für die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser durch die Peroxidase und wurde dadurch selbst zu einem blau-leuchtenden Produkt oxidiert.

Die Reaktion wurde entsprechend der Anleitung nach 30 bis 60 Minuten (je nach Färbungsgrad) mit Schwefelsäure abgestoppt, wodurch sich eine Gelbfärbung ergab, die proportional zu der ursprünglichen PKC-Phosphortransferase-Aktivität war und bei 450nm Wellenlänge photometrisch gemessen werden konnte.

2.2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mittels der BCA-Methode. Hierbei steht BCA für „bicinchoninic acid“ (Bicinchoninsäure) und bezeichnet ein Verfahren, das auf der Biuretreaktion basiert. Dies bedeutet, dass jeweils zwei Peptidbindungen mit einem Cu^{2+}-Ion einen blauvioletten Komplex bilden, sofern eine alkalische Umgebung vorherrscht. Der Komplex kann dann bei 540nm photometrisch gemessen werden.
Um eine Quantifizierung zu erreichen, wurde neben den Proben auch eine Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen gemessen. Diese bestand aus neun Werten und erstreckte sich von null bis zwei Milligramm pro Milliliter. Aus diesen Werten konnte dann eine Kurve erzeugt und die photometrisch gewonnenen Werte der Proben über selbige gelegt werden.
Die eingesetzten Proteinmengen ließen sich nun aus dem verwendeten Volumen (20µl) und den jeweiligen abgelesenen Proteinkonzentrationen errechnen.

2.2.7.3 Probandenproteine

Für den ersten PKC-Versuch wurde isoliertes Protein aus Probandenmaterial (n=8) genutzt. Das Isolationsverfahren ist ausführlich in 2.2.3.a beschrieben.
Der ELISA wurde gemäß den herstellerseitigen Angaben vorbereitet und anschließend pro Probandenprobe zehn Wells mit je 30µl Probenmaterial befüllt. Zusätzlich wurden zwei Wells mit je 30µl der dem Kit beigefügten positiv

Kontrolle (PKCμ) beimpft und zwei weitere Wells als Leerwert frei gelassen. Die Inkubation mit den entsprechenden Physostigminsalicylatkonzentrationen (2,4 – 22 μM, s. 2.2.2.) erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur direkt im jeweiligen Well, wobei zwei Wells je Proband unbehandelt blieben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch ATP-Zugabe gestartet. Alle nachfolgenden Schritte entsprechen dem vorher beschriebenen Ablauf und wurden gemäß Handbuch mit den mitgelieferten Chemikalien durchgeführt.
Parallel zu dem PKC-ELISA fand eine Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA-Messung) statt, um Kenntnis über die eingesetzte Probenmenge zu erhalten. Hierzu wurden alle Probandenproben im Dreifachansatz gemessen.

2.2.7.4 Gereinigte Proteinkinase C - delta

Bei dem folgenden Versuch wurden statt der Probandenproben, welche ein Konvolut verschiedener Enzyme und sonstiger Zellbestandteile enthielten, reine Proteinkinase C des Deltasubtyps verwendet.
Eine BCA-Messung schien uns bei diesem Versuchsaufbau überflüssig, da die Proteinkonzentration der gekauften Proteinkinase vom Hersteller angegeben wurde. Die eingesetzten Proteinmengen betrugen 0,2 , 2 und 20 ng pro Well und wurden vor der ATP-Zugabe mit Physostigminsalicylatkonzentrationen von 2,4 - 88μM für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
Zusätzlich zu dem Leerwert und der Positivkontrolle (im Kit enthalten) wurde Staurosporin eingesetzt. Hierzu wurden pro Proteinmenge je zwei Wells mit 25μg dieses PKC-Inhibitors[124] versetzt und ebenfalls für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
Alle Messungen fanden im Doppelansatz statt.

2.2.8 Versuche mit HUVEC

2.2.8.1 An- und Aufzucht

Die Endothelzellen aus den Umbilicalvenen menschlicher Nabelschnüre wurden uns im kryokonservierten Zustand von der Abteilung für Herz-Thorax-Chirurgie des Universitätsklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt. Deren Extraktion fand mittels Kollagenase nach dem üblichen Protokoll statt[107].
Zunächst wurden für die Anzucht T25-Kulturflaschen verwendet. Da Endothelzellen eine Fläche zum Anhaften benötigen, wurden die Flaschen mit 0,2%iger Gelatine aus Rinderhaut beschichtet, anschließend mindestens eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert und danach der Überstand abgesaugt.
Um die Zellen überhaupt anzüchten zu können, wurden sie kurz im 37°C-Wasserbad angetaut, so dass sie sich aus dem Kryoröhrchen lösen ließen. Danach wurden die gefrorenen Zellen in 4°C warmes Kulturmedium überführt um vollständig aufzutauen. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 400x g und 4°C für 5 Minuten, um das zellschädigende Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen. Der Überstand wurde steril abgesaugt und das Zellpellet in Endothel-Kulturmedium (mit beiliegendem Supplement-Kit versetzt) resuspendiert. Das „Supplement-Kit“ besteht aus mehreren Komponenten und ist jedem verwendeten Endothel-Kulturmedium beigefügt worden.

Konkret besteht das Supplement-Kit aus:
(Konzentrationen pro ml Medium)

- fetales Kälberserum 00.02 ml
- ECGS/H (3 mg/ml) 04.00 µl (endothelial cell growth supplement/Heparin)
- humaner EGF 00.10 ng (endothelial growth factor)
- humaner bFGF 01.00 ng (basic fibroblast growth factor)

- Hydrocortison 01.00 µg
- Gentamicin 50.00 µg
- Amphotericin B 50.00 ng
- L-Glutamin (2mM) 00.02 ml

Nun konnte die Zellsuspension in der vorbereiteten T25-Flasche ausgesät und bei 37°C inkubiert werden. Alle zwei bis drei Tage fand ein Wechsel des Kulturmediums statt.

Sobald circa 80% Konfluenz erreicht waren, wurden die Zellen gesplittet und in zwei ebenfalls gelatinierte T75-Zellkulturflaschen überführt. Hierzu wurde 0,5%iges Trypsin (+0,2% EDTA) in einem 1:10 Verhältnis mit Dulbecco's PBS verdünnt und in die T25-Kulturflaschen gegeben. Sofern sich im Lichtmikroskop eine vollständige Ablösung der Zellen vom Untergrund nachweisen ließ, wurde die gesamte Zellsuspension der Kulturflasche entnommen und sofort für 5 Minuten bei 400x g und 20°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 10ml Kulturmedium resuspendiert und je 5ml zur erneuten Aussaat in die vorbereiteten T75-Kulturflaschen verwand, welche dann wiederum im 37°C Inkubator aufbewahrt wurden. Auch hier fand wiederum alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel statt.

Ab einem einheitlichen Zellrasen von circa 80% Konfluenz wurden die HUVECs wiederum nach obigen Schema aus der T75-Flasche gelöst und nach der Zentrifugation sowie der Resuspension in 10ml Nährmedium in einem 50ml Falcon belassen. Hiervon wurden 10µl entnommen und in eine sog. „Neubauer-Zählkammer" überführt, um Aufschluss über die tatsächliche Zellkonzentration zu erhalten. Hierzu verfügt diese Zählkammer über vier Quadrate mit je 16 kleineren Kästchen. Unter dem Lichtmikroskop werden die Zellen in jeder dieser insgesamt 64 Quadrate kumuliert und durch vier dividiert. Dadurch erhält man einen Mittelwert der vier Hauptquadrate. Diese mittlere Zellzahl wird nun mit dem Faktor Zehn multipliziert und es ergibt sich die Zellzahl pro Mikroliter. Der

Faktor Zehn ergibt sich aus der Fläche von einem Quadratmillimeter für jedes der vier Hauptquadrate und der Kammerhöhe von 0,1mm. Daraus folgt ein Volumen von 0,1µl pro Quadrat.
Da nun die Zellzahl bekannt war, konnte eine vorher ebenfalls gelatinierte 24-well-Platte mit 50000 Zellen pro Well beimpft werden. Nach Zugabe von je 1ml endothelialem Nährmedium, wurden die Zellen für zwei Tage bei 37°C inkubiert.

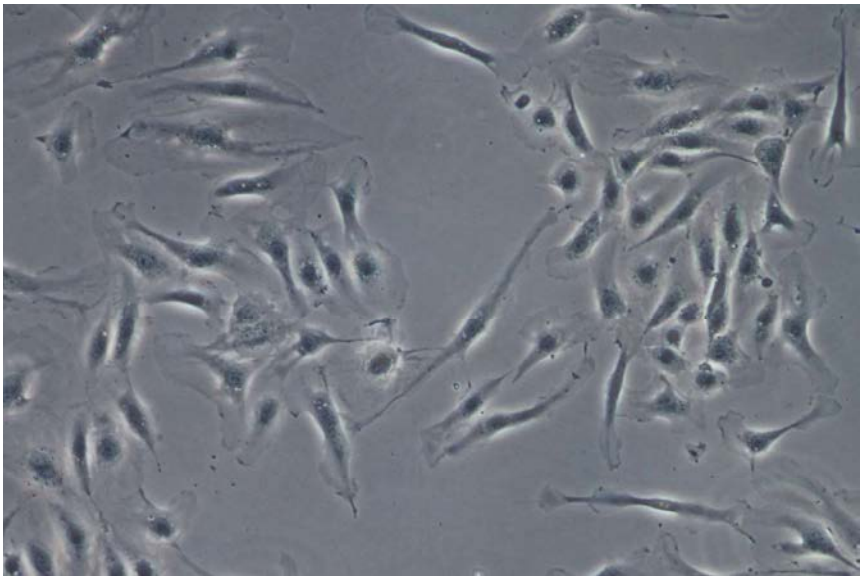

Abbildung 6 – HUVEC unter dem Mikroskop

2.2.8.2 Versuchsdurchführung mit Acetylcholinchlorid

Das Wachstum der HUVEC in den 24-well-Platten wurde lichtmikroskopisch verfolgt und ab einer Konfluenz von 80-90% der Versuch gestartet. Hierzu galt es zunächst, das verbrauchte endotheliale Nährmedium gegen frisches Medium zu ersetzen und anschließend die einzelnen Wells mit verschiedenen Acetylcholinchlorid-Konzentrationen zu beimpfen.

Getestet wurden die Konzentrationen von 0,1µM bis 100µM aufsteigend in Zehnerpotenzen mit drei unterschiedlichen Inkubationszeiten (30, 60, 120 Minuten). Des Weiteren wurden je Inkubationszeit auch zwei unbehandelte Wells vorbereitet. Diesem Schema entsprechend, wurden die HUVEC in den 24-well-Platten dann bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Acetylcholin-belastete Nährmedium entfernt, die Zellen mit Hank's BSS („buffered salt solution") gespült und mit neuem Nährmedium überschichtet.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe von Interleukin 1-beta (finale Konzentration: 50ng/ml) in je zwei Wells pro getesteter Acetylcholinkonzentration sowie den unbehandelten Zellen. Somit verblieben von den ursprünglich vier Wells je Konzentration und Inkubationszeit noch je zwei als unstimulierte Proben. Die HUVEC wurden nun für sechs Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf dieser sechsstündigen Inkubation wurden das Nährmedium entfernt, die Zellen gespült und mit Antikörpern gegen CD54 (ICAM1) sowie CD106 (VCAM) beimpft. Beide Antikörper waren mit Fluoreszenzfarbstoffen (FITC bzw. PE) konjugiert. Die Inkubation fand für 45 Minuten bei 4°C statt. Danach wurden die Zellen wiederum mehrfach gespült um überschüssige Antikörper abzuwaschen.

Im Anschluss wurden die Zellen via Trypsinierung von den 24-well-Platten gelöst, in 5ml FACS-Röhrchen überführt und umgehend bei 400x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Hanks's Buffered Salt-Solution resuspendiert. Zum Schluss erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Oberflächen-expression von CD54 sowie CD106 auf den endothelialen Zellen.

2.2.9 Statistische Analyse

Alle Daten wurden mittels IBM SPSS Statistics Vers. 19 ausgewertet.
Zunächst wurden die Werte der einzelnen Probanden im jeweiligen Untersuchungsaufbau (bzw. eingeteilt nach der zu testenden Substanz) nach verwendeten Stimuli gruppiert. Die einzelnen Gruppen wurden dann via Kolmogorov-Smirnoff-Test auf Normalverteilung und via Levene-Statistik auf Varianz-Homogenität hin untersucht. Bei bestehender Normalverteilung wurde dann eine ANOVA-Testung und im Anschluss der Dunnett-T-Test (Varianzgleichheit) bzw. der Dunnett-T3-Test (Varianzungleichheit) durchgeführt.
Sofern die Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnoff-Tests gegen eine Normalverteilung sprachen, fand der Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrischer Test Anwendung.
Alle Versuche wurden mindestens im Doppelansatz durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Durchflusszytometrie

3.1.1 Physostigminsalicylat

Zunächst betrachten wir die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen von 12 Blutproben in Bezug auf die oben beschriebene Sauerstoffradikalbildung sowie die Antigenexpression nach Physostigmingabe.

Konzentration des Physostigmins	**Stimulus**			
	Leerwert	*PMA*	*fMLP*	*fMLP + TNFα*
Sauerstoffradikalbildung				
0 µM	13,06±3,42	2192,04±325,25	21,31±22,25	89,22±55,95
2,4 µM	12,07±3,04	2166,10±328,10	22,96±22,83	86,36±51,64
9,6 µM	12,44±2,66	2117,73±324,29	20,71±22,58	86,12±50,50
22 µM	12,25±2,58	1974,47±300,40	20,49±21,49	89,39±54,96
88 µM	12,81±2,65	*1799,23±330,73**	23,16±23,63	96,58±59,47
CD11b				
0 µM	21,56±11,14	76,41±16,08	35,25±19,13	
2,4 µM	19,88±14,23	72,02±13,54	32,92±18,92	
9,6 µM	20,63±14,95	71,34±19,74	34,03±19,14	
22 µM	17,45±9,06	68,60±16,73	34,41±19,14	
88 µM	17,66±9,68	63,66±20,97	34,96±21,25	
CD62l				
0 µM	197,72±20,95	6,07±1,48	33,87±19,99	
2,4 µM	202,60±24,51	5,83±1,27	35,26±21,49	
9,6 µM	202,64±23,29	6,22±1,76	37,46±23,65	

22 µM	201,53±29,73	5,62±1,12	32,46±19,12	
88 µM	200,74±31,68	5,45±0,71	30,69±19,93	

Tabelle 9 – Mittelwerte und dazugehörige Standardabweichung (Angaben in MESF), * $p<0,05$ vs. Leerwert

Nach Auswertung der Messergebnisse konnten weder für die CD11b- noch für die CD62l-Expression signifikante Veränderungen unter Physostigmin-Einfluss festgestellt werden ($p>0,05$). Die Sauerstoffradikalbildung muss jedoch differenzierter betrachtet werden. In Abwesenheit eines Stimulus sowie nach Gabe von fMLP und TNFα zeigten sich hier zwar ebenfalls keine signifikanten Auswirkungen der Physostigmingabe, jedoch wies Physostigminsalicylat einen konzentrationsabhängigen Effekt auf PMA-stimulierte Granulozyten auf.
Die Varianzanalyse (ANOVA) förderte hierbei signifikante Ergebnisse zu Tage ($p=0,023$). Der anschließende post-hoc-Test bezüglich der Non-Verumgruppe gegenüber der Gruppe mit 88 µM Physostigmin ergab $p=0,007$.

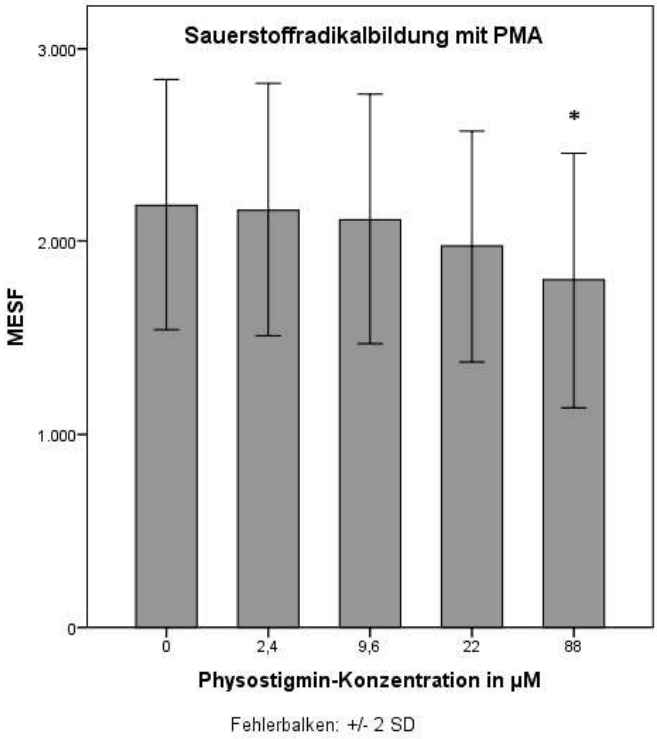

Abbildung 7 – Einfluss von Physostigminsalicylat auf die Sauerstoffradikal-bildung nach PMA-Stimulus, *p<0,05 vs. Leerwert

3.1.2 Acetylcholinchlorid

Nach der Gabe von Acetylcholinchlorid in Kombination mit PMA zeigte sich zunächst eine leichte Zunahme der Sauerstoffradikalbildung gegenüber der nur mit PMA stimulierten Zellen. Dieser Anstieg hatte seinen Gipfel bei 1 µM und fiel danach wieder bis auf das Ausgangsniveau ab. (0 µM vs. 1 µM: p=0,029) Sowohl bei den unstimulierten Zellen als auch bei Zellen, welche unter Einfluss der weiteren getesteten Stimulantien standen, konnte kein Effekt der

Acetylcholinchloridgabe auf die Sauerstoffradikalbildung nachgewiesen werden ($p>0,05$).

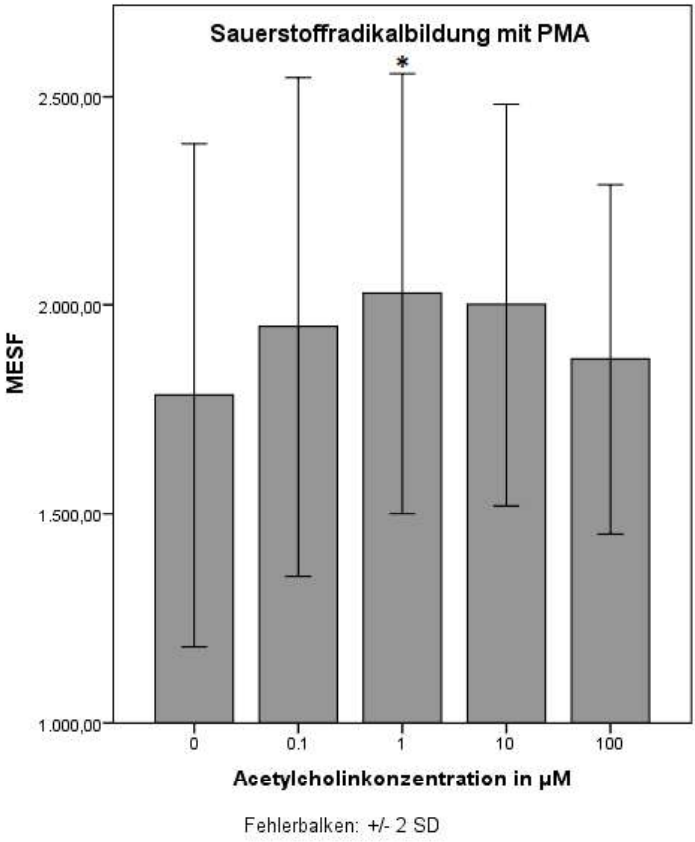

Abbildung 8 – Einfluss von Acetylcholinchlorid auf die Sauerstoffradikalbildung nach PMA-Stimulus, *$p<0,05$ vs. Leerwert

Die Betrachtung der Antigenexpression unter Acetylcholin-Einfluss erbrachte ebenfalls keinen Hinweis auf signifikante cholinerge Intervention. Weder die unstimulierten noch die PMA und fMLP-stimulierten Granulozyten zeigten diesbezüglich messbare morphologische Veränderungen.

3.1.3 Nikotin

Der Versuchsaufbau mit Nikotin als zu testende Substanz umfasste 12 Probandenproben. Hierbei zeigte sich, dass Nikotin ab einer Konzentration von 1000 µM Veränderungen in der Sauerstoffradikalbildung bewirkt. (s. Abb. 9 bis 12)

Die Antigenexpression von CD11b und CD62l wurde erst bei einer Konzentration von 10.000 µM signifikant beeinflusst. (s. Abb 13 u. 14)

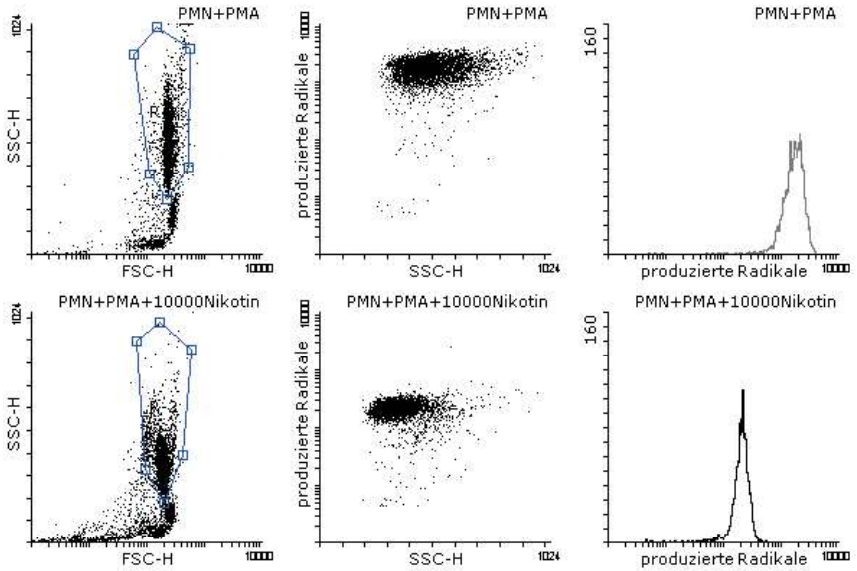

Abbildung 9 – Einfluss von 10.000µM Nikotin auf die Sauerstoffradikalbildung nach PMA-Stimulus anhand zweier repräsentativer Proben

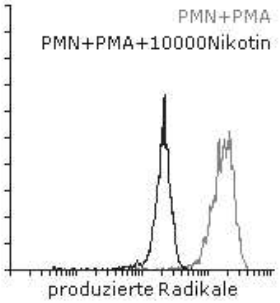

Abbildung 10 – Overlay-Histogramm der beiden repräsentativen Proben

Die Sauerstoffradikalbildung nach PMA-Stimulation zeigte unter Einfluss von 1000 µM Nikotin eine Reduktion der Radikalbildung von ca. 27% gegenüber dem Leerwert. Eine weitere Erhöhung auf 10.000 µM bewirkte einen Abfall um ca. 90%. ($p=0,008$ bzw. $p<0,001$). Die vorangehende Varianzanalyse (ANOVA) ergab dementsprechend ebenfalls ein signifikantes Ergebnis ($p<0,001$). (s. Abb. 11)

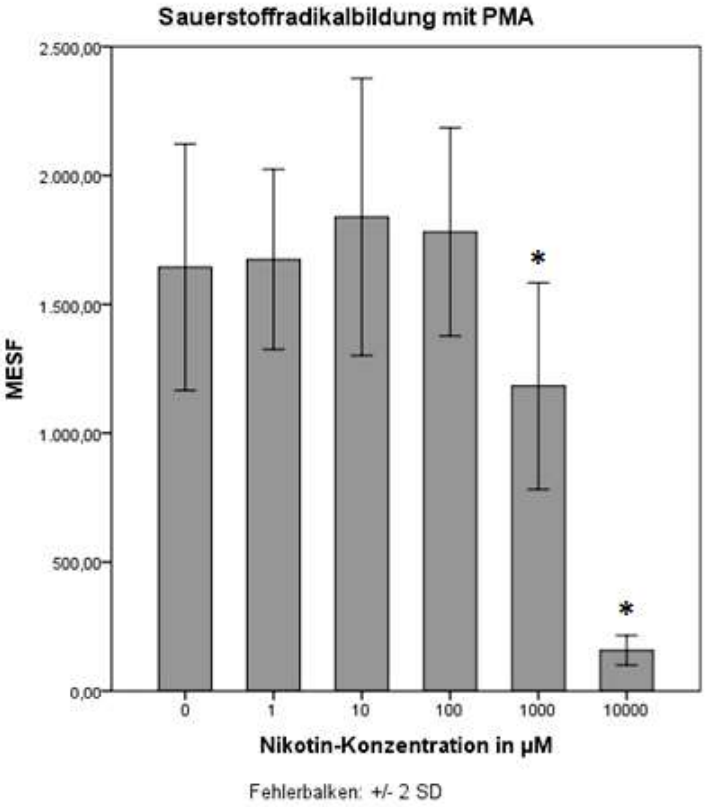

Abbildung 11 – Einfluss steigender Nikotinkonzentrationen auf die Sauerstoffradikalbildung nach PMA-Stimulus, *p<0,05 vs. Leerwert

Die Radikalbildung der anderen Versuchsaufbauten wurden ebenfalls ab einer Gabe 10.000 µM Nikotin beeinflusst. Ohne jeglichen Stimulus erhöhte sich die Sauerstoffradikalbildung um 463%, mit fMLP-Stimulus um 427% in Bezug auf die nikotinfreie Probe. Keinen messbaren Einfluss auf die Sauerstoffradikalbildung zeigte Nikotin bei der kombinierten Gabe von TNFα und fMLP. (s. Abb. 12)

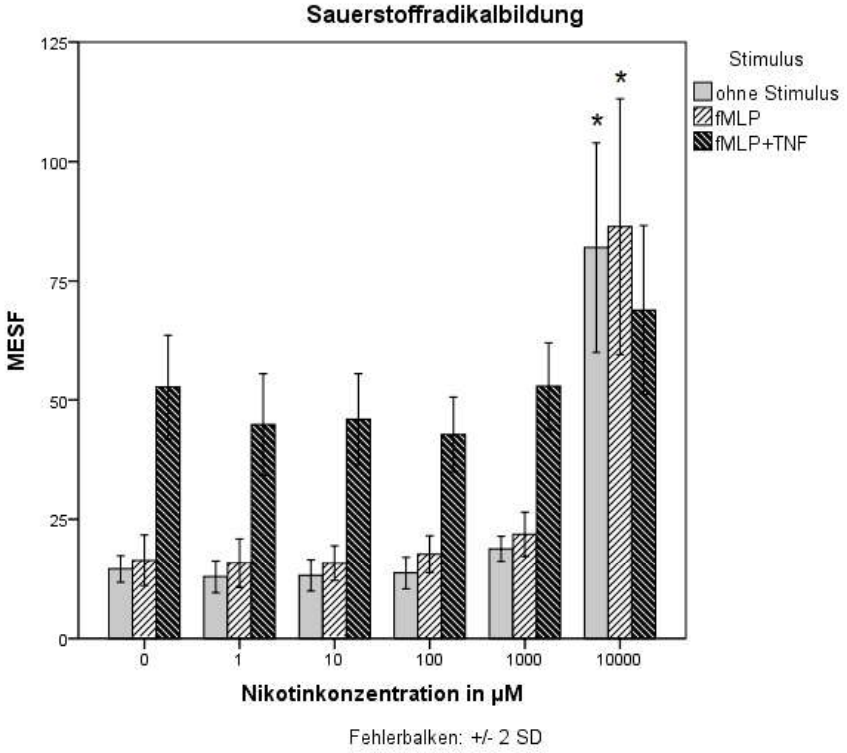

Abbildung 12 – Einfluss steigender Nikotinkonzentrationen auf die Sauerstoffradikalbildung nach Gabe verschiedener Stimuli, *p<0,05 vs. Leerwert

In einem nächsten Schritt wurde die Antigenexpression von CD11b und CD62l untersucht.

Hier zeigte sich bei der PMA-stimulierten Zellpopulation ab einer Nikotinkonzentration von 10.000 µM eine Reduktion der CD11b-Dichte um ca. 28% (p=0,008) bzw. um ca. 47% (p=0,013) bei den fMLP-stimulierten Granulozyten im Vergleich zu der Non-Verum-Gruppe. (s. Abb. 13) Die wiederum zuvor durchgeführte Varianzanalyse (ANOVA) ergab auch hier

statistisch signifikante Unterschiede der gemessen Werte. (p=0,021 respektive p=0.028). Unstimulierte Zellen blieben hingegen weitgehend unbeeinflusst (p>0,05).

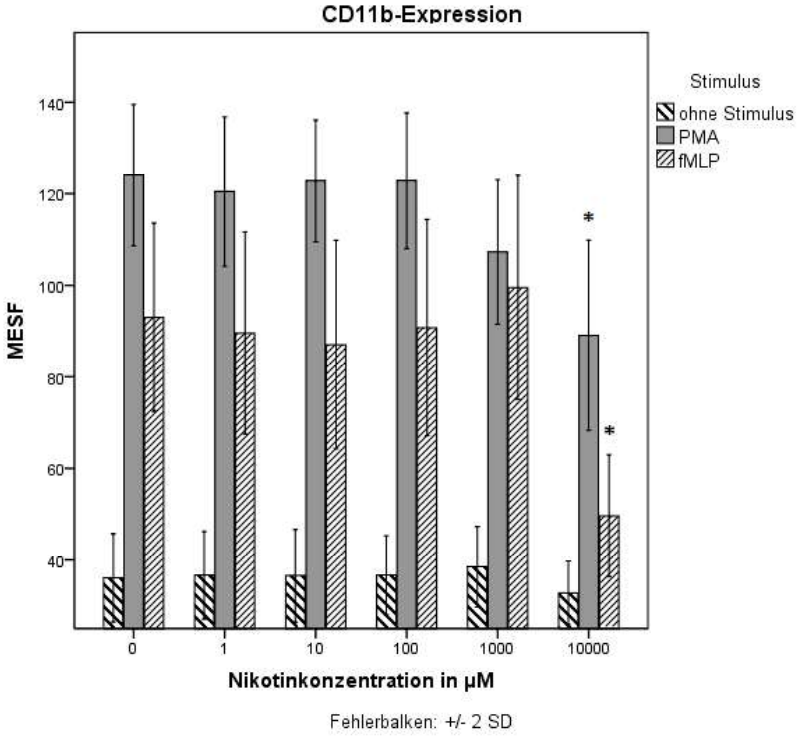

Abbildung 13 – Einfluss steigender Nikotinkonzentrationen auf die CD11b-Expression nach Gabe verschiedener Stimuli, *p<0,05 vs. Leerwert

Ein diffuseres Bild zeigte sich bei der CD62l-Expression (s. Abb. 14). Hier nahm die Antigendichte ab 10.000 µM an den unstimulierten Zellen um 11% ab (p=0,024) und stieg bei der fMLP-stimulierten Population um 128% (p=0,034) an. PMA-stimulierte Neutrophile zeigten hingegen keine nennenswerten Veränderungen.

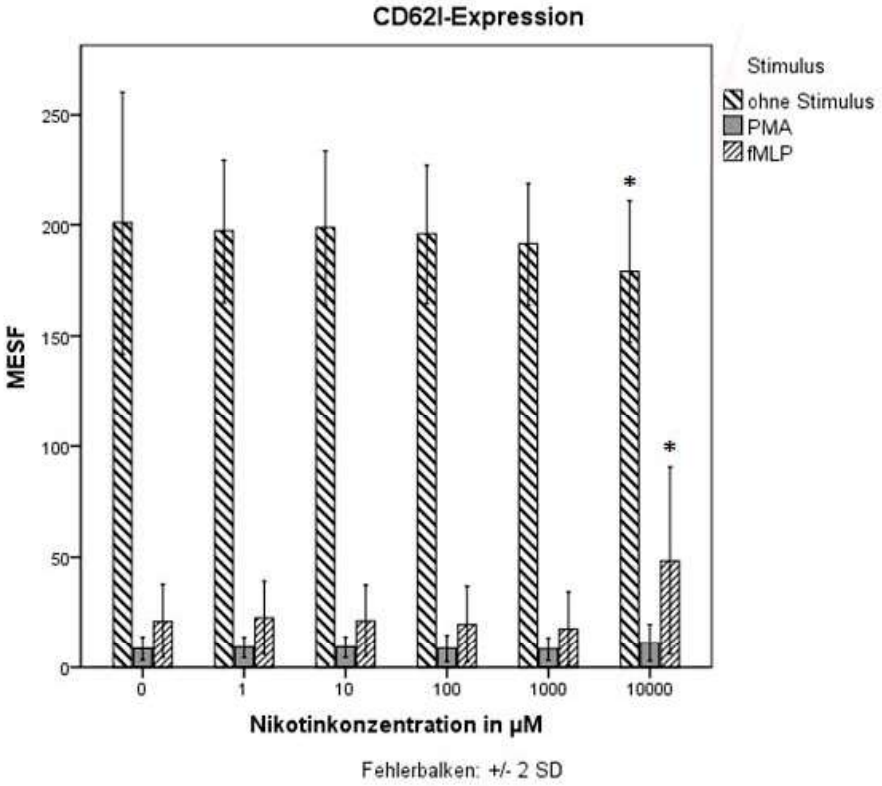

Abbildung 14 – Einfluss steigender Nikotinkonzentrationen auf die CD62l-Expression nach Gabe verschiedener Stimuli, *p<0,05 vs. Leerwert

3.1.4 Anteil toter Zellen

Parallel zu den Größen „Sauerstoffradikalbildung“ und „Antigenexpression“ wurde auch der Anteil an toten Zellen an der Gesamtpopulation gemessen. Die toten Zellen wurden hierfür mit Probidiumjodid markiert.
Das Spektrum dieses Fluoreszenzfarbstoffes unterscheidet sich deutlich von DHR und FITC, so dass Überlagerungen gut kompensiert werden können.

Hierbei ergaben sich weder für die Acetylcholinchlorid- noch für die Physostigminversuche Besonderheiten. Der Anteil an toten Zellen blieb über alle Konzentrationen auf einem weitgehend konstant niedrigen Niveau (≤1%). Der Nikotin-Versuchsaufbau hingegen zeigte einen deutlichen Anstieg an toten Zellen ab einer Konzentration von 10.000 µM ($p<0,001$). Im Vergleich zu der Non-Verum-Gruppe als Bezugspunkt erhöht sich die Fraktion letaler Zellen an der Gesamtpopulation bei unstimulierten Zellen im Mittel um das 6,7fache, fMLP+TNFα -stimulierte um das 16,7fache, bei PMA-behandelten Zellen um das 5,4fache und die Letalität bei der fMLP-Population gar um das 17,9fache. (s. Abb. 15)

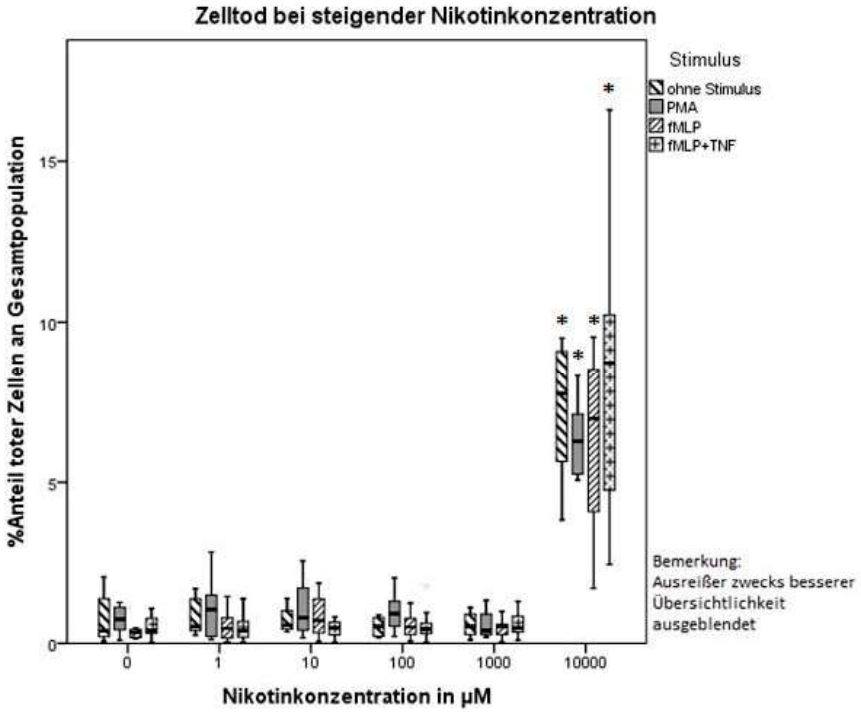

Abbildung 15 – Einfluss steigender Nikotinkonzentrationen auf die Zellletalität nach Gabe verschiedener Stimuli, *$p<0,05$ vs. Leerwert

3.1.5 Acetylcholinwirkung auf HUVEC-Antigenexpression

Bei der Untersuchung der humanen umbilicalvenösen Endothelzellen lag der Fokus unserer Messungen auf der Expression von CD54 und CD106. Hierbei zeigten sich weder im IL-1-stimulierten, noch im unstimulierten Zustand Veränderungen in der Expressionsdichte. Die Variation der Inkubationszeiten (30min, 60min, 120min) ließ ebenfalls keinen Effekt erkennen ($p>0,05$).

3.2 Proteinkinase C – ELISA

3.2.1 Probandenproteine

Um eine Auswertung zu ermöglichen, wurden die aus der BCA-Testung ermittelten Proteinmengen pro Proband auf den größten Wert normiert und die gemessenen Werte des PKC-ELISAs entsprechend interpoliert. Dadurch war es möglich, für die anschließende statistische Auswertung der Messergebnisse eine identische Menge des eingesetzten Gesamtproteins anzunehmen. Bestehende Fehlerquellen des Versuchsaufbaus werden nachfolgend in der Diskussion besprochen.
Die gemessenen Werte des PKC-ELISA befanden sich trotz zunehmender Physostigminkonzentration alle auf dem annähernd selben Niveau ($p>0,05$).

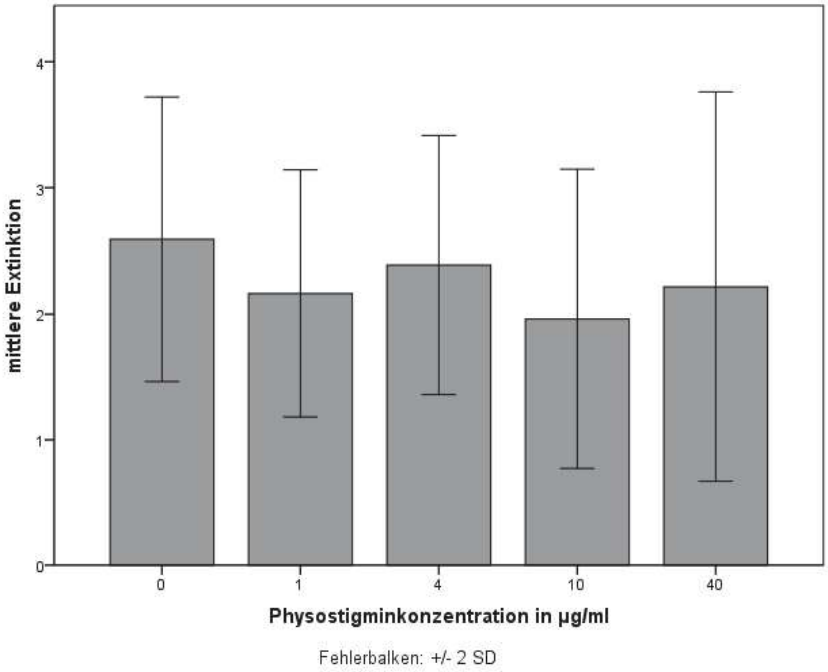

Abbildung 16 – Kein messbarer Einfluss steigender Physostigminkonzentrationen auf die PKC-Aktivität der getesteten Proteinproben aus neutrophilen Granulozyten

3.2.2 Gereinigte Proteinkinase C - delta

Verschiedene Physostigminkonzentrationen wurden mit drei unterschiedlichen Mengen an reiner Proteinkinase C - delta untersucht. Staurosporin stellte die Negativprobe dar, um die Funktionsfähigkeit des Versuchsaufbaus sicherzustellen.

Über alle eingesetzten Protein- und Physostigminmengen hinweg wurden keinerlei signifikante Unterschiede in der PKC-Aktivität nachgewiesen. Die gemittelten Photometrie-Ergebnisse der einzelnen Physostigmingruppen waren bei gleicher Proteinkinase C - Menge annähernd gleich ($p>0.05$).

Die mit 25µg Staurosporin behandelten Wells erbrachten eine geringere Extinktion. Die statistische Auswertung der Messergebnisse bezüglich des Einflusses von Staurosporin auf die Aktivität der eingesetzten 0,2ng reine PKC - delta ergab p=0,16. Bei ansteigenden Proteinmengen ergab die Signifikanztestung jedoch statistisch-signifikante Ergebnisse: p=0,016 bzw. p<0,01. Somit ist die Negativprobe erfolgreich und das Testprinzip valide.

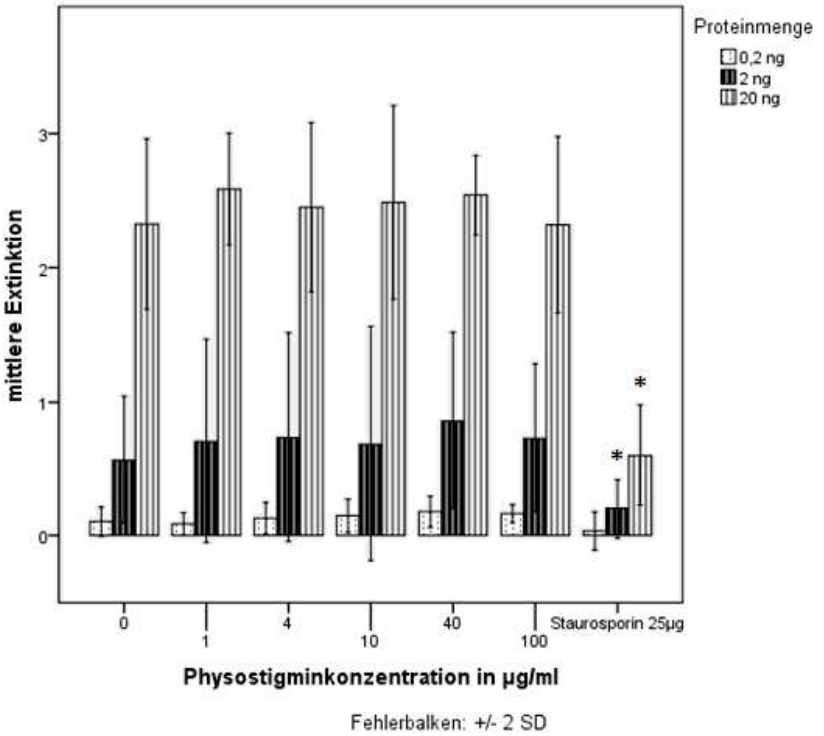

Abbildung 17 – Kein Einfluss steigender Physostigminkonzentrationen auf die PKC-Aktivität der reinen PKC-delta, Negativprobe erfolgreich, *p<0,05 vs. Leerwert

4 Diskussion

4.1 Durchflusszytometrie

4.1.1 Physostigminsalicylat

In den durchflusszytometrischen Messungen zeigte sich bei unseren Untersuchungen an neutrophilen Granulozyten eine signifikante Reduzierung der Sauerstoffradikalbildung ab Konzentrationen von 88 µmol/l Physostigminsalicylat. Jedoch blieb die CD62l- und CD11b-Antigenexpression in unserem Versuchsaufbau unbeeinflusst.

Bitzinger et al. beobachteten an murinen Zellen ebenfalls eine verminderte Sauerstoff-radikalbildung unter Physostigmineinfluss. Für Neostigmin konnte dieser Effekt hingegen nicht nachgewiesen werden.[108] Hofer et al. veröffentlichten 2008 Untersuchungsergebnisse, die eine Aktivierung des CAP durch die Gabe von Cholinesterasehemmern beschrieben und daraus resultierend eine verminderte Sepsisletatlität im Mausmodel nachweisen konnten.[109] Somit finden sich in der Literatur ebenfalls Hinweise für die immunmodulatorische Wirkung von Physostigmin, wenngleich diese sich auf murine Zellen beziehen.

In Hofers Versuchsaufbau wurden neben der Überlebensrate des septischen Mausmodells nach Gabe von Physostigmin, Neostigmin oder Nikotin auch die Serumspiegel proinflammatorischer Interleukine und des Tumornekrosefaktor-alphas (TNFα) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass alle drei Wirkstoffgaben neben der signifikant verringerten Sepsisletalität auch eine signifikant verminderte systemische Zytokinausschüttung zur Folge hatten. Somit können unsere Beobachtungen der verminderten Sauerstoffradikalbildung zwar nur als Teilaspekt in einem komplexen Zusammenwirken verschiedener immunologischer Systeme verstanden werden, fügen sich aber gut in dieses ein und werden dadurch weiter bekräftigt.

Als Neuerung ist hierbei hervorzuheben, dass Physostigmin auch unabhängig von neuronalen Einflüssen und retikulären Organen (insbesondere der Milz) zu einer Immunmodulation am neutrophilen Granulozyten führt. Weiterhin unbekannt bleibt jedoch der pharmakodynamische Aspekt des Physostigmins, der zu den von uns erhobenen Ergebnissen führt. Unsere Untersuchungen zu dieser Fragestellung werden nachfolgend unter 4.2. diskutiert.

4.1.2 Nikotin

Unsere Untersuchungen zu einem immunmodulatorischen Einfluss von Nikotin auf neutrophile Granulozyten zeigten eine Hemmung der Sauerstoffradikalbildung unter PMA-Stimulation ab einer Nikotinkonzentration von 1000 µM. Bei fMLP-behandelten und unstimulierten Zellen beobachteten wir hingegen einen Anstieg der Sauerstoffradikalbildung. Die CD62l-Expression wurde ebenfalls paradox beeinflusst. So stellten wir an unstimulierten Zellen eine Abnahme und an fMLP-stimulierten Zellen eine Zunahme der CD62l-Expressionsdichte fest. PMA- und fMLP-behandelte Zellpopulationen wurden zudem durch die Gabe von Nikotin in der CD11b-Expression gehemmt. Alle Ergebnisse der Expressionsmessungen wurden erst ab einer Nikotinkonzentration von 10.000 µM statistisch signifikant. Bei dieser hohen Nikotinkonzentration beobachteten wir zudem eine erhöhte Zellsterblichkeit der getesteten Zellpopulation, unabhängig von der Zugabe bzw. Art eines etwaigen Stimulus.
In der Literatur finden sich ebenfalls schon einige Arbeiten zu nikotinergen Modulationen von Immunzellen. So veröffentlichten 1995 Pabst et al. Ergebnisse ihrer Nikotinversuche. Hierbei beschrieben sie die Hemmung der Sauerstoffradikalbildung am unstimulierten neutrophilen Granulozyten bei Konzentrationen von 6,2 mM und 18,6 mM Nikotin.[103] Des Weiteren zeigten Speer et al. 2002, dass nikotinbehandelte Granulozyten eine verminderte CD11b- und CD62l-Expression aufweisen.[104] Im Gegensatz zu der publizierten

Hemmwirkung von Nikotin auf neutrophile Granulozyten, beobachteten 1986 Jay et al. eine Potenzierung der PMA- und fMLP-vermittelten Sauerstoffradikalbildung durch Nikotin[127], während durch alleinige Gabe von Nikotin ohne weiteren Stimulus kein Anstieg in der Radikalbildung verzeichnet werden konnte. Allerdings wurden bei all diesen Versuchen Granulozyten verwendet, die aufgrund zahlreicher Zentrifugationsvorgänge beim Aufreinigungsprozess hochgradig mechanisch stimuliert waren. Eine Stimulation über rezeptorvermittelte bzw. intrazelluläre Signalwege mittels fMLP oder PMA fand bei Pabst und Speer hingegen nicht statt. Des Weiteren untersuchte die Arbeitsgruppe um Speer lediglich die Konzentrationen 1µM und 10µM in dieser speziellen Fragestellung.

Unser Versuchsaufbau isoliert die Zellpopulation der neutrophilen Granulozyten aus humanem Vollblut über den eingangs beschriebenen Sedimentationsvorgang mittels eines Stärkegradienten. Daher beinhaltete das von uns angewandte Separationsverfahren keine Zentrifugationsvorgänge, so dass die gewonnene Zellpopulation kaum mechanisch stimuliert wurde (vgl. Bitzinger et al.[126]) und somit eine bessere Vergleichbarkeit zwischen pharmakologisch stimulierten und unstimulierten Granulozyten gegeben ist. Ein weiterer Unterschied findet sich in der Art der Messmethodik bezüglich der Sauerstoffradikalbildung. So nutzten die genannten Autoren die ältere Methodik der Cytochrom c - Reduktion als indirekten Parameter zur Erfassung der gebildeten Sauerstoffradikale. Bei unserer Methodik handelt es sich um einen durchflusszytometrischen Ansatz, dem eine hohe Sensitivität zugesprochen wird.[105]

Bei unseren Versuchen zeigten sich, mit Ausnahme der PMA-induzierten Sauerstoffradikalbildung, erst ab einer Konzentration von 10.000 µM nikotinvermittelte Effekte auf die getesteten Parameter. Diese müssen allerdings kritisch hinterfragt werden. Beachtet man nämlich den schlagartigen Anstieg des Anteils an toten Zellen an der Gesamtpopulation ab einer Nikotinkonzentration von 10.000 µM, relativieren sich die beobachteten Effekte (vgl. Abb. 15), da auch

die vitalen Zellen eine Schädigung erfahren und sich diese auf deren immunologische Funktion ausgewirkt haben könnte. Die reduzierte Sauerstoffradikalbildung, die Pabst et al. beschrieben haben, könnte daher ebenfalls auf zelltoxische Effekte des Nikotins zurückgeführt werden. Gegen eine rein toxische Wirkung des Nikotins als immunmodulierenden Faktor der neutrophilen Sauerstoffradikalbildung spricht jedoch, dass bei unseren Untersuchungen zur PMA-induzierten Sauerstoffradikalbildung unter Nikotineinfluss auch schon ab einer Nikotinkonzentration von 1.000 µM eine signifikante Hemmung beobachtet werden konnte. In diesem Bereich war der Anteil toter Zellen an der Gesamtpopulation nicht erhöht. Dennoch kann eine geringgradige Zellschädigung nicht sicher ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend erscheint eine pharmakodynamische Wirkung des Nikotins am α7nACh-Rezeptor, welcher als pharmakologisches Target des cholinergen anti-inflammatorischen Signalweges identifiziert wurde, als Grundlage der Hemmung der Sauerstoffradikalbildung von neutrophilen Granulozyten unwahrscheinlich.[80,128] Hierfür sprechen zum einen unsere Versuche, welche ausschließlich die PMA-induzierte Sauerstoffradikalbildung durch nicht-letale Nikotinkonzentrationen beeinflussen konnten und zum anderen die veröffentlichten Studien von Jay et al.[127] sowie Kawashima et al.[95,113]

Die beobachtete Hemmung der PMA-abhängigen Sauerstoffradikalproduktion beruht somit am ehesten auf intrazellulären Phänomenen. Denn PMA ist ein membrangängiger intrazellulärer Stimulus, welcher an der Proteinkinase C wirkt, während unsere Versuche mit fMLP, ein Stimulus der mit entsprechenden Oberflächenrezeptoren der Zelle interagiert, erst im zelltoxischen Bereich einen statistisch signifikanten Nikotineinfluss nachweisen konnten. Gestützt wird die Hypothese des intrazellulären Wirkmechanismus durch die Beobachtungen von Jay et al.. Die gemessenen Effekte der PMA- bzw. fMLP-stimulierten Sauerstoff-radikalbildung am neutrophilen Granulozyten durch Nikotin, konnten in der damals durchgeführten Studie weder mittels Atropin noch durch Hexamethonium

blockiert werden.[127] Da Atropin ein selektiver Antagonist an muskarinergen Acetylcholinrezeptoren ist, bleibt der viel beschriebene CAP-relevante α7nACh-Rezeptor zwar unbeeinflusst. Beim Hexamethonium stellt sich die Sache jedoch anders dar. Dieser selektive Antagonist wirkt an neuronalen, nikotinergen Acetylcholinrezeptoren und schließt somit den α7nACh-Rezeptor in sein Wirkspektrum mit ein. Sofern nun eine Verbindung zwischen dem beobachteten Phänomen und diesem Rezeptor bestehen würde, sollte Hexamethonium zu einer Aufhebung der nikotinvermittelten Effekte führen. Da dies jedoch nicht der Fall war, müssen auch andere Wirkmechanismen, also beispielsweise ein intrazelluläres pharmakologisches Target des Nikotins, als ursächlich erachtet werden. Einen weiteren Hinweis auf ein intrazelluläres cholinerges System lieferten Kawashima et al. ab dem Jahr 2000. Er beschrieb ein vollständiges cholinerges System bestehend aus Cholinacetyltransferase (Aufbau), Cholinesterase (Abbau), hochaffine Cholintransporter sowie intrazellulären Acetylcholinrezeptoren und Acetylcholin.[94,95,113]

Obwohl unsere Untersuchungen mit ähnlichen Nikotinkonzentrationen abliefen (0,1μM - 100μM respektive 1μM – 10.000μM), konnten wir die von der Arbeitsgruppe um Jay beschriebene Potenzierung der Sauerstoffradikalbildung nicht reproduzieren. Dies könnte auf der unterschiedlichen Methodik, insbesondere mit Blick auf die verschiedenen Separationstechniken und den damit verbundenen Zentrifugationsvorgängen beruhen.

Aufgrund der zelltoxischen Wirkung von Nikotin und eben jener unterschiedlichen methodischen Ansätze aller aufgeführten Untersuchungen, ist eine abschließende Aussage zu einem immunmodulatorischen Effekt von Nikotin auf neutrophile Granulozyten nur eingeschränkt möglich. Dennoch erscheint eine nikotinvermittelte Hemmung der Sauerstoffradikalbildung ab einer hohen Konzentration von 1 mM über intrazelluläre Wirkmechanismen statt über Oberflächenrezeptoren durchaus wahrscheinlich. Dabei werden unsere Ergebnisse durch eine Studie von Matthews et al. (2011)[109] unterstützt, bei der bis

zu einer Nikotinkonzentration von 62 µM kein Einfluss von Nikotin auf die Sauerstoffradikalbildung nachzuweisen war. Die Effekte höher dosierter Nikotingaben liegen hingegen am ehesten in der Zellschädigung und dem damit einhergehenden Funktionsverlust begründet.

4.1.3 Acetylcholinchlorid

4.1.3.1 Neutrophile Granulozyten

In unseren Untersuchungen beobachteten wir, dass die PMA-induzierte Sauerstoffradikalbildung zwischen Acetylcholinkonzentrationen von 0,1 – 1 µM zunächst signifikant anstieg und dann ab Konzentrationen von 10 µM wieder kontinuierlich, bis fast auf das Ausgangsniveau des Leerwertes, abfiel. Ein anderes Bild zeigte sich in Bezug auf die Antigenexpression der neutrophilen Granulozyten. Die Versuchsaufbauten mit PMA-Stimulation konnten keine immunmodulatorische Wirkung von Acetylcholinchlorid auf die Expression von CD62l und CD11b nachweisen.

In der Literatur finden sich in einem 2007 veröffentlichten Artikel von Neumann et al. Ergebnisse zu einem cholinergen Effekt auf die Sauerstoffradikalbildung und Leukozyten-Endothel-Interaktion von neutrophilen Granulozyten.[129] Hier wurde durch die Blockade von nikotinergen Rezeptoren mittels Tubocurarin ein Anstieg der Rate an spontaner Migration von Granulozyten durch das Endothel beobachtet. Jedoch blieb die Sauerstoffradikalbildung durch die singuläre oder kombinierte Verwendung von Acetylcholinrezeptor-Antagonisten, welche entweder muskarinerge (Atropin) oder nikotinerge (Tubocurarin) Acetylcholinrezeptoren blockierten, unbeeinflusst. Auf der anderen Seite zeigten Vukelic et al. 2010, dass Acetylcholinkonzentrationen von 10 mM eine signifikante Hemmung der granulozytären Superoxidanion-Bildung nach Stimulierung mit C5a zur Folge haben.[111] Oldenburg et al. beschrieben 2002 einen

Anstieg der mitochondrialen Sauerstoffradikalbildung nach Applikation von 2 nM Acetylcholin in glatten Muskelzellen der Gefäßwand.[112]

Angesichts unserer Ergebnisse und den Beschreibungen in der Literatur scheint Acetylcholin eine ambivalente Wirkung auf die Sauerstoffradikalbildung zu besitzen. So wirkt es in Konzentrationen bis 1 µM fördernd und in höheren Konzentrationen eher hemmend auf die Produktion von Sauerstoffradikale.[103]

Als nächstes drängt sich die Frage nach den unterschiedlichen Beobachtungen bei Nikotin- und Acetylcholingabe auf. Da Acetylcholin sowohl an muskarinerge als auch an nikotinerge Rezeptoren und somit auch an den gut untersuchten nikotinergen alpha7-Rezeptor bindet, sollten ähnliche Ergebnisse zu erwarten sein. Doch während die alleinige Gabe von Nikotin bei zunehmenden Konzentrationen einen hemmenden Effekt auf die Sauerstoffradikalbildung der neutrophilen Granulozyten hat, bewirkt Acetylcholin in unseren Versuchen eher einen Anstieg.

Neutrophile Granulozyten besitzen sowohl muskarinerge als auch nikotinerge Rezeptoren [99,101,130], so dass die unterschiedlichen Ergebnisse ohne weiteres mit der zusätzlichen Stimulation muskarinerger Acetylcholinrezeptoren durch Acetylcholin, als universalen Agonisten, erklärbar wären. Eine Studie von Profita et al. legt ebenfalls den Verdacht nahe, dass muskarinerge Rezeptoren bzw. die Stimulation selbiger via Acetylcholin eine erhöhte granulozytäre Aktivität zur Folge haben.[97] Zwar zeigten Jay et al, dass die selektive Blockade eines Acetylcholinrezeptor-Subtyps mittels Atropin und Hexamethonium keinerlei Auswirkungen auf die Sauerstoffradikalbildung unter PMA- oder fMLP-Einfluss hat [127], jedoch wurde hierbei Nikotin statt des Universalagonisten Acetylcholin verwendet und auch weitere methodische Besonderheiten, welche in Abschnitt 4.1.2 näher erläutert wurden, sind nicht zu vernachlässigen.

Über ein ausbalanciertes Zusammenspiel zwischen muskarinergen und nikotinergen Acetylcholinrezeptoren auf der Granulozytenoberfläche wäre somit eine physiologische Regulierungsmöglichkeit der granulozytären Immunantwort

denkbar. Hierbei würden beispielweise hoch-affine muskarinerge Rezeptoren einen stimulierenden und nieder-affine nikotinerge Rezeptoren einen hemmenden Einfluss auf die Granulozytenaktivität ausüben. Dieser Gedankengang ist rein hypothetisch und bedarf weiterer Untersuchungen, aber der zweiseitige Verlauf unserer Versuchsergebnisse sowie die unterschiedlichen Beobachtungen bei Acetylcholin- und Nikotingabe, wären mit dieser Hypothese durchaus vereinbar. Doch warum sind die beschriebenen Effekte nur nach Stimulation mit dem membrangängigen PMA, nicht aber bei dem (an Oberflächenrezeptoren bindenden) fMLP-Stimulus sichtbar? Auch hier drängt sich wieder der Verdacht intrazellulärer Wirkmechanismen auf, wie sie schon im vorigen Kapitel 4.1.2 beschrieben wurden. Dies wird umso wahrscheinlicher, wenn man bedenkt, dass Kawashima et al. in ihren Studien auch intrazelluläre Acetylcholinrezeptoren entdeckt haben.[94,113] Gestützt wird diese Annahme wiederum durch die Studien von Jay et al. sowie durch Neumann et al., in denen eine Blockade von oberflächlichen Acetylcholinrezeptoren, sowohl des muskarinergen als auch des nikotinergen Subtyps, keine Modulation der beobachteten Effekte bewirken konnte.[127,129]

4.1.3.2 HUVECs

Die Ergebnisse unserer Studie konnten keinerlei Einfluss von Acetylcholinchlorid auf die Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM1 und VCAM nachweisen. In der Literatur findet sich hingegen ein Effekt von Nikotin auf die ICAM1- und VCAM-Expression. Ueno et al. beschrieben 2006 ihre Versuche mit Nikotin und dessen immunmodulatorische Wirkung auf endotheliale Zellen. Hierbei zeigte sich eine erhöhte ICAM1- und VCAM-Expression unter Nikotineinfluss (0,01 µM) mit einem Expressions-Peak nach sechs Stunden.[125] Dem gegenüber stehen Beobachtungen von Saeed et al., welche eine konzentrationsabhängige Reduktion der ICAM- und VCAM-Expression auf

humanen mikrovaskulären Endothelzellen durch Cholinergika um bis zu 70% nachwiesen.[87]

Während somit in der Literatur eine Modulation der ICAM1- und VCAM-Dichte auf HUVEC nach Gabe von Nikotin beschrieben wurde, konnten wir diesen Effekt mit Acetylcholin als universellen, physiologischen Agonist an muskarinergen und nikotinergen Rezeptoren nicht nachweisen. Ein Erklärungsansatz könnten wiederum die sehr unterschiedlichen Methoden liefern. Ueno et al. inkubierten die HUVEC sechs Stunden in 0,01 µM Nikotin, lysierten die Zellen und maßen dann die Antigenexpression mittels eines Westernblot-Verfahrens. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass in Uenos Vorversuchen zur Nikotinkonzentrationsbestimmung auch Konzentrationen von 0,1 µM und 0,001 µM Verwendung fanden. Diese wurden dann aber aufgrund geringerer ICAM1- und VCAM-Expression im weiteren Versuchsablauf nicht mehr eingesetzt bzw. untersucht.

Saeed et al. beschrieben neben der Reduktion der Adhäsionsmolekül-Expression auf humanen adulten dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HuMVEC) auch die Existenz des, für den CAP so wichtigen, nikotinergen alpha7-Acetylcholinrezeptors auf den untersuchten Zellen. Sie beobachteten eine verminderte ICAM1- und VCAM-Dichte auf TNF-stimulierten Endothelzellen nach Gabe von Nikotin, Acetylcholin und eines selektiven α7nAChR-Agonisten. Dieser Effekt ließ sich durch einen nikotinergen Antagonisten (Mecamylamin) aufheben. Wie lassen sich diese beiden unterschiedlichen Ergebnisse erklären? Erst kürzlich wurde auch auf den von uns verwendeten umbilical-venösen Zellen der α7nACh-Rezeptorsubtyp identifiziert.[112] Auch die von Ueno et al. eingesetzten Nikotinkonzentrationen ähnelten denen von Saeed et al. (0,01 µM respektive 0,0001 – 1 µM). Eventuell spielen die unterschiedlichen Methoden eine Rolle. So nutzten Saeed et al. ein ELISA-Verfahren, während Ueno et al. auf den Westernblot setzten. Der größte Unterschied liegt jedoch in den untersuchten Zellarten. Ueno et al. führten ihre Versuche an HUVEC, Saeed et al. an HuMVEC

durch. Dabei handelt es sich zwar bei beiden um Endothelzelltypen, jedoch unterscheiden sie sich aufgrund ihrer Lokalisation im menschlichen Gefäßsystem in ihren physiologischen Aufgaben und somit sehr wahrscheinlich auch in der Ausprägung bestimmter Merkmale. So zeigten Peña et al., dass HUVEC in Ruhe eine vergleichsweise niedrige Expression des nikotinergen alpha7-Acetylcholinrezeptors aufweisen. Die Oberflächenexpression dieses Rezeptors stieg jedoch um ein Vielfaches an, sobald die Zellen mit Nikotin stimuliert werden.[112] Ein weiterer relevanter Unterschied der Studien liegt in der Inkubationszeit mit Nikotin und den verwendeten Stimulationsfaktoren. So wurden die HUVEC ohne weitere Stimuli neben der Nikotingabe betrachtet, während die HuMVEC eine Stimulation durch TNF-alpha erfuhren. Zudem wurde die erhöhte ICAM1- und VCAM-Expression auf HUVEC nach sechs-stündiger Nikotininkubation, die erniedrigte Antigenexpression auf HuMVEC aber nach einer nicht näher bezeichneten „über Nacht Inkubation“, beobachtet. Daher relativiert sich die Paradoxität bei genauerer Betrachtung der Studienbedingungen.

Unsere Studie über die Wirkung von Acetylcholin auf die Adhäsionsmolekül-Expression der HUVEC fand sowohl mit als auch ohne sechs-stündiger Interleukin-1beta-Stimulation statt. Aus diesem Grund ist am ehesten der Vergleich mit den Beobachtungen von Ueno et al. statthaft. Die Tatsache, dass wir keinen Einfluss von Acetylcholin auf die untersuchten Parameter feststellen konnten, ließe sich eventuell durch die geringere Selektivität des Acetylcholins an nikotinergen bzw. muskarinergen Acetylcholinrezeptoren gegenüber dem Nikotin erklären. So ist eine gegensätzliche Wirkung muskarinerger und nikotinerger Stimuli auf die HUVEC theoretisch möglich, also ähnlich den Beobachtungen von Profita et al. in Bezug auf neutrophile Granulozyten[97]. Diese Überlegung ist jedoch reine Spekulation und bedarf einer umfassenderen Untersuchung.

4.2 Proteinkinase C-ELISA

Die Beobachtung von Bitzinger et al., dass Neostigmin im Gegensatz zu Physostigmin keine verminderte Sauerstoffradikalbildung hervorruft[107], veranlasste uns, diesem Phänomen näher auf den Grund zu gehen.

Der PKC-ELISA lieferte weder für die Versuche mit Probandenproteinen noch für die Versuche mit der gereinigten Proteinkinase C – delta statistisch signifikante Veränderungen nach Physostigmingabe. Ueno et al. konnten hingegen eine erhöhte Aktivität der Proteinkinase C und p38 mitogen-aktivierter Proteinkinase unter Einfluss von 0,01 µmol/l Nikotin nachweisen, jedoch fanden diese Untersuchungen an HUVEC-Zellen statt.[125]

Im Unterschied zu Neostigmin ist Physostigmin ein membrangängiger Cholinesterasehemmer. Demnach stellte sich uns die Frage nach dem pharmakologischen Target von Physostigmin im intrazellulären Kompartiment des neutrophilen Granulozyten. Da die Involvierung der Proteinkinase C in Prozessen des aktivierten neutrophilen Granulozyten beschrieben ist (s. 1.4.), untersuchten wir mittels des ELISA die direkte Beeinflussung der PKC-Aktivität durch das membrangängige Physostigmin.

Die Ergebnisse unseres Versuches mit extrahiertem Gesamtprotein aus neutrophilen Granulozyten von Probandenmaterial erbrachte hierbei zwar keinerlei Effekte, allerdings konnte, trotz Verwendung eines PKC-spezifischen ELISA-Kits, eine Überlagerung der Physostigminwirkung an der Proteinkinase C durch andere Proteine mit Kinaseaktivität nicht sicher ausgeschlossen werden. Da auch die nachfolgende Untersuchung mit reiner, humaner Proteinkinase C – delta keine direkte Interaktion von Physostigmin und dem getesteten Enzym darstellen konnte, muss von einem anderen pharmakologischen Angriffspunkt des Physostigmins ausgegangen werden.

Einen theoretisch denkbaren Ansatz liefert die Identifikation eines intrazellulären Acetylcholinsystems bei Lymphozyten durch Kawashima et al.[94,95,113] Wie schon

in Abschnitt 4.1.2 erläutert, beschrieb er ein vollständig intrazelluläres cholinerges System. Da Physostigmin membrangängig ist, könnte Physostigmin eine intrazellulär vorhandene Cholinesterase hemmen und somit zu einem Acetylcholinanstieg innerhalb der Zelle führen, was wiederum über intrazelluläre Acetylcholinrezeptoren die Proteinkinase C-Aktivität modulieren und die entsprechenden Effekte hervorrufen könnte. Da wir den ELISA mit lysiertem Zellmaterial beschichtet haben, konnten wir einen Effekt, der auf diesem hypothetischen Wirkmechanismus beruhen könnte, entsprechend nicht mehr nachweisen.

Zudem scheint Physostigmin nicht nur über eine rein cholinesterasehemmende Wirkung zu verfügen, sondern besitzt auch, über eine allosterische Bindung, eine modulierende Wirkung an nikotinergen Acetylcholinrezeptoren.[114]

Ob und inwieweit intrazelluläre Targets bei der Immunmodulation von Physostigmin auf neutrophile Granulozyten tatsächlich eine Rolle spielen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

4.3 Schlussfolgerungen für die zelluläre Ebene des „cholinergic antiinflammatory pathway“

Da der sog. „cholinergic antiinflammatory pathway“ (CAP) als ein natürlich vorkommender Regulatorkreis im humanen Organismus postuliert wurde, sind vornehmlich die Versuchsaufbauten mit Gabe von Acetylcholin für dessen Untersuchung relevant, da dies der physiologische cholinerge Transmitter im menschlichen Körper ist. Unsere Untersuchungen zeigten lediglich einen Einfluss von Acetylcholinkonzentrationen ab 1 µM auf die PMA-induzierte Sauerstoffradikalbildung von neutrophilen Granulozyten. Die Wirkung der anderen verwendeten Stimuli sowie die Adhäsionsmolekül-Expression, sowohl auf neutrophilen Granulozyten als auch auf HUVECs, wurden durch die Gabe von Acetylcholin hingegen nicht messbar beeinflusst.

In zahlreichen Studien am Mausmodell führte die Aktivierung des CAP zu einer Verminderung der gewebeschädigenden Abwehrmechanismen des Immunsystems und konnte somit die systemischen Folgen einer Immunreaktion deutlich verringern. Dabei führte sowohl die pharmakologische als auch die elektrische in vivo Stimulation des nervus vagus zu reduzierten TNFα-Serumspiegeln und damit einhergehend, einer geringeren Sepsisletalität.[81,82] Des Weiteren wurde ein verbessertes Outcome bei Pankreatitis, myokardialer Ischämie und hämorrhagischem Schock am murinen Modell nach CAP-Aktivierung beobachtet. [83,84,85,8,87]

Weitere Untersuchungen zeigten, dass Mäuse, welche nach Gabe einer letalen Endotoxindosis (LPS) splenektomiert wurden, ebenfalls stark verminderte TNFα-Serumspiegel im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit Scheinoperation (-70%) aufwiesen.[116] Ein ähnlicher Effekt konnte auch ohne Splenektomie nur durch elektrische Stimulation cervikaler Vagusanteile hervorgerufen werden. Hingegen führte die gleichzeitige Stimulation des nervus vagus und die Splenektomie nicht zu einer additiven Wirkung.[116]

Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die Milz in der Funktionsweise des CAP eine entscheidende Rolle spielt. Gestützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass die selektive Vagotomie der milznahen Nervenäste den inhibitorischen Einfluss der Vagusstimulation auf die TNFα-Serumspiegel aufhob.[119]

Interessant ist indessen, dass die Hauptbestandteile einer cholinergen Innervation Cholinacetyltransferase und Acetylcholinesterase sowie weitere Indizien für eine parasympathische Innervation der Milz nicht nachgewiesen werden konnten.[117,118,121] Stattdessen war der Nachweis eines katecholaminergen Netzwerkes positiv.[119]

In derselben Studie wurde auch untersucht, ob eine Vagusstimulation nach vorheriger Reserpingabe (indirektes Sympathikolytikum) noch eine TNF-Reduktion zur Folge hat. Das Ergebnis war negativ. Weitere Studien beschrieben

sympathische Nervenfasern in der Marginalzone sowie der weißen und roten Pulpa der Milz.[120] Somit muss davon ausgegangen werden, dass in der Milz nicht cholinerge, sondern terminal katecholaminerge Nervenfasern für die antiinflammatorische Wirkung der direkten Vagusstimulation verantwortlich sind. Dies würde wiederum erklären, warum unsere Studie – unabhängig von jeglichen neuronalen Einflüssen und der Milz – keine immunmodulatorischen Effekte durch Cholinergika nachweisen konnte.

Der CAP wurde auf zellulärer Ebene vor allem im Zusammenhang mit Makrophagen untersucht.[115] Hierbei zeigte sich nach Gabe von Acetylcholin eine verminderte Sekretion von TNFα, IL-1β, IL-6 und IL-18. Die Ausschüttung des antiinflammatorischen IL-10 blieb indes unbeeinflusst.[82]

Als ein wichtiger molekularbiologischer Bestandteil des CAP wurde der nikotinerge Acetylcholinrezeptor des α7-Subtyps identifiziert.[80,102] Dieser Rezeptor wurde sowohl auf Makrophagen als auch auf vielen anderen Immunzelltypen (so auch auf neutrophilen Granulozyten) identifiziert.[70,88,90,94] Weitergehende Untersuchungen von Wang et al. konnten die immense immunregulatorische Rolle dieses Rezeptorsubtyps anhand α7nAChR-gendefizienter Mäuse darstellen.[98] So zeigten diese gendefizienten Mäuse einen erhöhten Serumspiegel proinflammatorischer Zytokine nach Endotoxingabe gegenüber dem Wildtyp. Desweiteren war der protektive Effekt der elektrischen Vagusstimulation bei den genveränderten Mäusen im Vergleich zu ihren Artgenossen aufgehoben und extrahierte Makrophagen aus dieser Mauspopulation zeigten ebenfalls kein immunologisches Ansprechen auf Cholinergika.[98]

Somit haben wir auf der einen Seite die Milz als unverzichtbares Effektororgan im CAP, wobei aber ausschließlich katecholaminerge neuronale Netze identifiziert werden konnten, und auf der anderen Seite die Immunzellen mit dem α7nACh-Rezeptor, welcher offensichtlich cholinerge Transmitter zur Aktivierung und Ausübung seiner protektiven, antiinflammatorischen Effekte benötigt. Das

Fehlen eines dieser beiden Komponenten führte in den oben genannten Untersuchungen zur Aufhebung der antiinflammatorischen Wirkung der Vagusstimulation jedweder Art. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse unserer in vitro Studie, welche, unter Ausschluss neuronaler Einflüsse und Milzwirkung, keinen inhibitorischen Effekt der eingesetzten Cholinergika auf die getesteten immunologischen Prozesse nachweisen konnte, obwohl neutrophile Granulozyten den α7nAChR nachweislich exprimieren.[88]

Einen Erklärungsansatz bietet die Tatsache, dass der alpha7-Subtyp auch auf neuronalen Zellen exprimiert wird. Die Stimulation des Vagusnervs führt zur Ausschüttung von Acetylcholin, welches wiederum den α7nAChR im Plexus mesentericus superior aktiviert. Dadurch käme es theoretisch zu einer Stimulation sympathischer Nervenfasern, die in der Milz enden und dort antinflammatorische Mechanismen auslösen könnten.[120,121]

Zudem führt die Stimulation des α7nACh-Rezeptors auf Makrophagen und Splenozyten zu einer verminderten TNF-Sekretion.[103] Daraus folgt wiederum ein verminderter TNF-Plasmaspiegel und somit sekundär eine verminderte Reaktion nachgeschalteter Immunzellen.

Doch wie funktioniert die Verbindung zwischen dem katecholaminergen neuronalen Netzwerk der Milz und dem α7nACh-Rezeptor auf Makrophagen und Splenozyten?

Dieses fehlende Puzzleteil wurde erst kürzlich durch Vida et al. gefunden. Ihre Untersuchungen legen nahe, dass die Vagusstimulation auch sympathische Nervenfasern aktiviert, welche die Milz versorgen. Dies geschieht durch Acetylcholinrezeptoren des α7-Subtyps an postganglionären sympathischen Neuronen. Diese Nervenfasern interagieren direkt mit Makrophagen (CD3+) und sekretieren Adrenalin und Noradrenalin in der Milz. Diese Katecholamine inhibieren daraufhin über β-Rezeptoren die TNFα-Sekretion von Makrophagen und Splenozyten, was schlussendlich einen antiinflammatorischen Effekt hervorruft.[122]

Daher darf als Fazit eine direkte Immunmodulation neutrophiler Granulozyten durch den cholinergen antiinflammatorischen Signalweg bezweifelt werden, während die sekundäre Einflussnahme, über verminderte TNFα-Spiegel und zwischengeschaltete Effektorzellen, durchaus wahrscheinlich ist.

5 Zusammenfassung

Die systemische Inflammation stellt trotz aller hochtechnologisierter Medizin noch immer eine große Herausforderung in der intensivmedizinischen Betreuung dar. Als Ursache für die zahlreichen, teils letalen Folgeschäden dieses Krankheitsbildes gilt unter anderem die überschießende Reaktion des Immunsystems, wodurch gesundes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen und der gesamte Organismus gefährdet wird.

Insbesondere neutrophile Granulozyten spielen eine Schlüsselrolle in der Entzündungsreaktion. Sie verlassen den Blutkreislauf durch Leukozyten-Endothel-Interaktion und wandern direkt zu dem Entzündungsherd. Hier phagozytieren sie Bakterien, produzieren reaktive Sauerstoffspezies und fördern durch Zytokinausschüttung die Immunreaktion.

In der Literatur ist derweil ein cholinerger antiinflammatorischer Signalweg beschrieben, dessen primäre Effektoren der Vagusnerv und der nikotinerge Acetylcholinrezeptor des alpha7-Subtyps auf Makrophagen zu sein scheinen. Durch Stimulation dieses Signalweges konnten eine verminderte systemische Ausschüttung des TNF-alpha sowie eine reduzierte Letalität im septischen Mausmodell nachgewiesen werden. Unklar blieben jedoch die genauen Zusammenhänge und Abläufe auf zellulärer Ebene.

Daher untersuchten wir die Auswirkungen von Acetylcholin und Nikotin als direkte sowie Physostigmin als indirekten cholinergen Agonisten auf die Morphologie und immunologischen Funktionen von neutrophilen Granulozyten unabhängig von neuronalen Einflüssen. Hierbei wurden sowohl die Sauerstoffradikalbildung der Granulozyten als auch die Expression der Oberflächenantigene CD11b und CD62l auf Granulozyten und CD54 sowie CD106 auf Endothelzellen durchflusszytometrisch gemessen. Die Messungen wurden mit ansteigenden Cholinergika-Konzentrationen sowohl an unstimulierten als auch an durch fMLP, PMA, TNFα oder IL-1 stimulierten Granulozyten bzw. Endothelzellen durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten eine Abnahme der Sauerstoffradikalbildung unter PMA-Einfluss bei Gabe von 88 µM Physostigmin bzw. ab 1000 µM Nikotin. Bei der Verwendung von Acetylcholin waren hingegen eine Zunahme der PMA-induzierten Sauerstoffradikalbildung gegenüber dem Leerwert bei einer Konzentration von 1 µM Acetylcholin und eine anschließende Abnahme auf das Ausgangsniveau (ab 100 µM) zu beobachten. Die Antigenexpression der Granulozyten wurde hingegen weder durch Acetylcholin noch durch Physostigmin beeinflusst. Selbiges gilt für die Expression endothelialer Oberflächenantigene unter Acetylcholineinfluss. Bei Nikotinkonzentrationen von 10.000 µM zeigte sich allerdings sowohl nach Gabe von fMLP bzw. fMLP und TNFα als auch bei unstimulierten Zellen ein Effekt auf die Sauerstoffradikalproduktion. Jedoch stieg diese hierbei schlagartig an, statt sich zu verringern. Des Weiteren bewirkten Nikotinkonzentrationen von 10.000 µM an unstimulierten Granulozyten einen Abfall der CD62l-Expression, während diese unter fMLP-Einfluss anstieg. Die Untersuchung der CD11b-Expression neutrophiler Granulozyten unter PMA- und fMLP-Einfluss konnte erst ab einer Nikotinkonzentration von 10.000 µM eine verminderte Oberflächendichte aufzeigen, während sich an unstimulierten Zellen keine morphologische Veränderung dahingehend nachweisen ließ.

Bei Betrachtung der Zellvitalität zeigte sich eine deutliche Erhöhung des Anteils an toten Zellen ab Nikotinkonzentrationen von 10.000 µM, so dass alle beobachteten Effekte bei dieser hochkonzentrierten Nikotingabe am ehesten auf die erhöhte Zelltoxizität zurückzuführen sind. Physostigmin und Acetylcholin wiesen in den getesteten Konzentrationen indes keine messbaren Anzeichen einer zunehmenden Zellschädigung auf.

In einem zweiten Schritt versuchten wir der These auf den Grund zu gehen, ob Physostigmin seinen hemmenden Einfluss auf die Sauerstoffradikalbildung der neutrophilen Granulozyten über eine direkte Inhibition der Proteinkinase – C bewirkt. Hierzu wurde zunächst isoliertes Protein aus neutrophilen Granulozyten

von humanen Probanden und später gereinigte PKC-delta unter Zuhilfenahme eines ELISA untersucht. Jedoch ließen die Ergebnisse einen solchen Schluss nicht zu. Daher muss eine andere Erklärung für die unterschiedlichen Effekte auf die granulozytäre Sauerstoffradikalbildung des lipophilen Physostigmins auf der einen Seite, verglichen mit denen des hydrophileren Neostigmins auf der anderen Seite angenommen werden.

Schlussendlich darf bezweifelt werden, dass cholinerge Transmittermoleküle direkt über oberflächliche Acetylcholinrezeptoren Veränderungen der immunologischen Funktion oder Morphologie an neutrophilen Granulozyten hervorrufen. Allem Anschein nach spielen sie daher auch keine entscheidende Rolle als direkte Effektormoleküle auf zellulärer Ebene des cholinergen antiinflammatorischen Signalweges, insbesondere in Bezug auf die granulozytäre Immunantwort. Zwar ließe sich eine Interaktion mit einem intrazellulären cholinergen System in den Immunzellen postulieren, wahrscheinlicher wirkt aber die Variante, dass der CAP indirekt, über zwischengeschaltete Effektorzellen wie den Makrophagen, einen immunmodulatorischen Einfluss auf die neutrophilen Granulozyten ausübt. Hierbei scheint die komplexe vagale und adrenerge Innervation der Milz eine entscheidende Rolle zu spielen.

6 Literaturverzeichnis

1.Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J,Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 2001, 29:1303-1310

2.Lipnick RN, Iliopoulos A, Salata K, Hershey J, Melnick D, Tsokos G: Leukocyte adhesion deficiency: report of a case and review of the literature. Clin Exp Rheumatol 1996, 14:95.

3.Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. FASEB J 1995;9:866–873

4.Jutila MA, Rorr L, Berg EL, Butcher EC. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1. J Immunol 1989;143:3318–3324.

5.Kishimoto TK, Jutila MA, Butcher EC. Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:2244–2248.

6.Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. Science 1989;245:1238–1241

7.Larsen E, Palabrica T, Sajer S, Gilbert GE, Wagner DD, Furie BC, Furie B. PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). Cell 1990:467–474.

8.McEver RP. GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. J Cell Biochem 1991;45: 156–161.

9.Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, Hicks MJ, Lorenzo I, Doyle NA, Doerschuk CM, Ley K, Beaudet AL. Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. J Exp Med 1996;183:2329–2336.

10.Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, Hanai N, Irimura T. Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). J Immunol 1993;151:3267–3273.

11.Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. Nature 1990;343:757–760

12.Green SA, Setiadi H, McEver RP, Kelly RB. The cytoplasmic domain of P-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes. J Cell Biol 1994;124:435–448.

13.Issekutz AC, Lopes N. Endotoxin activation of endothelium for polymorphonuclear leucocyte transendothelial migration and modulation by interferon gamma. Immunology 1993;79:600–607.

14.Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MJ. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:9238–9242.

15.Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. Circ Res 1996;79:560–569

16.Keelan ET, Licence ST, Peters AM, Binns RM, Haskard DO. Characterization of E-selectin expression in vivo with use of a radiolabeled monoclonal antibody. AmJ Physiol 1994;266:H278–H290.

17.Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. Cell 1991;66:921–933.

18.Patel KD, Moore KL, Nollert MU, McEver RP. Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow conditions. J Clin Invest 1995;96:1887–1896.

19.Panes J, Granger DN. Leukocyte-Endothelial Cell Interactions: Molecular Mechanisms and Implications in Gastrointestinal Disease. Gastr 1998;114:1066–1090

20.Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function–associated antigen (LFA-1). Cell 1987;51:813–819.

21.Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell 1994;76:301–314.

22.Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood 1994;84:2068–2101.

23.Borregaard N. The human neutrophil. Function and dysfunction. Eur J Haematol 1988; 41:401–413.

24.Smith CW, Marlin SD, Rothlein R. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. J Clin Invest. 1989 Jun;83(6):2008-17.

25.Vorup-Jensen T, Chi L, Gjelstrup LC. Binding between the integrin alphaXbeta2 (CD11c/CD18) and heparin. J Biol Chem. 2007 Oct 19;282(42):30869-77.

26.Wakasa K, Seya T. [CR1(immune adherence receptor), CR2(EB virus receptor), CR3(Mac-1, CD11b/CD18), CR4(CD11c/CD18). Nihon Rinsho. 2010 Jun;68 Suppl 6:68-72.

27.Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Lawrence MB, McIntire LV. Role of ICAM-1 in the adherence of human neutrophils to human endothelial cells in vitro. In: Springer TA, Anderson DC, Rosenthal AS, Rothlein R, eds. Leukocyte adhesion molecules: structure, function, regulation. New York:Springer-Verlag, 1990:170–189.

28.Dustin ML, Rothlein R, Bhan AF, Dinarello CA, Springer TA. A natural adherence molecule (ICAM-1): induction by IL-1 and IFN-g, tissue distribution, biochemistry, and function. J Immunol 1986;137:245–254.

29.Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. J Leukoc Biol 1995;57:368–374.

30.Swerlick RA, Lee KH, Li LJ, Sepp NT, Caughman SW, Lawley TJ. Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. J Immunol 1992;149: 698–705.

31.Neish AS, Read MA, Thanos D, Pine R, Maniatis T, Collins T. Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF-kB as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. Mol Cell Biol 1995;15:2558–2569.

32.Henninger DD, Pane´s J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC, Granger DN. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. J Immunol 1997;158:1825–1832.

33.Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler M, Lobb RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. Cell 1990;60:577–584.

34.Strauch UG, Lifka A, Gosslar U, Kilshaw PJ, Clements J, Holzmann B. Distinct binding specificities of integrins a4b7 (LPAM-1), a4b1 (VLA-4), and a IEL b7. Int Immunol 1994;6:263–275.

35.Pober JSM, Gimbrone MAJ, Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor,and immune interferon. J Immunol 1986;137:1893–1896.

36.Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. J Exp Med 1996;184:81–92.

37.Weller A, Isenmann S, Vestweber D. Cloning of the mouse endothelial selectins: expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. J Biol Chem 1992;267:15176–15183.

38.Masinovsky B, Urdal D, Gallatin WM. IL-4 acts synergistically with IL-1b to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule 1. J Immunol 1990;145:2886–2895

39.Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL-1 and interferon gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). J Immunol 1986;137:245–254.

40.Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation:modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. J Leukoc Biol 1994;55:662–675.

41.Schmid-Schönbein GW, Usami S, Skalak R, Chien S. The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. Microvasc Res 1980;19:45–70.

42.Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. Cell 1991;65:859–873.

43.Kishimoto TK. A dynamic model for neutrophil localization to inflammatory sites. J NIH Res 1991;3:75–77.

44.Kubes P, Kanwar S. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules: a P-selectin–mediated event. J Immunol 1994;152:3570–3577.

45.Mulligan MS, Varani J, Dame MK, Lane CL, Smith CW, Anderson DC, Ward PA. Role of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) in neutrophil-mediated lung injury in rats. J Clin Invest 1991;88:1396–1406.

46.Ley K, Bullard DC, Arbones ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, Beaudet AL. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. J Exp Med 1995;181:669–675.

47.Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. Cell 1996;84:563–574.

48.Lefer AM. Significance of lipid mediators in shock states. Circ Shock 1989;27:3–12.

49.Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. Immunol Today 1992;13:106–112.

50.Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. J Exp Med 1993;178:449–460.

51.Kishimoto TK, Warnock RA, Jutila MA, Butcher EC, Lane C, Anderson DC, Smith CW. Antibodies against human neutrophil LECAM-1 (LAM-1/Leu-8/DREG-56 antigen) and endothelial cell ELAM-1 inhibit a common CD18-independent adhesion pathway in vitro. Blood 1991;78:805–811.

52.Majno G, Shea SM, Leventhal M. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators. An electron microscopic study. J Cell Biol 1969;42:647-72.

53.Schubert C,Christophers E,Swensson O. Transendothelial cell diapedesis of neutrophils in inflamed human skin. Arch Dermatol Res 1989;281:475-481.

54.Hemler ME. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. Annu Rev Immunol 1990;8:365-400.

55.Babior, B. NADPH oxidase: An update. Blood 1999;93:1464–1476.

56.Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. J. Immunol. Methods 1999;2:3–14.

57.Weiss SJ, Klein R, Slivka A, et al. Chlorination of taurine by human neutrophils: evidence for hypochlorous acid generation. J Clin Invest 1982;70:598-607.

58.Hoesel LM, Neff TA, Neff SB, Younger JG, Olle EW, Gao H et al. Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. Shock 2005, 24:40–47.

59.Heyworth P, Cross A, Curnutte J. Chronic granulomatous disease. Curr Opin Immunol 2003, 15:578–84.

60.Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. Physiol Rev 2008, 88:1341–1378.

61.Nishizuka Y. Protein kinases 5: protein kinase C and lipid signaling for Trends Biochem. Sci. 1995, 19:73.

62.Ono Y, Fujii T, Ogita K. The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. J Biol Chem 1988, 263:6927–6932

63.Kent J,Sergeant S,Burns D,McPhail L. Identification and regulation of protein kinase C-delta in human neutrophils. J. Immunol 1996 10:4641-4647.

64.Waki K,Inanami O,Yamamori T,Nagahata H,Kuwabara M. Involvement of protein kinase Cdelta in the activation of NADPH oxidase and the phagocytosis of neutrophils. Free Radic. Res 2006 4:359-367.

65.Korchak HM, Dorsey LB, Li H. Selective roles for alpha-PKC in positive signaling for O-(2) generation and calcium mobilization but not elastase release in differentiated HL60 cells. Biochim Biophys Acta 2007, 1773:440–449

66.Brown GE, Stewart MQ, Liu H. A novel assay system implicates PtdIns(3, 4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase. Mol Cell 2003, 11:35–47.

67.Chou WH, Choi DS, Zhang H. Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-reperfusion injury. J Clin Invest 2004, 114:49–56.

68.O'Flaherty I T, Jacobson DP. Bidirectional effects of protein kinase C activators: studies with human neutrophils and platelet-activating factor. J Bioi Chem 1989, 264:6836.

69.Matron C,Chakravarti A,Allaeys I,Poubelle P. PKC-delta controls the fMLF-induced overproduction of superoxide by neutrophils. Free Radic. Biol. Med 2010 2:207-215.

70.Durstin M, Gao JL. Differential expression of members of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human phagocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994, 201:174.

71.Cheng N,He R,Tian J,Dinauer M,Ye R. A critical role of protein kinase C delta activation loop phosphorylation in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced phosphorylation of p47(phox) and rapid activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. J. Immunol 2007 11:7720–7728.

72.Thomas L. The lives of a cell: notes of a biology watcher. Penguin Books. New York, New York, USA. 1978 160 pp.

73.Tracey KJ. Fatal sequence: the killer within. Dana Press. Washington, DC, USA. 2005 238 pp.

74.Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. J. Clin. Invest 2007 2:289–296.

75.Weinberg J,Boyle P,Meager A,Guz A. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin-1 interact to cause hypotension. J. Lab. Clin. Med. 1992 2:205–211.

76.Tracey KJ et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. Nature. 1987 330:662–664.

77.Tracey KJ et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science. 1986 234:470–474.

78.Pfeffer K et al. Mice deficient for the 55kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. Cell. 1993 73:457–467.

79.Nathan C. Points of control in inflammation. Nature. 2002 420:846–852.

80.Gallowitsch-Puerta M, Tracey K. Immunologic role of the cholinergic anti-inflammatory pathway and the nicotinic acetylcholine alpha 7 receptor. Ann. N. Y. Acad. Sci 2005;209–219.

81.Bernik TR et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. J. Exp. Med. 2002 195:781–788

82.Borovikova LV et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature. 2000 405:458–462.

83.Mioni C et al.. Activation of an efferent cholinergic pathway produces strong protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. Crit. Care Med. 2005 33:2621–2628.

84.Altavilla D et al. Activation of the cholinergic antiinflammatory pathway reduces NF-kappab activation, blunts TNF-alpha production, and protects against splanchic artery occlusion shock. Shock.2006 25:500–506.

85.Guarini S et al. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor–kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. Circulation. 107:1189–1194.

86.van Westerloo DJ et al. 2006. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. Gastroenterology. 2003 130:1822–1830.

87.Saeed RW et al. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. J. Exp. Med. 2005 201:1113–1123.

88.Wessler I, Kirkpatrick C. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. British Journal of Pharmacology 2008 8:1558–1571.

89.Maus AD, Pereira EF, Karachunski PI, Horton RM, Navaneetham D, Macklin K et al. Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. Mol Pharmacol. 1998 54: 779–788.

90.Wang Y, Pereira EF, Maus AD, Ostlie NS, Navaneetham D, Lei S et al. Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. Mol Pharmacol. 2001 60: 1201–1209.

91.Grueb M, Reinthal E, Rohrbach JM, Bartz-Schmidt KU et al. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corneal epithelium and endothelium. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2006 244: 1191–1195.

92.Walch L, Brink C, Norel X. The muscarinic receptor subtypes in human blood vessels. Therapie. 2001 56:23–226.

93.Hawkins BT, Egleton RD, Davis TP. Modulation of cerebral microvascular permeability by endothelial nicotinic acetylcholine receptors. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 289: H212–H219.

94.Kawashima K, Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. Life Sci. 2003 72: 2101–2109.

95.Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, Moriwaki Y, Misawa H. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells.
Life Sci. 2007 80: 2314–2319.

96.Reinheimer T, Mohlig T, Zimmermann S, Hohle KD, Wessler I. Muscarinic control of histamine release from airways. Inhibitory M1-receptors in human bronchi but absence in rat trachea. Am J Respir Crit Care Med. 2000 162: 534–538.

97.Profita M, Giorgi RD, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F et al. Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. Allergy. 2005 60:1361–1369.

98.Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S et al.Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation.
Nature. 2003 421: 384–388.

99.Blanchet MR, Langlois A, Israe¨l-Assayag E, Beaulieu MJ, Ferland C, Laviolette M et al. Modulation of eosinophil activation in vitro by a nicotinic receptor agonist. J Leukoc Biol. 2007 81: 1245–1251.

100.Benhammou K, Lee M, Strook M, Sullivan B, Logel J, Raschen K et al. [(3)H]Nicotine binding in peripheral blood cells of smokers is correlated with the number of cigarettes smoked per day. Neuropharmacology 2000 13:2818–2829.

101.Wang T, Guan D, Fan Y, Wu J, Liu W, Zhao Z et al. Expression of M3 subtype of muscarinic receptor during the skin incised wound healing in mice. Fa Yi Xue Za Zhi 2010; 3:165-8, 172.

102. Wang H et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. Nat Med 2004; 10:1216–1221.

103. Pabst M, Pabst K, Collier J, Coleman T, Lemons-Prince M, Godat M et al. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. J. Periodontol 1995; 12:1047–1055.

104. Speer P. Effects of nicotine on intercellular adhesion molecule expression in endothelial cells and integrin expression in neutrophils in vitro. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2002 3:551–556.

105. Rothe G.; Oser, A.; Valet, G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. In: Naturwissenschaften 1988 75:354–355.

106. Trabold B, Lunz D, Gruber M, Fröhlich D, Graf B. Immunomodulation of neutrophil-endothelial interaction by inotropes. Injury 2010 41:1079-1083.

107. Bitzinger DI, Zausig YA, Paech C, Gruber M, Sinner B, Graf BM, Trabold B. Modulation of immune functions in polymorphonuclear neutrophils induced by physostigmine, but not neostigmine, independent of cholinergic neurons. Immunobiology 2013 in press

108. Hofer S, Eisenbach C, Lukic I, Schneider L, Bode K, Brueckmann M et al. Pharmacologic cholinesterase inhibition improves survival in experimental sepsis. Critical Care Medicine 2008 2:404–408

109. Matthews J,Chen F,Milward M,Wright H,Carter K,McDonagh A,Chapple I. Effect of nicotine, cotinine and cigarette smoke extract on the neutrophil respiratory burst. Journal of Clinical Periodontology 2011 3:208–218.

110. Vukelic M, Koo G, Salmon JE. The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway as a Modulator of Immune Complex-Induced Acute Inflammation. Arthritis Rheum 2010;62 Suppl 10 :866

111. Oldenburg O,Qin Q,Sharma A,Cohen M,Downey J,Benoit J. Acetylcholine leads to free
radical production dependent on K(ATP) channels, G(i) proteins, phosphatidylinositol 3-kinase and tyrosine kinase. Cardiovasc. Res. 2002 3:544–552.

112.Peña V,Bonini I,Antollini S,Kobayashi T,Barrantes F. alpha 7-type acetylcholine receptor localization and its modulation by nicotine and cholesterol in vascular endothelial cells. J. Cell. Biochem. 2011 11:3276–3288.

113.Kawashima K, Fuji T. Extraneuronal cholinergic systems in lymphocytes. Pharmacol Ther. 2000 4;86(1):29-48.

114.Svobodová L, Krusek J, Hendrych T, Vyskocil F. Allosteric Modulation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor by Physostigmine. Annals of the New York Academy of Sciences 2005 1:355–358.

115.Pavlov V, Wang H, Czura C, Friedman S, Tracey K. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. Mol. Med 5-8:125–134.

116.Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. J Exp Med 2006; 203: 1623–8.

117.Bellinger DL, Lorton D, Hamill RW, Felten SY, Felten DL et al. Acetylcholinesterase staining and choline acetyltransferase activity in the young adult rat spleen: Lack of evidence for cholinergic innervation. Brain Behav Immun 1993; 7:191–204.

118.Nance DM, Burns J et al. Innervation of the spleen in the rat: Evidence for absence of afferent innervation. Brain Behav Immun 1989; 3:281–290.

119.Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105:11008–13.

120.Klein RL, Wilson SP, Dzielak DJ, Yang WH, Viveros OH. Opioid peptides and noradrenaline co-exist in large dense-cored vesicles from sympathetic nerve. Neuroscience 1982; 7: 2255–61.

121.Brandon KW, Rand MJ. Acetylcholine and the sympathetic innervation of the spleen. J Physiol 1961; 157: 18–32.

122.Vida G, Peña G, Ulloa L. α7-Cholinergic Receptor Mediates Vagal Induction of Splenic Norepinephrine. Journal of Immunology 2011 4:186-7, 4340-4346

123. Sack U, Tárnok A, Rothe G. Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungender Durchflusszytometrie. 2007 Basel: Karger.

124. Combadière C, Hakim J, Giroud J, Périanin A. Staurosporine, a protein kinase inhibitor, up-regulates the stimulation of human neutrophil respiratory burst by N-formyl peptides and platelet activating factor. Biochem. Biophys. Res. Commun 1990 1:65–70

125. Ueno H, Pradhan S, Schlessel D, Hirasawa H, Sumpio B. Nicotine enhances human vascular endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 via protein kinase C, p38 mitogen-activated protein kinase, NF-kappaB, and AP-1. Cardiovasc. Toxicol. 2006 1:39–50.

126. Bitzinger D, Schlachetzki F, Lindner R, Trabold B, Dittmar M. Flow-cytometric measurement of respiratory burst in rat polymorphonuclear granulocytes: Comparison of four cell preparation procedures, and concentration–response evaluation of soluble stimulants. Cytometry 2008 7:643–650.

127. Jay M, Kojima S, Gillespie M. Nicotine potentiates superoxide anion generation by human neutrophils. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1986 3:484–487.

128. Jonge W de, Ulloa L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. Br. J. Pharmacol 2007 7:915–929.

129. Neumann S, Razen M, Habermehl P, Meyer C, Zepp F, Kirkpatrick C, Wessler I. The non-neuronal cholinergic system in peripheral blood cells: effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration. Life Sci 2007 24-25:2361–2364.

130. Wallon C, Persborn M, Jönsson M, Wang A, van Phan, Lampinen M et al. Eosinophils express muscarinic receptors and corticotropin-releasing factor to disrupt the mucosal barrier in ulcerative colitis. Gastroenterology 2011 5:1597–1607.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Folgen der unkontrollierten Zytokinausschüttung (in Anlehnung an Tracey et al. [74]) 14

Abbildung 2: Übersicht des CAP (in Anlehnung an Tracey et al. [74])..... 14

Abbildung 3: Schema des Probenansatzes und verwendete Stimulantien..... 30

Abbildung 4: entnommen aus „Zelluläre Diagnostik“ von Ulrich Sack [123]..... 33

Abbildung 5: Prinzip des ELISA (Auszug aus beiliegender Bedienungsanleitung der Fa. Enzo Life Sciences GmbH) 35

Abbildung 6: HUVEC unter dem Mikroskop 40

Abbildung 7: Einfluss von Physostigminsalicylat auf die Sauerstoffradikalbildung nach PMA-Stimulus..... 45

Abbildung 8: Einfluss von Acetylcholinchlorid auf die Sauerstoffradikalbildung nach PMA-Stimulus..... 46

Abbildung 9: Einfluss von 10.000µM Nikotin auf die Sauerstoffradikalbildung nach PMA-Stimulus anhand zweier repräsentativer Proben 47

Abbildung 10: Overlay-Histogramm der beiden repräsentativen Proben..... 48

Abbildung 11: Einfluss steigender Nikotinkonzentrationen auf die Sauerstoffradikalbildung nach PMA-Stimulus..... 49

Abbildung 12: Einfluss steigender Nikotinkonzentrationen auf die Sauerstoffradikalbildung nach Gabe verschiedener Stimuli 50

Abbildung 13: Einfluss steigender Nikotinkonzentrationen auf die CD11b-Expression nach Gabe verschiedener Stimuli..... 40

Abbildung 14: Einfluss steigender Nikotinkonzentrationen auf die CD62l-Expression nach Gabe verschiedener Stimuli 52

Abbildung 15: Einfluss steigender Nikotinkonzentrationen auf die Zellletalität nach Gabe verschiedener Stimuli 53

Abbildung 16: Kein messbarer Einfluss steigender Physostigminkonzentrationen auf die PKC-Aktivität der getesteten Proteinproben aus neutrophilen Granulozyten 55

Abbildung 17: Kein Einfluss steigender Physostigminkonzentrationen auf die PKC-Aktivität der reinen PKC-delta, Negativprobe erfolgreich 56

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten humanen Adhäsionsmoleküle 3

Tabelle 2: Übersicht der adhäsionsregulierenden Signalmoleküle (Auszug) [19] . 10

Tabelle 3: Übersicht Acetylcholinrezeptoren: Expressionsort und Subtypen [88] . 17

Tabelle 4: verwendete Geräte 21

Tabelle 5: verwendetes Verbrauchsmaterial 22

Tabelle 6: verwendete Reagenzien 25

Tabelle 7: Übersicht der getesteten Substanzen und Konzentrationen 26

Tabelle 8: Übersicht der Fluoreszenzfarbstoffe und ihrer Farbspektren[123] 32

Tabelle 9: Mittelwerte und dazugehörige Standardabweichung (Angaben in MESF) 44

9 Abkürzungsverzeichnis

AChR	Acetylcholin-Rezeptor
mAChR	muskarinerger Acetylcholin-Rezeptor
nAChR	nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor
ANOVA	*analysis of variance*, statistische Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	*bicinchoninic acid*, Bicinchoninsäure
bFGF	*basic fibroblast growth factor*
C3b	Komplementfaktor 3b
C5a	Komplementfaktor 5a
CAP	*cholinergic antiinflammatory pathway*
CD	*cluster of differentiation*, Antigene der Zelloberfläche, die anhand immunphänotypischer Merkmale gruppiert wurden
DHR	*dihydrorhodamine 123*, nichtfluoreszente Vorstufe von Rhodamin 123
DMSO	Dimethylsulfoxid, organisches Lösungsmittel
ECGS/H	*endothelial cell growth supplement/heparine*
EGF	*endothelial growth factor*
ELAM	*endothelial-leukocyte adhesion molecule*
ELISA	*enzyme-linkediImmunosorbent assay*
FACS	*fluorescence activated cell sorting*, Durchflusszytometrie
FITC	*fluorescein-isothiocyanate*, Fluoreszenzfarbstoff
FL-1, FL-2, FL-3	*fluorescent light*, Bezeichnung der Lichtdetektoren
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin

FPR	*formyl peptide receptor*
FPRL-1	*formyl peptide receptor – like 1*
FSC	*front scatter,* frontale Lichtsreuung
HMGB-1	*high mobility group-box 1*
HRP	*horseradish-peroxidase*
HUVEC	*human umbilical-vein endothelial cell*
IL	Interleukin, Subgruppe der Zytokine mit mehreren Vertretern (IL-1, IL-6 usw.)
LECAM-1	*leukocyte endothelial cell adhesion molecule type 1*
LFA	*leukozyte function associated antigen*
LPS	Lipopolysaccharid, Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien
Mac-1	*macrophage-1 antigen*, Integrin CD11b/CD18
MAdCAM-1	*mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1*
MESF	*molecules of equivalent soluble fluorochrome*, standartisierte Einheit der Fluoreszenz-Intensität
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
PBS	*phophat-buffered saline*
PE	*R-Phycoerythrin*, Fluoreszenzfarbstoff
PECAM	*platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*
PKC	Proteinkinase C
- aPKC	atypische PKC
- cPKC	konventionelle PKC
- nPKC	nicht-konventionelle PKC
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetat
RBCL	*red blood cell lysis puffer*
RIPA	*radioimmunoprecipitation assay buffer*

ROS	*reactive oxygen species*
SNARF	Seminaphtharhodafluor, Fluoreszenzfarbstoff
SSC	*side scatter*, seitliche Lichtstreuung
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
VCAM	*vascular cell adhesion molecule*

10 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei PD Dr. Benedikt Trabold für die Überlassung des Themas sowie für die ausgesprochen gute Betreuung bedanken.
Die zahlreichen Hinweise und Erklärungen waren stets hilfreich.

Außerdem bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Dr. Diane Bitzinger für ihre sehr engagierte Unterstüzung.
Ihre wertvollen Tipps und Ratschläge haben mir die Arbeit und die Bewältigung der sich ergebenden Herausforderungen sehr erleichtert.

Ein großer Dank geht auch an das Laborteam der Anästhesie-Forschung unter der Leitung von Dr. Michael Gruber.
Die sehr angenehme, kollegiale Arbeitsatmosphäre und die schnelle Hilfestellung bei auftretenden Problemen ermöglichten mir die konzentrierte und fortlaufende Bearbeitung des Themas.

Von ganzem Herzen danke ich Frau Sarah Gundlach für die moralische Unterstützung und ständige Motivation während des gesamten Bearbeitungszeitraumes und darüber hinaus.

Zu guter Letzt gilt mein Dank all jenen freiwilligen Probanden, die sich zu einer Blutentnahme bereit erklärt haben.

ERKLÄRUNG ZUM PROMOTIONSVERFAHREN

nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Name: Paech

Vorname: Christoph

geb. am: 06. September 1987

in: Neubrandenburg

Ich erkläre,

- dass ich den **Doktorgrad der Medizin** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe
- das ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des **medizinischen Doktorgrades** zugelassen bin
- dass ich die **medizinische Doktorprüfung** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation

stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Potsdam, 03.12.2015
(Ort, Datum)

(Unterschrift)