

AUS DER ABTEILUNG
FÜR ANÄSTHESIOLOGIE
PROF. DR. BERNHARD M. GRAF, MSC.
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

MODULATION DER GRANULOZYTENFUNKTIONALITÄT DURCH PRIMING

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Sarah Willnecker

2021

AUS DER ABTEILUNG
FÜR ANÄSTHESIOLOGIE
PROF. DR. BERNHARD M. GRAF, MSC.
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

MODULATION DER GRANULOZYTENFUNKTIONALITÄT DURCH PRIMING

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Sarah Willnecker

2021

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: PD Dr. Sigrid Wittmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. dent. habil. Helmut
Schweikl

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2021

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Das menschliche Immunsystem	5
1.2. Neutrophile Granulozyten	5
1.2.1. Migrationsverhalten	6
1.2.2. Granula	6
1.2.3. ROS-Produktion	7
1.2.4. NETosis	8
1.3. Priming	8
2. Fragestellung und Studienplanung	10
2.1. Fragestellung	10
2.2. Studienplanung	11
3. Material und Methoden	13
3.1. Blutentnahme	13
3.2. Isolation	13
3.3. Inkubation mit Primingsubstanzen	14
3.4. Färbemethoden	14
3.5. Beobachtungssystem	16
3.6. Mikroskop	16
4. Auswertung	18
4.1. Auswertung der Migration	19
4.2. Auswertung der Farbstoffreaktionen	20
5. Ergebnisse	22
5.1. Vergleich der Isolierung mittels positiver Selektion mit CD15-Micro Beads und Doppelgradientzentrifugation mit Leuko- und Lympho-Spin-Medium.....	22
5.2. Migrationsverhalten unter Verwendung der Primingsubstanzen TNF- α , IL-1 β und IL-6	23
5.2.1 Betrachtung des Parameters Track Length bei Halbstundenunterteilung	24
5.2.2. Untersuchung der Parameter Track Displacement X und Track Displacement Y.....	31
5.2.3. Untersuchung der Track Length sowie Track Straightness über den gesamten Zeitraum	34
5.3. ROS-Produktion und NETosis	38
5.4. Inter- und intraindividuelle Unterschiede bei Probanden	41
6. Diskussion	43

7. Zusammenfassung	49
8. Abkürzungsverzeichnis	50
9. Abbildungsverzeichnis	51
10. Tabellenverzeichnis.....	52
11. Literaturverzeichnis.....	54
12. Danksagung	
13. Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Das menschliche Immunsystem

Mit der natürlichen sowie der erworbenen Immunität ruht der Schutz des menschlichen Körpers vor potenziell schädlichen Pathogenen und Mikroorganismen auf zwei tragenden Säulen, die sich gegenseitig beeinflussen und miteinander kooperieren. Von Geburt an besitzt der Mensch mit Granulozyten, Makrophagen, natürlichen Killer-Zellen, dem Komplementsystem sowie Akutphase-Proteinen Abwehrmechanismen gegen Antigene. Diese werden mittels präformierter Rezeptoren erkannt und es kommt zur Migration von Phagozyten zum Entzündungsort und zur Beseitigung der Erreger mithilfe einer Vielzahl von zellulären und humoralen Komponenten. Diese Immunreaktion zeigt im Gegensatz zur spezifischen Abwehr keine Adaptation im Verlauf, ist jedoch gekennzeichnet durch ihre sofortige Einsatzbereitschaft. Die erworbene Immunität entsteht erst verzögert nach Erstkontakt mit einem Antigen im Sinne eines Lernprozesses von B- und T-Lymphozyten, deren Aufgaben von der pathogenspezifischen Antikörperbildung bis hin zum Aufbau eines langlebigen immunologischen Gedächtnisses reichen. (1)

1.2. Neutrophile Granulozyten

Als Hauptanteil der im Blut zirkulierenden Leukozyten stellen diese 12-15µm großen, im Knochenmark gebildeten Zellen die erste Verteidigungslinie gegen mikrobielle Erreger. Bei einer systemischen Entzündungsreaktion zeigt sich eine Neutrophilie, also ein Anstieg ihrer Zellzahl im peripheren Blut. Die Granulozyten werden durch bei der Entzündung freigesetzte Mediatoren sowie durch Produkte von Mikroorganismen angelockt. Eine wichtige Rolle spielt dabei der fMLP-Rezeptor, der bakterielle Peptide erkennt. (1, 2) Diese gerichtete Migration, bestehend aus Adhäsion an der Gefäßwand mit anschließender Diapedese, der Durchwanderung der Endothelzellschicht ins geschädigte Gewebe, ist von enormer Bedeutung für eine koordinierte Immunantwort. (3) Ihrer Namensgebung entsprechend befinden sich im Zytoplasma der Abwehrzellen Granula, die zahlreiche Enzyme und antimikrobielle Moleküle bereithalten. Eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen führt bei Ligandenbindung zur sofortigen Aktivierung der Granulozyten, die damit zur Exozytose ihrer Enzyme, proinflammatorischer Proteine sowie reaktiver Sauerstoffmetaboliten fähig sind. (1) Des Weiteren sezernieren die Zellen Mediatoren und Zytokine, die die Entzündungsreaktion modulieren und können mittels Phagozytose Partikel aufnehmen und durch

Vesikelverschmelzung mit Lysosomen diese intrazellulär abbauen. (1–3) Die Bedeutung der Neutrophilen für den Körper zeigt sich bei erblichen Krankheiten mit durch Genmutation eingeschränkter Granulozytenfunktion. Beispielsweise führt eine unzureichende Phagozytoseleistung, wie im Falle des Chediak-Higashi-Syndroms, zu rezidivierenden Infekten. Damit einhergehend versterben 80 % der Patienten mit einer Diagnose mit infauster Prognose innerhalb der ersten Lebensdekade. (4)

1.2.1. Migrationsverhalten

Die Fortbewegung im Gewebe findet chemotaktisch gesteuert statt. Die Granulozyten folgen beispielsweise dem Konzentrationsgradienten eines sogenannten Chemokins, einem biochemischen Lockstoff aus der Gruppe der Zytokine. Die Vielzahl an Mediatoren in vivo erschwert den Nachweis der Wirkung einzelner Substanzen. Die genaue Kenntnis dieser kann jedoch hilfreich sein für die Entwicklung neuer Therapieansätze beruhend auf der Regulierung bestimmter Faktoren. (3) Eine Störung der chemotaktischen Funktionalität der Neutrophilen steht in Zusammenhang mit zahlreichen Krankheiten wie Influenza, einer Zytomegalievirus-Infektion, Malaria sowie Sepsis. (5, 6)

1.2.2. Granula

Im Folgenden soll auf die Namensgeber besagter Zellen, die Granula, eingegangen werden. Diese Kompartimente dienen sowohl zur Lagerung proteolytischer und bakterizider Proteine als auch zum Speichern von Membranbestandteilen bis zu deren Integration in die Oberflächenmembran. Damit erlangen sie auch Bedeutung in der Kommunikation mit der Umgebung. (7) Hierbei werden drei Typen unterschieden. Zunächst sollen die primären auch als azurophil bezeichneten Granula mit ihrer Myeloperoxidase (MPO) genannt werden sowie die sekundären, spezifischen Granula, die mit Lactoferrin beladen sind, und als drittes die gelatinasehaltigen. Außerdem beinhalten die Neutrophilen sekretorische Vesikel, die Rezeptoren und Oberflächenproteine wie Integrine bis zu ihrem Einbau in die Plasmamembran speichern. Dies geschieht als Antwort auf Selektine des aktivierten Endothels und chemotaktische Peptide wie Interleukin-8 oder N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP). (8)

1.2.3. ROS-Produktion

Phagozyten, vor allem neutrophile Granulozyten, unterstützen die Abtötung von Bakterien, Pilzen, einigen Parasiten und Metazoen mithilfe reaktiver Sauerstoffmetaboliten. Bei kleinen Zielobjekten erfolgt dies nach Phagozytose, bei Größeren von außen durch Abgabe der oxidierenden Produkte an die Umgebung. (9) Ein Hauptangriffspunkt dieser Moleküle sind die Membranen, deren Schädigung den Enzymzugriff erleichtert. (3) Diese sogenannten „reactive oxygen species“ (ROS) werden in einem einzigartigen Stoffwechselweg mittels des Nicotinamadenin dinucleotidphosphat (NADPH)-Oxidase-Komplexes produziert, der bei Zellaktivierung Elektronen auf molekularen Sauerstoff transferiert und damit Superoxidanionen (O_2^-) generiert. Diese werden durch die Superoxiddismutase oder in spontaner Reaktion zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt. Beide Moleküle zusammen können hochreaktive Hydroxylradikale (OH^-) bilden. In Anwesenheit von Myeloperoxidase werden diese zu hypochloriger Säure (HOCl), der stärksten bakteriziden Substanz dieser Gruppe. (9, 10) Dieser auch als oxidativer Burst bezeichnete Vorgang hat seinen Namensursprung in der damit einhergehenden erhöhten Sauerstoffaufnahme und Glukoseoxidation durch die Granulozyten. Als Auslöser für diesen Prozess dienen zahlreiche unterschiedliche Stimuli am Infektionsort. Hier können opsonierte Mikroorganismen, Moleküle des Komplementsystems, Leukotrien B₄ sowie bakterielle N-formyl-Peptide genannt werden. Von großer Bedeutung ist der mit den freigesetzten Molekülen einhergehende Gewebeschaden, da die Wirkung der Sauerstoffradikale auf biologische Moleküle nicht als selektiv angesehen werden kann. (9) Trotz gezielter Expression an der Kontaktfläche zum Zielobjekt kann eine räumliche Verteilung nicht verhindert werden. (11) Bei Patienten mit „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS), einer akuten Lungenschädigung durch Ödembildung mit einhergehender Hypoxämie und der Notwendigkeit einer mechanischen Beatmung infolge eines Traumas sowie in Fällen von Sepsis mit fataler Prognose konnte verglichen mit überlebten Infektionen eine erhöhte ROS-Produktion festgestellt werden. (5, 12) Das gegenteilige Bild, der Defekt der NADPH Oxidase oder ihres Aktivierungsweges, zeigt sich in der Krankheit der chronischen Granulomatose. Hierbei kennzeichnen wiederkehrende Hospitalisationen infolge von Infektionen wie bakteriellen Pneumonien und Gewebeabszessen bis hin zum frühen Tod den Krankheitsverlauf. (9)

1.2.4. NETosis

Eine weitere wichtige Strategie in der Erregerabwehr durch die Granulozyten stellt die Bildung von sogenannten „neutrophil extracellular traps“ (NETs) dar. Dabei kommt es zur Auflösung der Kernstruktur mit Ruptur der nukleären Membran und Mischung des dekondensierten Chromatins mit den Granulaproteinen bei intakter Plasmamembran. Im Anschluss folgt die Freisetzung mit der Perforation der Zellmembran. (13) Proteasen sowie Histone und DNA dienen in Form eines netzartigen Faserkomplexes sowohl als lokale Barriere, um eine Ausbreitung der Bakterien zu verhindern, als auch zur Aufkonzentrierung der antimikrobiellen Substanzen am Einsatzort für eine effektive Abtötung der Erreger. Durch die Netzstruktur wird zudem die Diffusion der freigesetzten zytotoxischen Proteasen ins umliegende Gewebe begrenzt, sodass Gewebeschaden vermieden wird. (14) Histonproteine, die normalerweise im Zellkern das Genmaterial organisieren, sind hier ein potentes Mittel zur Abtötung der Bakterien und die nun extrazellulär vorliegende DNA aktiviert das Immunsystem zusätzlich. Dieses Signal kann die Abwehrreaktion unterstützen oder aber im Falle autoimmuner Prozesse diese im negativen Sinne verstärken. (15)

Die Netzbildung, die in Anlehnung an die mit dem Zelltod verbundene Apoptose oder Nekrose auch NETose genannt wird, steht nicht notwendigerweise in Zusammenhang mit dem Ende der neutrophilen Lebensspanne. Es lassen sich zwei Signalwege unterscheiden. Zum einen die mit dem Suizid der Zelle verbundene Netzbildung, welche durch chemische Stimulation mit PMA induziert werden kann. Dies hat große Bedeutung mit zunehmendem Lebensalter der Granulozyten, da hier die Phagozytosefähigkeit abnimmt und so auch über den Tod der Zelle hinaus eine effektive Bakterienbekämpfung stattfindet. (13) Zum anderen soll es eine vitale NETose geben, bei der nach Aktivierung durch Moleküle von Mikroorganismen, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide, funktionsfähige Granulozyten erhalten bleiben. (16)

1.3. Priming

Im gesunden Organismus liegen die neutrophilen Granulozyten in einem Ruhezustand begrenzter Ansprechbarkeit vor. Aus diesem können sie mittels unterschiedlichster Stimuli in eine voraktivierte sogenannte geprimte Form übergehen. Diese ist zur Adhäsion an die Endothelzellwand der Gefäße fähig, was ein Verlassen des Blutkreislaufes sowie chemotaktische Bewegung hin zum Infektionsort ermöglicht. (17) Um schnell und mit hoher

Intensität auf ein Infektionsgeschehen reagieren zu können, werden die Zellen aus dem Ruhezustand in einen Status erhöhter Ansprechbarkeit für aktivierende Reize überführt. Dieser Übergang wird als „priming“ definiert. (18) In vitro kann dies beobachtet werden bei der Zugabe von Zytokinen, Chemokinen, proinflammatorischen Lipiden sowie viralen und bakteriellen Produkten. (19) Dasselbe Phänomen konnte in vivo gefunden werden, so beispielsweise bei Patienten mit Infektionen, rheumatoider Arthritis, traumatischen Verletzungen und ARDS. (20, 18, 21) Das Priming beinhaltet neben der primär damit bezeichneten erhöhten ROS-Produktion, eine gesteigerte Granulafreisetzung, Zytokin- und Lipidsynthese, Adhäsion, Transmigration und Chemotaxis sowie eine verzögerte Apoptose. Daraus folgt, dass dieser Begriff weit mehr bezeichnet als eine höhere Empfänglichkeit für Stimuli. (18) Als nächstes soll die Summe an Veränderungen in der Immunzelle, die durch das Priming initiiert werden, dargestellt werden. Als modellhafte Primingsubstanz, die charakteristischerweise selbst keine Reizantwort erzeugt, sondern nur eine erhöhte Reaktionsfähigkeit auf nachfolgende Stimuli bedingt, kann der in Studien häufig verwendete Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) betrachtet werden. (20, 22) Am längsten bekannt und wegweisend zeigt sich hier die Produktion reaktiver Sauerstoffmetaboliten. Die Zusammenführung zytosolischer sowie membranständiger Komponenten des NADPH-Oxidase-Enzymkomplexes unter Phosphorylierung einzelner Bausteine wie dem meistuntersuchten p47^{phox}, auch „neutrophil cytosol factor 1“ (NCF-1) genannt, führt zur Aktivierung seiner katalytischen Funktion. (23, 24) Beteiligt sind weiterhin mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) wie p38 MAPK und durch extrazelluläre Signale regulierte Kinasen (ERK). (25) Es lässt sich somit die Vielfalt an Signalübertragungswegen erkennen, die in diesen weit verzweigten molekularen Prozessen eine Rolle spielen, was das Finden therapeutisch sinnvoller Zugriffspunkte erschwert. (18) Des Weiteren zeigen Granulozyten bei Stimulierung mit fMLP nach Priming mit TNF- α eine erhöhte Freisetzung von Myeloperoxidase und Lactoferrin aus azurophilen und spezifischen Granula. (26) Mithilfe von Primingsubstanzen wird die Expression und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen reguliert, was zu unterschiedlicher Adhäsionsfähigkeit und Effizienz der Migration führt. fMLP stimulierte Chemotaxis wird durch Priming mit TNF- α verstärkt, wobei hier ebenso die p38 MAPK- sowie ERK-Signalkaskaden genutzt werden. (27, 28) Auch die Netzbildung aus Granulainhalten, DNA und Histonen zeigt einen Anstieg bei vorherigem Priming. Beispielhaft zeigt sich dies bei Tumorpatienten oder bei Patienten mit diabetischen Fußulzera, bei denen ein krankheitsbedingter Primingeffekt in Form einer erhöhten NETosis festgestellt werden kann. (29, 30)

2. Fragestellung und Studienplanung

Im folgenden Abschnitt sollen die Fragestellung der durchgeführten experimentellen Arbeiten sowie die Planung der Studie dargestellt werden.

2.1. Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Ergebnisse der von Sophie-Marie Pfaehler angefertigten Masterarbeit „Die Auswirkung von Priming (TNF- α , IL-1 β) auf die Migration und den respiratorischen BURST von neutrophilen Granulozyten“ aus dem Jahr 2016 im Fach Biologie an der Fakultät für molekulare Zellbiologie, ebenfalls durchgeführt im Forschungslabor der Anästhesie des Universitätsklinikums Regensburg, verifiziert und erweitert werden. (31) Gemäß ausführlicher Literaturrecherche sollen im nachfolgenden Versuchsaufbau die Effekte verschiedener für das Priming geeigneter Substanzen auf die Migration, die ROS-Produktion sowie das NETforming der Immunzellen beobachtet werden. Als Methodik werden mikroskopische Untersuchungen der Granulozytenfunktionalität in einer klimatisierten Chemotaxiskammer über einen Zeitraum von 6 Stunden verwendet. So kann im zeitlichen Verlauf nicht nur das Migrationsverhalten der Zellen sondern auch die Freisetzung der reaktiven Sauerstoffmetaboliten, das Auswerfen der DNA-Netze und die Exozytose der Myeloperoxidase aus den Granula untersucht werden. Dabei soll der Effekt des präinkubatorischen Einsatzes von TNF- α und Interleukin-1-beta (IL-1 β) sowie Interleukin-6 (IL-6) als Primingsubstanzen mit der Kontrollgruppe ohne Präinkubation verglichen werden. Es wird die Hypothese eines Primingeffektes auf die Granulozytenfunktionalität in Hinblick auf eine veränderte Migrationsfähigkeit sowie eine Beeinflussung der zeitlichen Komponente der ROS-Produktion und NETosis aufgestellt. In Abhängigkeit der verwendeten Substanz sollen die Zellen eine unterschiedlich starke Wirkung des Primings zeigen. Des Weiteren soll die verwendete Isolationsmethode mit magnetischen CD15-Micro Beads mit der Isolierung mittels Doppelgradientzentrifugation mit LeukoSpin- und LymphoSpin-Medium verglichen werden. Hier wird eine geringere Voraktivierung bei der positiven Selektion mit CD15-Micro Beads erwartet.

2.2. Studienplanung

Es werden die drei Primingsubstanzen mit je zwei unterschiedlichen Primingdauern (= Präinkubationszeiten) getestet. Die Kontrollgruppe erhält jeweils keinen Primingzusatz. Dazu sollen drei Versuchsreihen (siehe Abbildung 1) mit je einer verwertbaren Versuchsanzahl N von 8 für jede untersuchte Bedingung erstellt werden.

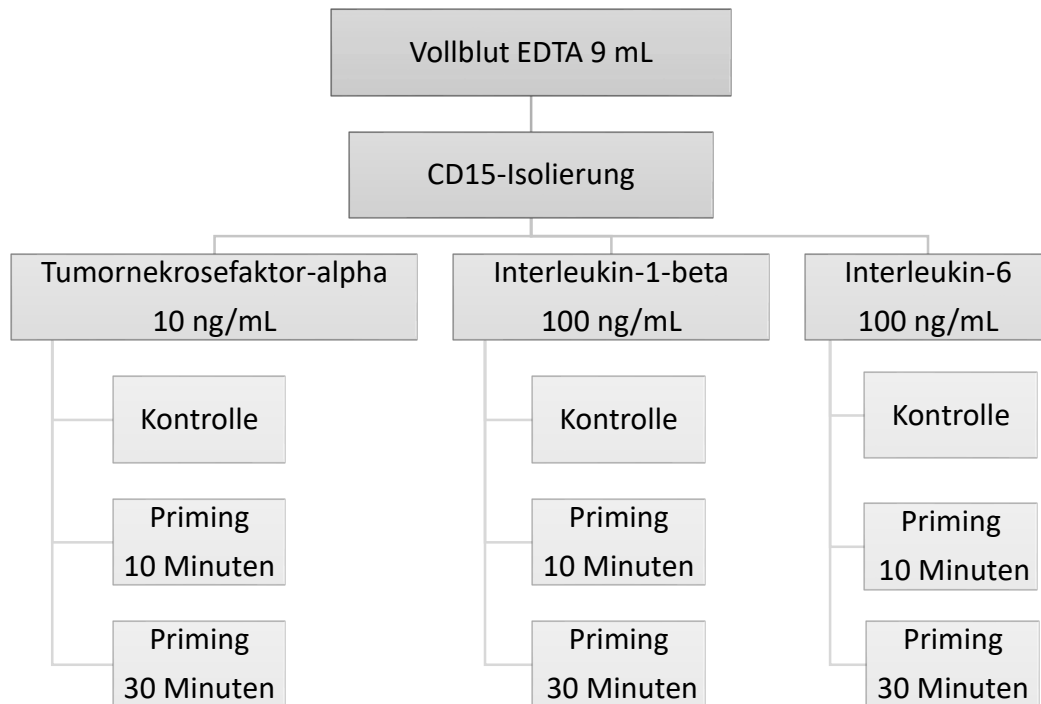


Abbildung 1 Aufbau der Versuchsreihen

Die Granulozytenfunktionalität in diesen Versuchsreihen wird anhand mehrerer Parameter mithilfe verschiedener Detektionsmodi beobachtet (siehe Abbildung 2).

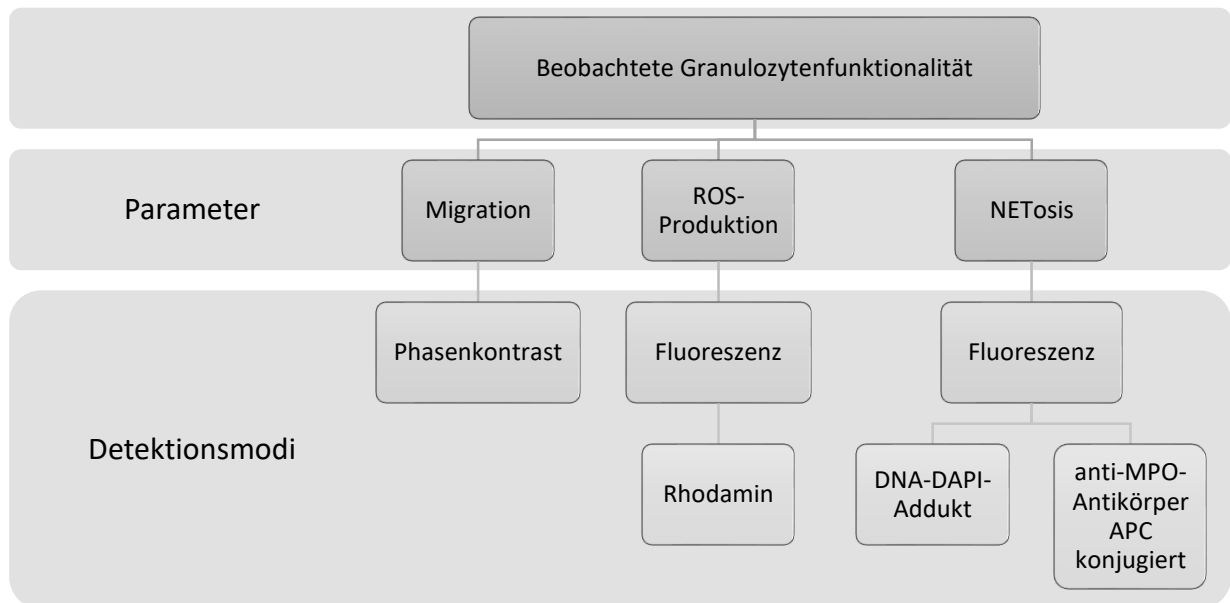


Abbildung 2 Parameter und Detektionsmodi der beobachteten Granulozytenfunktionalität

3. Material und Methoden

Im Folgenden soll auf die für die Versuchsdurchführung verwendeten Methoden und die dazu benötigten Materialien eingegangen werden.

3.1. Blutentnahme

Die benötigte Blutprobe von 9 Millilitern pro Versuchsdurchgang wurde gesunden Probanden entnommen, die bezüglich des Entnahmevorgangs und eventueller Risiken sowie der Datenschutzbestimmungen aufgeklärt worden waren und die Einverständniserklärung unterzeichnet hatten (Ethikvotumsnummer 15-101-0043). Dazu wurde nach Desinfektion unter Stauung eine Vene in der Ellenbeuge mit einer Safety-Multifly-Kanüle (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) punktiert und das entsprechende Volumen in eine S-Monovette K3 EDTA (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) abgefüllt.

3.2. Isolation

Für die anschließende Isolierung wurde das Vollblut auf Eis platziert, mit humanen Straight From Whole Blood CD15-Micro Beads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) versetzt und für 15 Minuten bei +4°C im Kühlschrank inkubiert, um eine magnetische Bindung der CD15+ Zellen zu erzielen. Die Probe wurde mit einem Separationspuffer aus MACS BSA Stock Solution (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) und autoMACS Rinsing Solution (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) im Verhältnis 1:4 gewaschen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur bei 425 g in einer Megafuge 1.0 R (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) zentrifugiert, um den Überstand zu verwerfen und die Zellen unter Zugabe von 1 mL des Separationspuffer zu resuspendieren. Die entstandene Zellsuspension wurde in eine im MidiMACS Separator (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) befindliche Whole Blood Column (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) gefüllt, mithilfe derer im erzeugten Magnetfeld eine positive Selektion der Leukozyten aus dem Vollblut erreicht werden konnte. Nach Durchfluss der Zellsuspension und Waschen der Säule mit dem Separationspuffer wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und auf ein neues 15 mL Röhrchen (CELLSTAR Polypropylen Röhrchen, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gesetzt. Hier wurden die zurückgehaltenen

Zellen mit auf Raumtemperatur erwärmtem Whole Blood Column Kit Elution Buffer (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) eluiert. Im Anschluss erfolgte die Zellzählung mit 10 µL der Zellsuspension in der Neubauer-Kammer (Neubauer improved Kammertiefe 0,1 mm, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland). Hierzu wurde ein Leica Leitz DM IRB Mikroskop sowie Deckgläser für Haemacytometer optisch plan geschliffen 20 x 26 mm (Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Um eine Einstellung der Zellzahl auf einen Zielwert von 18 Millionen Zellen pro Milliliter zu ermöglichen, wurde die Suspension bei 272 g bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) versetztem RPMI 1640 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) passendem Volumens resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in Reaktionsgefäße (Eppendorf, Nümbrecht, Deutschland) für die verschiedenen Versuchsbedingungen überführt.

3.3. Inkubation mit Primingsubstanzen

Je 50 µL der Zellsuspension wurden in drei Eppendorf-Cups gegeben. Nummer 1 diente als Kontrolle, daher wurde nichts zugegeben und diese identisch mit den anderen Versuchsgruppen 30 Minuten auf dem Horizontalroller bei 20 rpm inkubiert. Durch das Rollen wurde ein Verkleben der Zellen verhindert, sodass die Zellen einzeln untersucht werden konnten. Der Nummer 2 wurden nach 20 Minuten auf dem Horizontalroller ohne Zusatz 5 µL der jeweils getesteten Substanz zugefügt, durchmischt und anschließend für die restlichen 10 Minuten weiter auf dem Horizontalroller inkubiert. Für den dritten Ansatz galten dieselben Bedingungen, wobei sofort die Primingsubstanz zugegeben wurde und damit die gesamten 30 Minuten samt Zusatz inkubiert wurde.

3.4. Färbemethoden

Als Korrelat für die Beurteilung der Funktionalität der Granulozyten wurden ihre Migration, ROS-Produktion und NETosis untersucht. Zur Darstellung der beiden letzteren Abläufe wurde die Fluoreszenz unterschiedlicher Farbstoffe genutzt. Um die mit der Ausstoßung der Netze freigesetzte DNA anzufärben, wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in einer Konzentration von 5 µg/mL verwendet. Davon wurden 5 µL auf 50 µL Zellsuspension gegeben, sodass eine

Endkonzentration von 0,5 µg/mL entstand. Dies diente zur Anfärbung von Nukleinsäuren mit bevorzugter Bindung an AT-reiche Regionen der doppelsträngigen DNA. Dabei kommt ein Ligand auf drei Basenpaare und es wird bei Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 385 nm proportional zur Menge an DNA eine blaue Fluoreszenz erzeugt. (32) Zur Beobachtung der Abgabe reaktiver Sauerstoffmetaboliten wurde Dihydrorhodamine 123 (DHR, life technologies, Eugene, Oregon, USA) verwendet (siehe Abbildung 3 und Tabelle 1). Dieses kann als Leukoverbindung des Farbstoffes Rhodamin 123 in die Zelle eindringen und an Membranen binden. Mit Einsetzen des "respiratory burst" wird es durch Oxidation insbesondere in Interaktion mit Wasserstoffperoxid zum Chromophor umgewandelt. (33–35)

Farbstoff	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
APC (konjugiert mit anti-MPO-Antikörper)	651	660
DAPI	359	461
Rhodamin 123	507	529

Tabelle 1 Absorptions- sowie Emissionsmaxima der Farbstoffe (36)

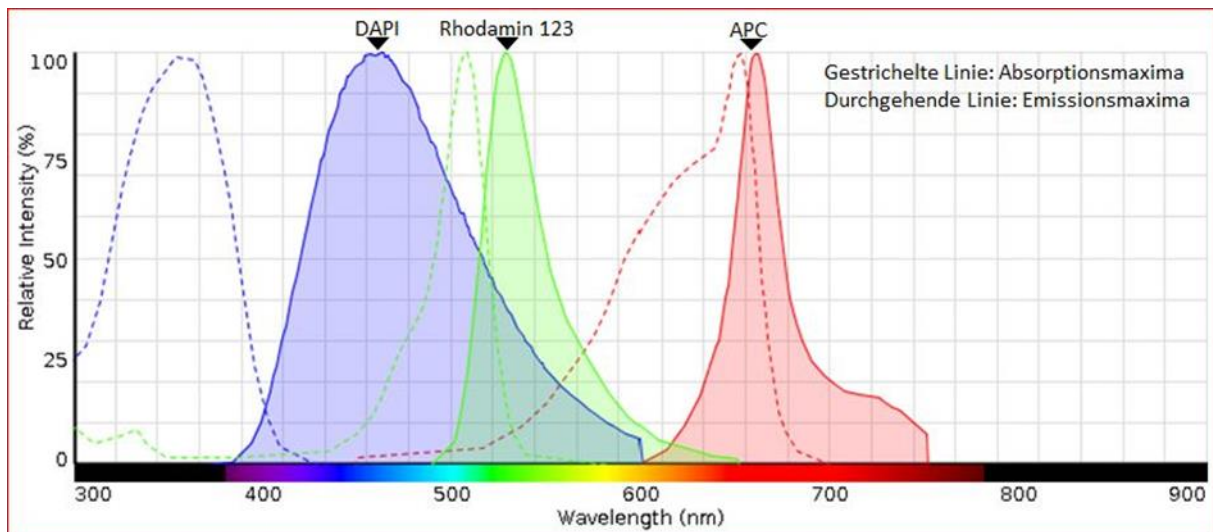


Abbildung 3 Wellenlängen [nm] der Absorptions- sowie Emissionsmaxima der Farbstoffe (36)

Dazu wurden 3 µL des DHR in einer Konzentration von 1 µM vor Befüllen der Kanäle der Chemotaxiskammer zu den 300 µL Kollagen-Zell-Gel gegeben, sodass die Konzentration im Gel 10 nM betrug. Als dritte Färbeoption wurden mit „Allophycocyanin“ (APC) gekoppelte anti-MPO-Antikörper (anti-MPO-APC, human, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach,

Deutschland) zur Detektion der Myeloperoxidase verwendet und dazu 10 μL ebenfalls dem Kollagen-Zell-Gel zugefügt.

3.5. Beobachtungssystem

Für die Beobachtung der Migration sowie der ROS-Produktion und der NETosis wurde eine μ -Slide Chemotaxiskammer der Firma ibidi verwendet (ibidi GmbH, Martinried, Deutschland). Der Aufbau des Objektträgers, bestehend aus drei Kanälen jeweils beidseitig flankiert von zwei Reservoirs, ermöglicht die parallele Betrachtung von drei Versuchsbedingungen in einer 3D Gelmatrix. In der vorliegenden Versuchsdurchführung wurde eine Zellsuspension hergestellt, die sich aus 50 μL der isolierten Zellen, 150 μL eines bovinen Typ 1-Kollagens (PureCol Bovine Collagen Solution Type 1, 3 mg/mL, Advanced BioMatix, Carlsbad, Kalifornien, USA) sowie 100 μL einer 24 Stunden zuvor steril hergestellten und bei 37 °C inkubierten Gelkomponente zusammensetzte. Der zuletzt genannte Gelbestandteil bestand aus 20 μL MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 20 μL destilliertem Wasser, 10 μL Natriumbikarbonat (Sodium bicarbonate solution, 7,5 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 50 μL RPMI 1640 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland). Jeder Kanal wurde mit 6 μL befüllt und die Kammer zur Aushärtung 35 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das rechte Reservoir mit 65 μL reinem Medium in Form von RPMI 1640 mit 10 % FKS befüllt, für das linke Reservoir wurde der Lockstoff fMLP im Medium gelöst, sodass eine Konzentration von 10 nM entstand.

3.6. Mikroskop

Für die Versuchsreihe wurde das Inversionsmikroskop Leica DMi8 (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland) zusammen mit der Fluoreszenzkamera Leica DFC9000 GT (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH) mit dem Objektiv HC, PL FL L20x/0,40 CORR PH1 (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH) und der Lichtquelle CoolLED pE-4000 (CoolLED Ltd, Andover, Großbritannien) verwendet. Zur Durchführung der Fluoreszenzmessungen kamen unterschiedliche Filterwürfelsysteme zum Einsatz, um die benötigten definierten Wellenlängen herauszufiltern. Den Absorptions- sowie Emmissionsmaxima von DAPI (359 nm, 461 nm), und DHR (507 nm, 529 nm) entsprechend (siehe 3.4. Färbemethoden Tabelle 1 und Abbildung 3) (36), war dies zum einen der Filterwürfel

DAPI/FI (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH), zum anderen für MPO (651 nm, 660 nm) der LED QUAD Filterwürfel (Chroma Technology Corp., Vermont, USA) (siehe Tabelle 2).

	DAPI/FI	LED QUAD
Anregungsfilter (Einlassbereich) [nm]	380-410; 472-498	350-380; 460-480; 522-548; 615-635
Di- bzw. polychroitischer Filter [nm]	418; 502	405; 485; 555; 645
Emissionsfilter (Auslassfilter) [nm]	424-460; 505-545	410-450; 492-518; 560-590
Low-Pass Filter [nm]	-	650

Tabelle 2 Wellenlängenbereiche der Absorption der Filterwürfel (37)

Bei in den Mikroskopisch eingelegter Kammer wurden die Kanalpositionen links, mitte und rechts eingestellt und die Zellebene fokussiert. War dies erfolgt, wurde eine etwaige Über- oder Unterbelichtung mittels Variation der Beleuchtungsintensität und Belichtungszeit korrigiert. Mit Start des Mikroskops wurden Bilder in 10-facher Vergrößerung im Phasenkontrast sowie im jeweiligen Wellenlängenbereich der DAPI-, MPO- und DHR-Färbung gemacht, sodass über sechs Stunden aufgezeichnet wurde. Hier variierte die Zyklusdauer der Durchführung dieser vier Aufnahmen zwischen 30 und 37 Sekunden. Um den Primingeffekt exakt mit der Kontrollgruppe vergleichen zu können, wurde stets der linke Kanal mit einem Teil der Zellsuspension ohne Zusatz einer Primingsubstanz gefüllt. Dieser wurde dieselbe Zeitspanne mit den übrigen Proben auf dem Horizontalroller gelagert. Der mittlere Kanal enthielt die für 10 Minuten mit der Primingsubstanz inkubierten Zellen und der rechte Kanal die Granulozyten mit der 30-minütigen Vorbehandlung.

4. Auswertung

Die Software Leica Application Suite X 3.4.2.18368 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) steuerte die Aufnahmen des Mikroskops Leica DMI8 (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland). Die Daten sowohl der Migration als auch der Fluoreszenzfarbstoffe wurden im Anschluss mit dem Programm Imaris 9.0.2 (Bitplane AG, Zürich, Schweiz) ausgewertet. Für die Untersuchung des zeitlichen Zusammenhanges des Aufleuchtens der zugesetzten Farbstoffe wurde Microsoft Excel 2010 verwendet. Die Werte der NETosis anzeigenden DAPI- und MPO-Freisetzung wurden mit der Software Certara Phoenix 64 NLME weiter verarbeitet. Die abschließende Analyse und Darstellung aller Ergebnisse erfolgte mit IBM SPSS Statistics 22 (siehe Abbildung 4).

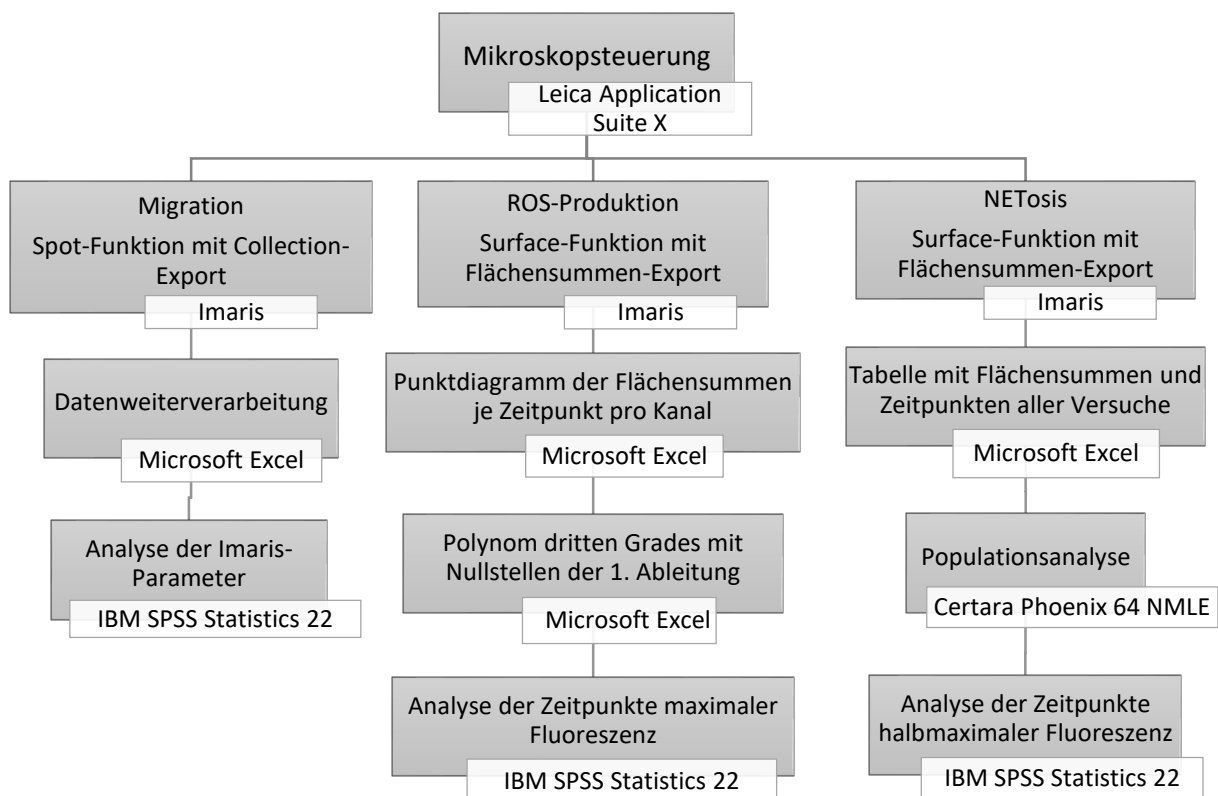


Abbildung 4 Softwareverarbeitungsprozesse aufgeschlüsselt nach Migration und Farbanalyse

Die Boxplot Graphen zeigen den Median sowie die oberen und unteren Quartilen an. Kreise markieren Ausreißer in den Messwerten und Extremwerte werden durch Sterne dargestellt.

4.1. Auswertung der Migration

Um Aussagen über die Migration treffen zu können, wurden in der Imaris-Software Parameter festgelegt, anhand derer die einzelnen Zellen mit der „Spot“-Funktion detektiert und ihre Bewegungen verfolgt wurden. Hierzu wurde der „Estimated XY Diameter“, der erwartete Durchmesser der zu beobachtenden Strukturen, auf eine durchschnittliche Granulozytengröße von 13 µm festgesetzt. Der „Estimated Z Diameter“, also der Durchmesser in Z-Richtung, wurde auf 20 µm voreingestellt. Außerdem wurden mithilfe eines Qualitätsparameters „Quality“ über 2,91 sowie der „Background Subtraction“ die Hintergrundartefakte aus der Berechnung ausgenommen. Im Anschluss wurde das sogenannte „Tracking“, also die Verfolgung der Zellbewegung, modifiziert. Es sollte die Phasenkontrastsequenz ausgewertet werden und als „Algorithm“ wurde die „autoregressive Motion“ ausgewählt. Hierbei wurde die zurückgelegte Distanz eines einzelnen Granulozyten zwischen zwei Bildzyklen von Phasenkontrast und Fluoreszenzaufnahmen auf 40 µm limitiert. Bei Verschwinden der Zelle aus der fokussierten Ebene sollte die Lücke bei einem Wiedererscheinen nach maximal zwei Bildzyklen mit der erwarteten Bewegung aufgefüllt werden. Dies wurde mit einer „Max Gap Size“ von 2 eingestellt. Um gezielt sich bewegende Zellen beobachten zu können, wurde ein Mindestmaß an „Track Duration“, also der Dauer der Bewegung, als Filter genutzt. (38)

Als zu betrachtende Migrationsparameter in Bezug auf die einzelne verfolgte Zelle wurden im Imaris-Programm Track Length (Gesamtlänge der zurückgelegten Wegstrecke in Micrometer), Track Displacement in X-Richtung sowie in Y-Richtung (Versatz der Anfangs- und Endpunkte der Wegstrecke in Micrometer), Track Displacement Length (euklidische Länge des Versatzes), Track Speed Maximum, Track Speed Mean sowie Track Speed Minimum (maximale, mittlere und minimale Geschwindigkeit des verfolgten Objekts), Track Speed Variation und Track Straightness ($\frac{\text{Track Displacement}}{\text{Track Length}}$) ausgewählt. (38) Diese wurden für alle Versuche angewendet und mithilfe von im Imaris-Programm zusammengeführten sogenannten „Collections“ in Form von Excel-Tabellen exportiert. Dazu wurde eine einheitliche Nomenklatur erstellt, die eine eindeutige Zuordnung der Ergebnisse gemäß Datum, Versuchsnummer, verwendeter Primingssubstanz sowie Primingdauer, Probandennummer und verwendetem Kanal in der ibidi-Chemotaxiskammer ermöglicht.

4.2. Auswertung der Farbstoffreaktionen

Um die Entwicklung der Farbstoffreaktionen im zeitlichen Verlauf bestimmen zu können, erfolgte deren Analyse mithilfe der „Surface“-Funktion der Imaris-Software. (38) Für die Freisetzung der DNA mithilfe des Farbstoffes DAPI sowie der Myeloperoxidase sollte der ET50-Wert bestimmt werden. Dies ist der halbmaximale Zeitpunkt vor Erreichen des Endplateaus, wenn alle detektierten Zellen in die NETosis eingegangen sind. Er wurde aus dem Punktdiagramm der Summe der leuchtenden Flächen in y-Richtung gegen die Bildnummer in x-Richtung berechnet (siehe Abbildung 5). (39) Diese Kurven wurden nach Importieren des Wertes Flächensumme „Area“ aus der Auswertung mit Imaris mit zugehöriger Bildnummer in Form einer Excel-Tabelle in Certara Phoenix erstellt und die Werte E_0 , E_{max} , ET_{50} und γ mit einer Populationsanalyse berechnet ($E = E_0 + E_{max} * t^\gamma / (ET_{50}^\gamma + t^\gamma)$). (39) Mithilfe dieses Wertes kann eine Aussage getroffen werden, zu welchem Zeitpunkt die Hälfte der Zellen in die NETosis eingegangen ist.

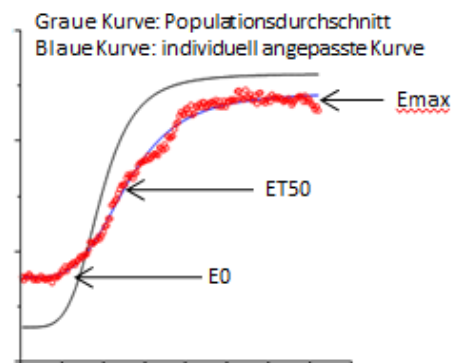


Abbildung 5 ET50-Wert als Zeitpunkt halbmaximaler DNA- bzw. MPO-Freisetzung (39)

Für die Untersuchung der ROS-Produktion wurde der Zeitpunkt der maximalen DHR-Umwandlung in sein fluoreszierendes Derivat gesucht. Dazu wurde mittels der Imaris-Software die Fläche der Einzelzell-Fluoreszenzen detektiert und die der Bildnummer zugeordneten Flächensummen wurden als Excel-Tabelle exportiert. Hier erfolgte die Erstellung eines zugehörigen Punktdiagramms manuell mittels Excel und in den Ausschnitt des Maximalwertes wurde die Trendlinie eines Polynoms dritten Grades hineingelegt (siehe Abbildung 6).

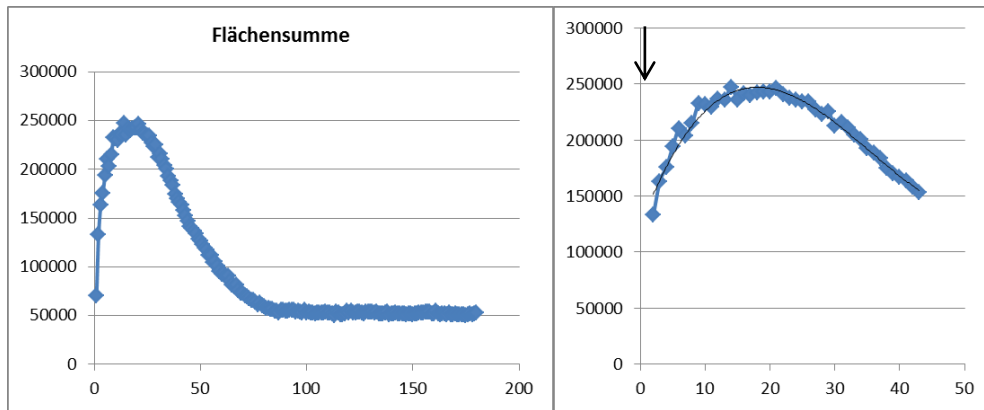


Abbildung 6 Zeitpunkt maximaler ROS-Produktion am Maximum der Fluoreszenzdetektion (40)

Dessen Formel diente unter Berechnung der Nullstellen der ersten Ableitung zum Finden des Zeitpunktes der maximalen Flächensumme. Diese Bildnummer wurde in den korrelierenden Wert der maximalen ROS-Produktion in Minuten umgerechnet.

5. Ergebnisse

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der durchgeführten experimentellen Arbeiten dargestellt werden.

5.1. Vergleich der Isolierung mittels positiver Selektion mit CD15-Micro Beads und Doppelgradientzentrifugation mit Leuko- und Lympho-Spin-Medium

Für den Isolierungsvergleich wurden 25 Einzelproben aus der Kontrollgruppe der von mir erhobenen Daten verwendet, ebenso wurden die Rohdaten von 20 vergleichbaren Kontrollproben der von Nina Doblinger im selben Zeitraum im Labor der Anästhesie durchgeführten Versuchsreihen eingeschlossen. Um hier eine Vergleichbarkeit zu schaffen, wurden wieder TL Werte kleiner 25 μm ausgeschlossen und eine Track Duration von mindestens 500 Sekunden festgesetzt (siehe Abbildung 7).

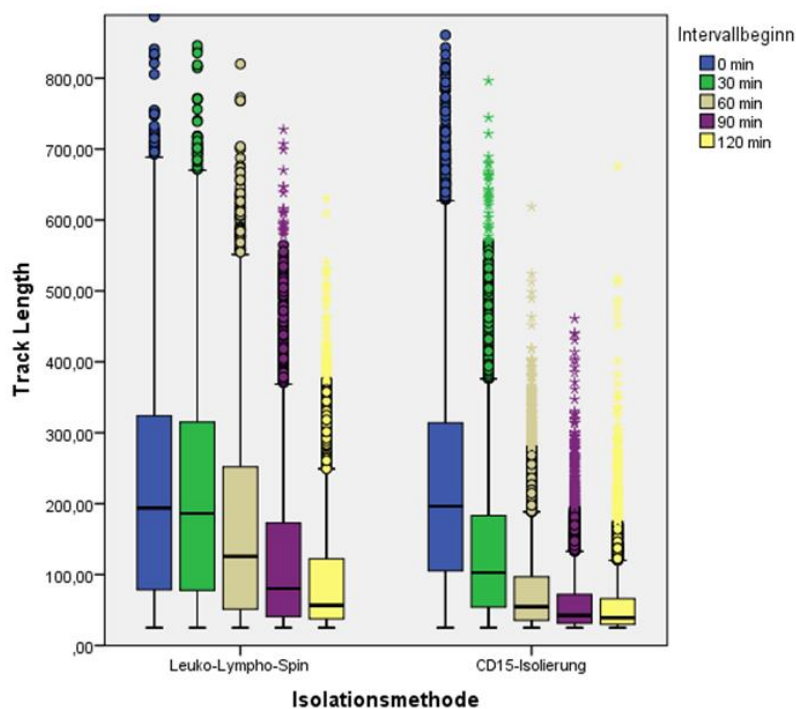


Abbildung 7 Vergleich der Aufreinigungsmethoden Leuko-Lympho-Spin sowie positiver Selektion mit CD15-Micro Beads anhand des Wertes Track Length, gemessen je halbe Stunde, sich nicht bewegende Zellen mit einer TL <25 μm und TD <500 s ausgeschlossen, pro Boxplot 7288 – 13903 verfolgte Tracks

Die Werte der Track Length zeigen eine Beeinflussbarkeit durch die vorangegangene Aufreinigung. Im Vergleich der Granulozytenisolierung aus Vollblut mittels Leuko-Lympho-

Spin, durchgeführt von Nina Doblinger, sowie der Auftrennung durch Markierung mit CD15-Micro Beads ist in der ersten halben Stunde ein ähnliches Ausmaß der zurückgelegten Strecke erkennbar. Im weiteren Verlauf nimmt die TL bei den positiv selektierten Zellen deutlich stärker ab (siehe Tabelle 3).

Aufreinigungsmethode	Intervallbeginn [min]	Median TL [μm]	Interquartilbereich [μm]
Doppelgradientzentrifugation mittels Leuko-Lympho-Spin	0	194	245
	30	186	237
	60	126	200
	90	80,3	132
	120	56,6	84,7
Positive Selektion mit CD15-Micro Beads	0	196	209
	30	103	129
	60	54,5	61,3
	90	42,5	40,7
	120	39,2	36,1

Tabelle 3 Mediane und Maximalwerte der TL, aufgeschlüsselt nach Aufreinigungsmethode und Zeitintervallen

Dabei sind von der ersten auf die zweite halbe Stunde ähnliche TL Medianwerte von 194 μm bei der Doppelgradientzentrifugation sowie 196 μm bei der CD15-Isolierung zu beobachten. Die Doppelgradientzentrifugation als Aufreinigungsmethode zeigt zum Beispiel mit einem Median von 126 μm im dritten Intervall ein länger erhaltenes Migrationsverhalten als die positive Selektion mit einem bereits abgefallenen Wert von 54,5 μm . Die Mediane der TL unterscheiden sich in allen beobachteten Zeitfenstern zwischen den Aufreinigungsmethoden signifikant (siehe Tabelle 4).

Intervallbeginn [min]	0	30	60	90	120
Mann-Whitney-U-Test (p-Werte)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Tabelle 4 Signifikanzen der TL bei Vergleich der Aufreinigungsmethoden

5.2. Migrationsverhalten unter Verwendung der Primingsubstanzen TNF- α , IL-1 β und IL-6

Die nachfolgenden Abschnitte stellen die Versuchsergebnisse zur Granulozytenfunktionalität in Hinblick auf die Migration dar.

5.2.1 Betrachtung des Parameters Track Length bei Halbstundenunterteilung

Für die Untersuchung der Gesamtlänge der zurückgelegten Strecke wurde eine Mindestbewegung von zwei Zelldurchmessern mit 25 µm in 30 Minuten festgesetzt. Die gemessene Track Length nimmt unabhängig von der hinzugegebenen Substanz und in gleicher Weise in der Kontrollgruppe ohne Zugabe über die Beobachtungszeit ab (siehe beispielsweise die TNF-α-Versuchsreihe in Abbildung 8 und Tabelle 5).

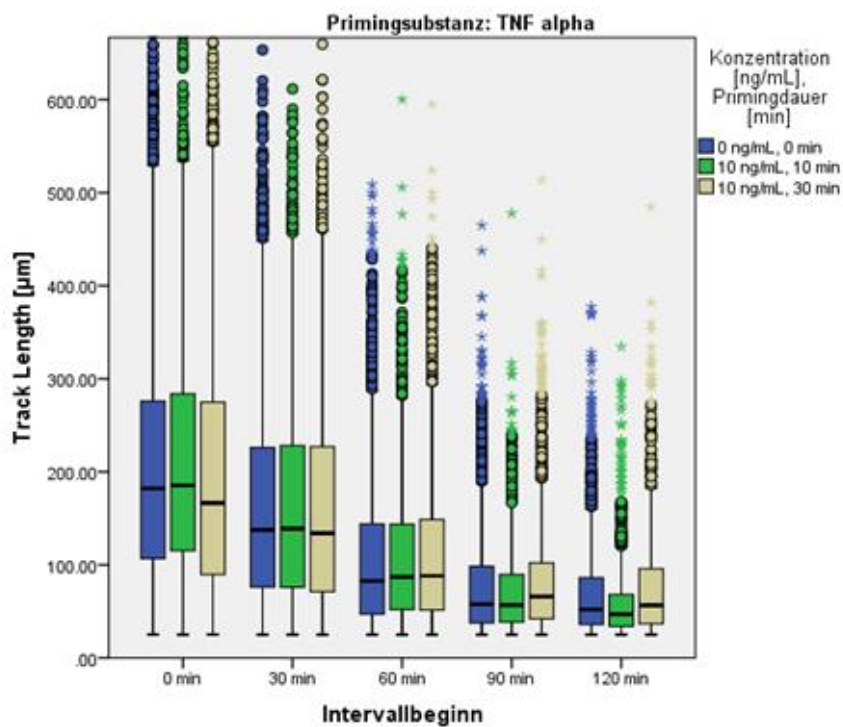


Abbildung 8 Versuchsreihe mit TNF-alpha, TL je 30 Minuten Messintervall unter Angabe der jeweiligen zugegebenen Konzentrationen und Primingdauer, N = 12 (0 ng/mL, 0 min), N = 8 (10 ng/mL, 10 min), N = 9 (10 ng/mL, 30 min)

Primingsubstanz	Primingdauer [min]	Intervallbeginn [min]	Median TL [μm]	Interquartilbereich [μm]
TNF- α	0	0	182	169
		30	138	150
		60	82,8	96,9
		90	57,8	60,9
		120	52,1	50,2
	10	0	185	169
		30	139	152
		60	86,9	91,5
		90	56,7	51,2
		120	47,0	34,5
	30	0	166	185
		30	134	156
		60	88,2	97,3
		90	66,1	60,2
		120	56,6	59,2

Tabelle 5 Medianwerte und Interquartilbereiche der TNF-alpha-Versuchsreihe

Dabei zeigt sich zum Beispiel in der nicht geprimten Gruppe aus der IL-6-Versuchsreihe eine Abnahme der zurückgelegten Strecke von den ersten untersuchten 30 Minuten mit einem Median von 153 μm auf die zweiten 30 Minuten mit 67,9 μm . In den späteren Zeitintervallen ab 1,5 Stunden nach Beobachtungsbeginn hält sich die TL auf konstant niedrigem Niveau oder nimmt zum Ende weiter gegen Null ab, wie sich beispielsweise in den Kontrollproben der Versuche mit IL-6 mit Medianwerten von 41,1 μm , 33,3 μm und 30,6 μm in den letzten drei Beobachtungsintervallen zeigt (siehe Abbildung 9 und Tabelle 6).

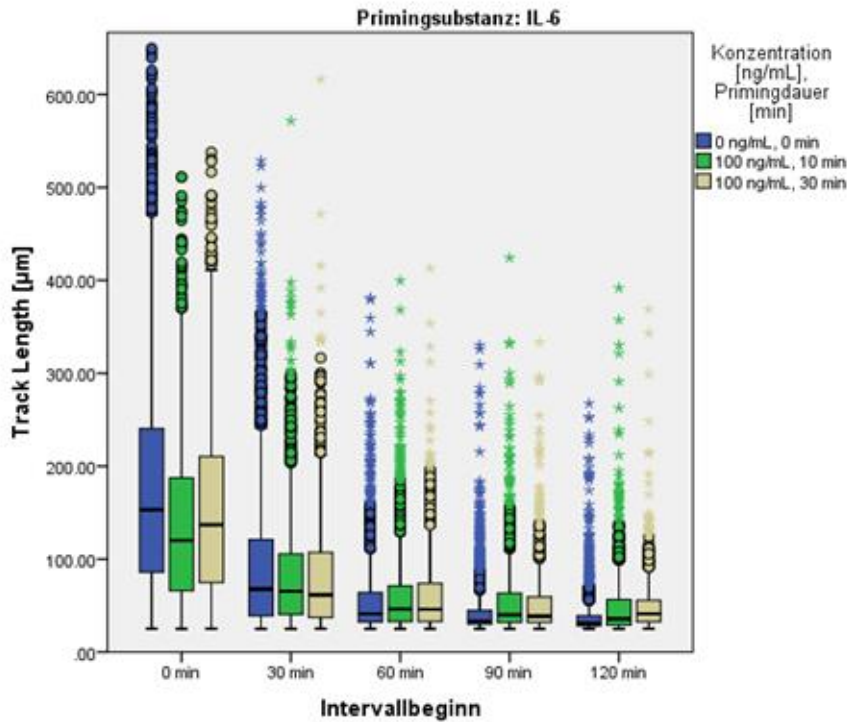


Abbildung 9 Versuchsreihe mit IL-6, TL je 30 Minuten Messintervall unter Angabe der jeweiligen zugegebenen Konzentrationen und Primingdauer, jeweils N = 8

Primingsubstanz	Primingdauer [min]	Intervallbeginn [min]	Median TL [μm]	Interquartilbereich [μm]
IL-6	0	0	153	155
		30	67,9	81,8
		60	41,1	31,6
		90	33,3	14,6
		120	30,6	10,8
	10	0	120	122
		30	65,4	65,1
		60	46,1	38,4
		90	39,8	31,6
		120	35,7	27,5
	30	0	137	136
		30	61,6	70,0
		60	45,9	41,1
		90	38,6	27,3
		120	41,0	23,0

Tabelle 6 Medianwerte und Interquartilbereiche der Versuchsreihe mit IL-6

Die gemessenen Werte der Track Length bleiben mit Werten von 48,3 μm und 44,1 μm in den letzten beiden Zeitintervallen der IL-1 β -Versuchsreihe über den gesamten Untersuchungszeitraum im positiven Bereich (siehe Tabelle 7).

Primingsubstanz	Primingdauer [min]	Intervallbeginn [min]	Median TL [μm]	Interquartilbereich [μm]
IL-1 β	0	0	174	175
		30	115	129
		60	59,5	56,5
		90	48,3	40,3
		120	44,1	35,1
	10	0	163	159
		30	113	125
		60	59,7	58,2
		90	45,3	38,7
		120	39,1	28,8
	30	0	159	168
		30	106	122
		60	61,3	56,2
		90	47,1	36,1
		120	42,4	34,1

Tabelle 7 Medianwerte und Interquartilbereiche der IL-1-beta-Versuche

Die Migration ist abgeschlossen, die Zellen bewegen sich aber weiterhin leicht, was mittels der Imaris-Software detektiert wird (siehe Abbildung 10).

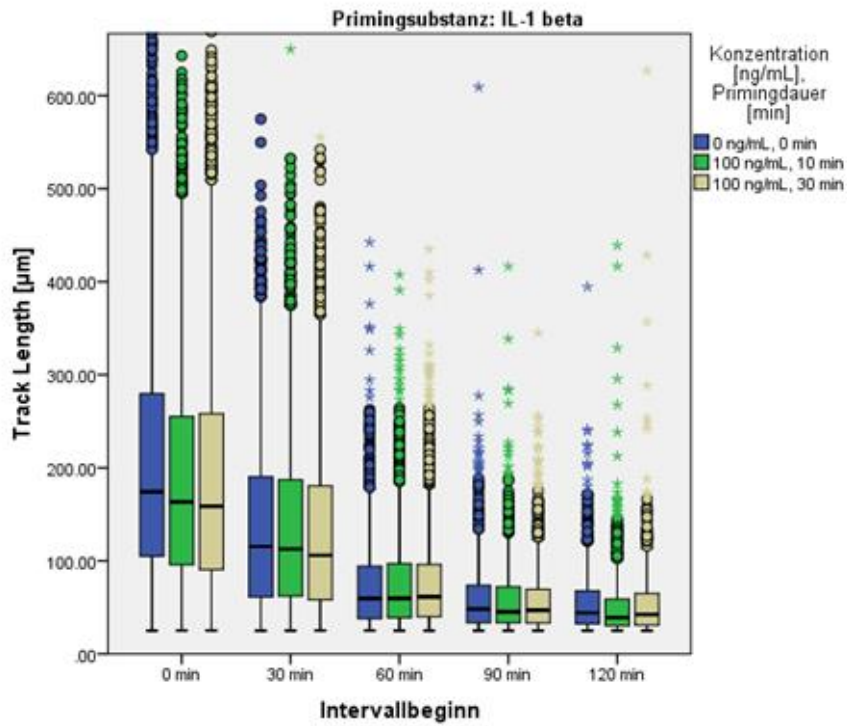


Abbildung 10 Versuchsreihe mit IL-1-beta, TL je 30 Minuten Messintervall unter Angabe der jeweiligen zugegebenen Konzentrationen und Primingdauer, jeweils N = 9

Zwischen den Versuchsreihen mit unterschiedlicher Primingdauer sowie der zugehörigen Kontrollgruppe zeigen sich bedingt durch die hohe Anzahl an gemessenen Tracks statistisch signifikante Unterschiede (min. $p < 0,05$). Diese sind durchgehend vorhanden in der Versuchsreihe mit IL-6, in der TNF- α -Reihe mit Ausnahme des zweiten Zeitintervalls zwischen 30 und 60 Minuten sowie bei den IL-1 β -Versuchen mit Ausnahme des dritten und vierten Intervalls im Zeitraum von 60 bis 120 Minuten (siehe Tabelle 8).

Primingsubstanz	Intervallbeginn [min]	Kruskal-Wallis-Test (p-Werte)	Paarweiser Vergleich der Primingdauern [min] bei Signifikanz im Gesamttest ($p < 0,05$)
TNF- α	0	<0,001	0 – 10: n.s. 0 – 30: 0,001 10 – 30: <0,001
	30	n.s.	n.s.
	60	0,022	0 – 10: n.s. 0 – 30: 0,033 10 – 30: n.s.
	90	<0,001	0 – 10: n.s. 0 – 30: <0,001 10 – 30: <0,001
	120	<0,001	0 – 10: <0,001

			0 – 30: n.s. 10 – 30: <0,001
IL-1 β	0	<0,001	0 – 10: <0,001 0 – 30: <0,001 10 – 30: n.s.
	30	0,008	0 – 10: n.s. 0 – 30: 0,013 10 – 30: 0,041
	60	n.s.	n.s.
	90	n.s.	n.s.
	120	<0,001	0 – 10: <0,001 0 – 30: n.s. 10 – 30: 0,036
IL-6	0	<0,001	0 – 10: <0,001 0 – 30: <0,001 10 – 30: <0,001
	30	0,001	0 – 10: 0,025 0 – 30: 0,001 10 – 30: n.s.
	60	<0,001	0 – 10: <0,001 0 – 30: <0,001 10 – 30: n.s.
	90	<0,001	0 – 10: <0,001 0 – 30: <0,001 10 – 30: n.s.
	120	<0,001	0 – 10: <0,001 0 – 30: <0,001 10 – 30: <0,001

Tabelle 8 Signifikanzen der TL zwischen den nicht geprinten, für 10 Minuten geprinten sowie 30 Minuten vorbehandelten Proben der TNF-alpha-, IL-1-beta- und IL-6-Versuchsreihe je Zeitintervall

Es wurden außerdem die Medianwerte für jedes Zeitintervall für die Versuchsgruppe Kontrolle, bestehend aus den Messungen ohne Zugabe einer Primingsubstanz, sowie die verschiedenen Priminggruppen mit den Datenpaketen für jede der drei Substanzen ohne die Unterscheidung der Dauer des Primings, bestimmt. Im daraus erstellten Liniendiagramm zeigt sich, dass der Abfall des TL Medians bei der Kontrollgruppe vom ersten auf den dritten Messpunkt steiler darzustellen ist als bei den geprimten Gruppen (siehe Abbildung 11).

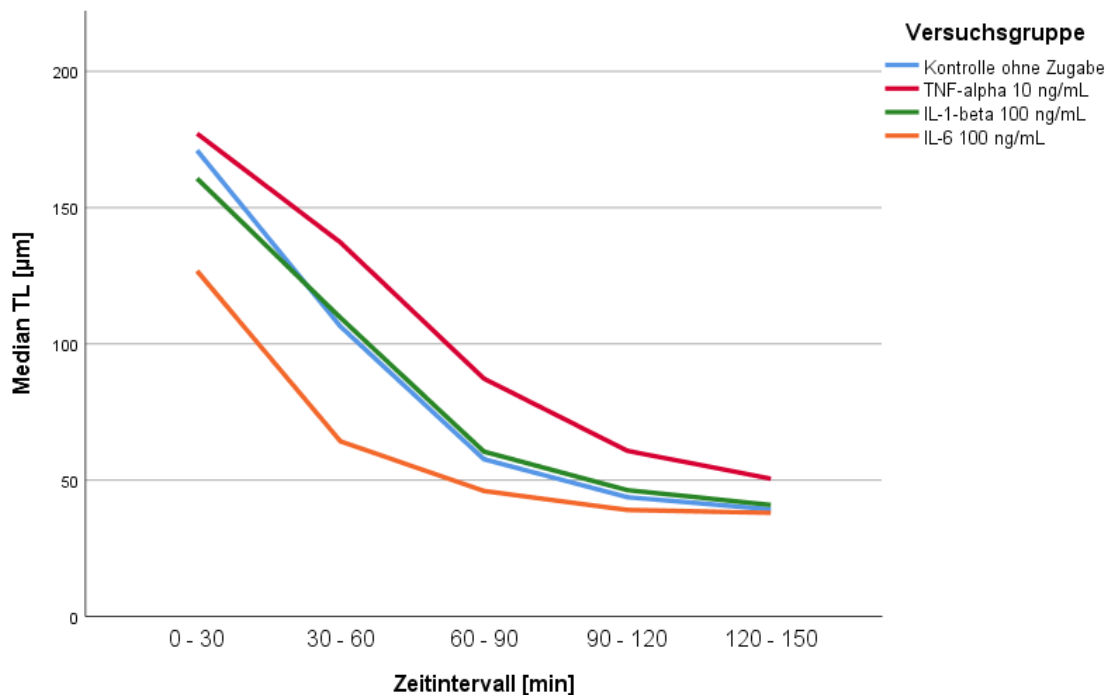


Abbildung 11 Mediane des Wertes Track Length je Versuchsgruppe je Zeitintervall, N = 29 (Kontrolle), N = 17 (TNF-alpha), N = 18 (IL-1-beta), N = 16 (IL-6)

Im Einzelnen zeigen die Versuche mit TNF- α und IL-1 β vom ersten auf das zweite Messintervall einen geringeren Abfall des Medianwertes als die Kontrollgruppe sowie IL-6. Vom zweiten auf das dritte Intervall zeigt sich eine ähnliche Medianabnahme bei der Kontrolle, TNF- α und IL-1 β , die Versuchsreihe mit IL-6 weist einen kleineren Rückgang auf. In den letzten beiden gemessenen Zeitintervallen ist bei den Versuchen mit TNF- α eine größere Abnahme der TL Mediane als bei der Kontrollgruppe sowie den IL-1 β -Versuchen mit ähnlichen Werten zu erkennen und bei der mit IL-6 geprimten Reihe findet sich eine weniger starke Abnahme (siehe Tabelle 9).

	0 – 30 min	30 – 60 min	60 – 90 min	90 – 120 min	120 – 150 min
Kontrolle	171	106	57,7	43,8	39,3
TNF- α	177	137	87,3	60,8	50,5
IL-1 β	161	110	60,5	46,3	40,9
IL-6	127	64,2	46,0	39,1	38,0

Tabelle 9 Mediane der Track Length [μm] je Zeitintervall und Versuchsgruppe

Im gesamten Verlauf stellt sich die Abnahme der medianen Zellmigrationsfähigkeit zwischen den vier Gruppen ohne signifikante Unterschiede dar ($p=0,392$).

5.2.2. Untersuchung der Parameter Track Displacement X und Track Displacement Y

Die TDX lässt eine gerichtete Wanderung in positiver x-Richtung erkennen, welche zu Beginn deutlich ist und sich im Verlauf der Zeit dem Nullpunkt annähert (nicht dargestellt). In der vorliegenden Grafik wird eine leichte Abnahme im Parameter TDX unter Priming in den ersten 30 Minuten der Beobachtung sichtbar (siehe Abbildung 12).

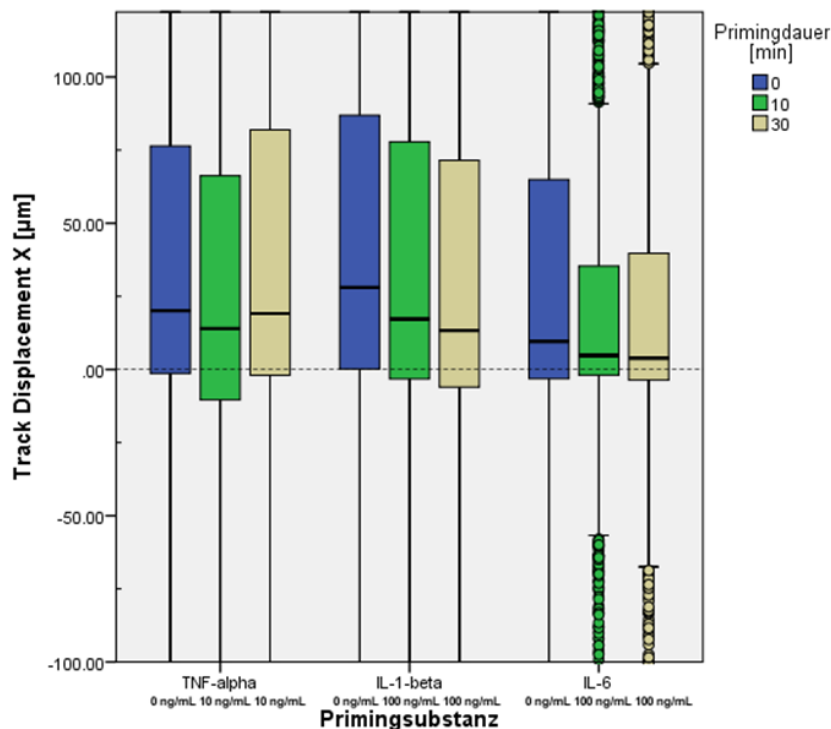


Abbildung 12 TDX in den ersten 30 Minuten, unterteilt nach verwendeter Primingsubstanz und Primingdauer, TNF-alpha-Reihe mit $N = 12$ (0 ng/mL, 0 min), $N = 8$ (10 ng/mL, 10 min), $N = 9$ (10 ng/mL, 30 min), IL-1-beta-Reihe mit jeweils $N = 9$, IL-6-Reihe mit jeweils $N = 8$

Im Median beträgt der Versatz der Anfangs- und Endpunkte der zurückgelegten Wegstrecke über alle Gruppen 13,4 μm in der ersten halben Stunde (siehe Tabelle 10).

Primingsubstanz	Primingdauer [min]	Median TDX [μm]	Interquartilbereich [μm]
TNF- α	0	20,1	77,8
	10	13,9	76,7
	30	19,1	83,9
IL-1 β	0	28,1	86,8
	10	17,2	81,1
	30	13,3	77,6
IL-6	0	9,61	68,1
	10	4,81	37,3
	30	3,86	43,3
Insgesamt	Insgesamt	13,4	71,4

Tabelle 10 Mediane und Interquartilbereiche der TDX je Primingsubstanz und Primingdauer

Zwischen den jeweiligen nicht vorbehandelten, 10 Minuten und 30 Minuten geprimten Zellen der verschiedenen substanzspezifischen Versuchsreihen zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede (min. $p < 0,05$, siehe Tabelle 11).

Primingsubstanz	TNF- α	IL-1 β	IL-6
Kruskal-Wallis-Test (p-Werte)	<0,001	<0,001	<0,001
Paarweiser Vergleich der Primingdauern [min]	0 – 10: <0,001 0 – 30: n.s. 10 – 30: <0,001	0 – 10: <0,001 0 – 30: <0,001 10 – 30: 0,001	0 – 10: <0,001 0 – 30: <0,001 10 – 30: n.s.

Tabelle 11 Signifikanzen im Wert TDX zwischen den nicht vorbehandelten, 10 Minuten und 30 Minuten geprimten Proben der TNF-alpha-, IL-1-beta- und IL-6-Versuchsreihen

Die Werte der TDY streuen über den gesamten Zeitraum von zweieinhalb Stunden in allen Gruppen um den Nullpunkt mit einem Median von 0,00 μm (siehe Tabelle 12).

Primingsubstanz	Primingdauer [min]	Median TDY [μm]	Interquartilbereich [μm]
TNF- α	0	-1,09	51,6
	10	0,0119	56,7
	30	-0,205	43,1
IL-1 β	0	0,00	55,8
	10	0,00	44,7
	30	-0,377	46,5
IL-6	0	1,32	37,8
	10	0,913	28,2
	30	0,649	30,1
Insgesamt	Insgesamt	0,00	43,7

Tabelle 12 Medianwerte und Interquartilbereiche der TDY, angegeben nach Primingsubstanz und Primingdauern

Der Übersichtlichkeit halber ist in der vorliegenden Grafik nur die erste halbe Stunde dargestellt (siehe Abbildung 13).

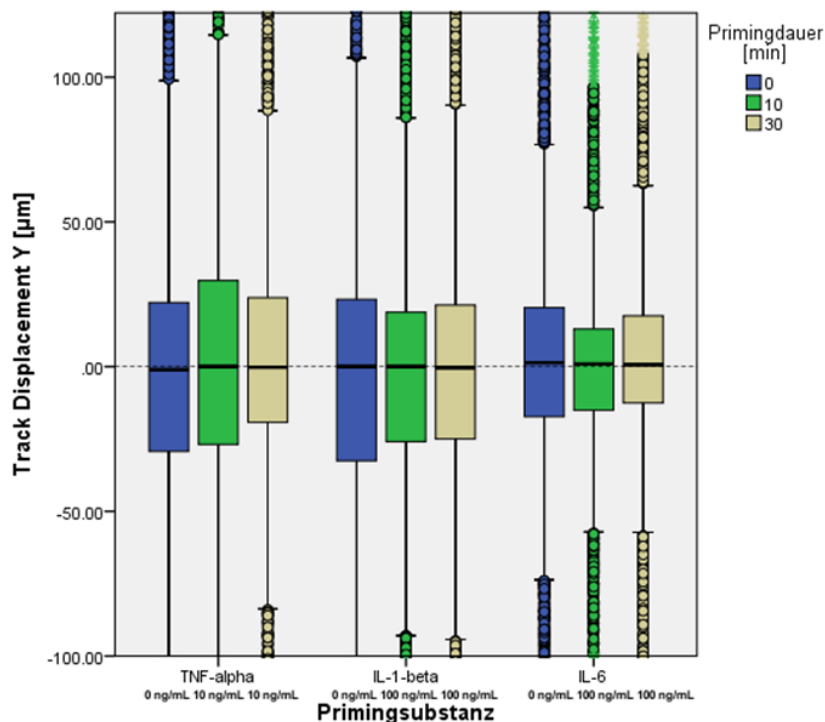


Abbildung 13 TDY in den ersten 30 Minuten, angegeben pro Primingsubstanz und Dauer des erfolgten Primings, TNF-alpha-Reihe mit N = 12 (0 ng/mL, 0 min), N = 8 (10 ng/mL, 10 min), N = 9 (10 ng/mL, 30 min), IL-1-beta-Reihe mit jeweils N = 9, IL-6-Reihe mit jeweils N = 8

Dabei lassen sich in der Versuchsreihe mit TNF- α signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlich vorbehandelten Proben erkennen (siehe Tabelle 13).

Primingsubstanz	TNF- α	IL-1 β	IL-6
Kruskal-Wallis-Test (p-Werte)	0,001	n.s.	n.s.
Paarweiser Vergleich der Primingdauern [min]	0 – 10: 0,002 0 – 30: 0,007 10 – 30: n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 13 Signifikanzen im Wert TDY zwischen den nicht vorbehandelten, 10 Minuten und 30 Minuten gepimten Proben der TNF-alpha-, IL-1-beta- und IL-6-Versuchsreihen

5.2.3. Untersuchung der Track Length sowie Track Straightness über den gesamten Zeitraum

Für die Betrachtung des spezifischen Migrationsverhaltens des einzelnen Granulozyten erfolgte das Tracking derselben Zelle über einen Zeitraum von 150 Minuten. Binnen dieser Zeit ist die gerichtete Wanderung abgeschlossen. Die zuvor festgesetzte Mindestbewegung von zwei Zelldurchmessern mit 25 μm je halbe Stunde wurde entsprechend der 2,5 Stunden auf 125 μm hochgesetzt, um äquivalente Auswertungsbedingungen zu schaffen. Ebenso wurden Tracks ausgeschlossen, die nicht über einen Zeitraum von mindestens 8000 Sekunden (133 Minuten) verfolgt werden konnten (siehe Abbildung 14). So wurde sichergestellt, dass nur anhaltende Bewegungen derselben Zelle eingeschlossen werden. Bezogen auf die jeweilige Substanz und die unterschiedlichen Primingdauern konnten zwischen 530 und 893 Tracks aufgezeichnet werden.

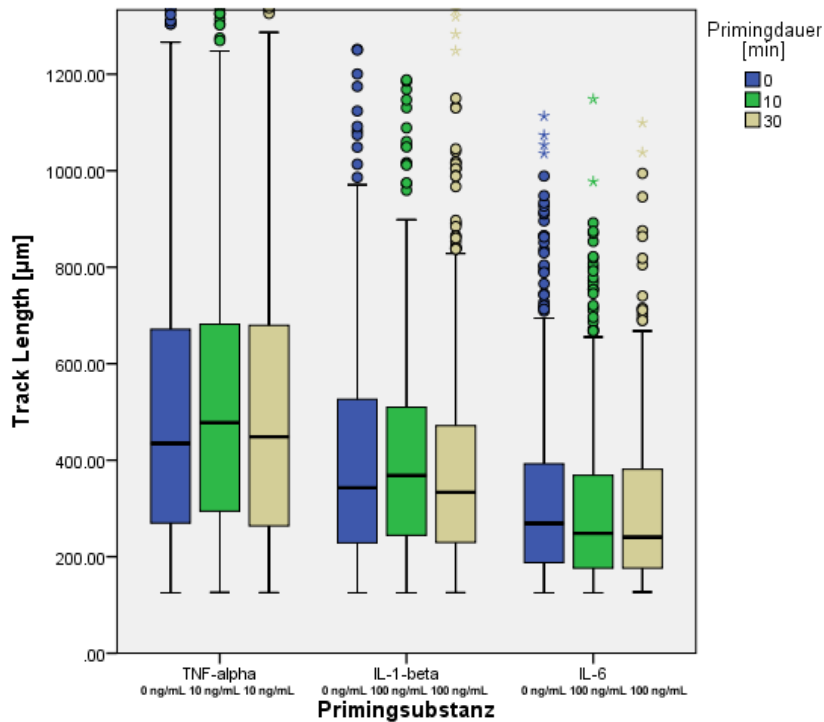


Abbildung 14 TL je Substanz je Primingdauer, analysiert über die gesamten 150 Minuten, TNF-alpha-Reihe mit N = 11 (0 ng/mL, 0 min), N = 8 (10 ng/mL, 10 min), N = 8 (10 ng/mL, 30 min), IL-1-beta-Reihe mit jeweils N = 8, IL-6-Reihe mit N = 7 (0 ng/mL, 0 min), N = 9 (100 ng/mL, 10 min), N = 7 (100 ng/mL, 30 min)

Über alle Gruppen zeigt sich ein Median der Track Length von 339 µm, was einem Äquivalent von 27 Zelldurchmessern entspricht. Mit einem maximalen Wert der zurückgelegten Gesamtstrecke bei 1864 µm in 150 Minuten wurde die Migration einer einzelnen Zelle mit dem 149-fachen des durchschnittlichen Granulozytendurchmessers von 12,5 µm detektiert (siehe Tabelle 14).

Primingsubstanz	Primingdauer [min]	Median TL [μm]	Interquartilbereich [μm]	Maximum TL [μm]
TNF- α	0	435	402	1864
	10	478	389	1495
	30	449	417	1664
IL-1 β	0	343	298	1252
	10	369	265	1347
	30	333	242	1334
IL-6	0	269	205	1113
	10	248	193	1148
	30	241	206	1539
Insgesamt	Insgesamt	339	300	1864

Tabelle 14 Medianwerte und Maxima der Track Length, beobachtet über 150 Minuten je Primingsubstanz und Dauer

Die verschieden vorbehandelten Gruppen der substanzspezifischen Versuchsreihen unterscheiden sich nicht signifikant (siehe Tabelle 15).

Primingsubstanz	TNF- α	IL-1 β	IL-6
Kruskal-Wallis-Test (p-Werte)	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 15 Signifikanzen der TL, gemessen über 150 Minuten

Die Track Straightness trifft eine Aussage über die Zielgerichtetheit der Zellbewegung und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Dieser Parameter zeigt bei 10-minütigem Priming mit der Substanz TNF- α eine statistisch signifikante Zunahme sowie bei 30-minütigem Priming mit IL-1 β im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe eine Abnahme durch das Priming (siehe Abbildung 15).

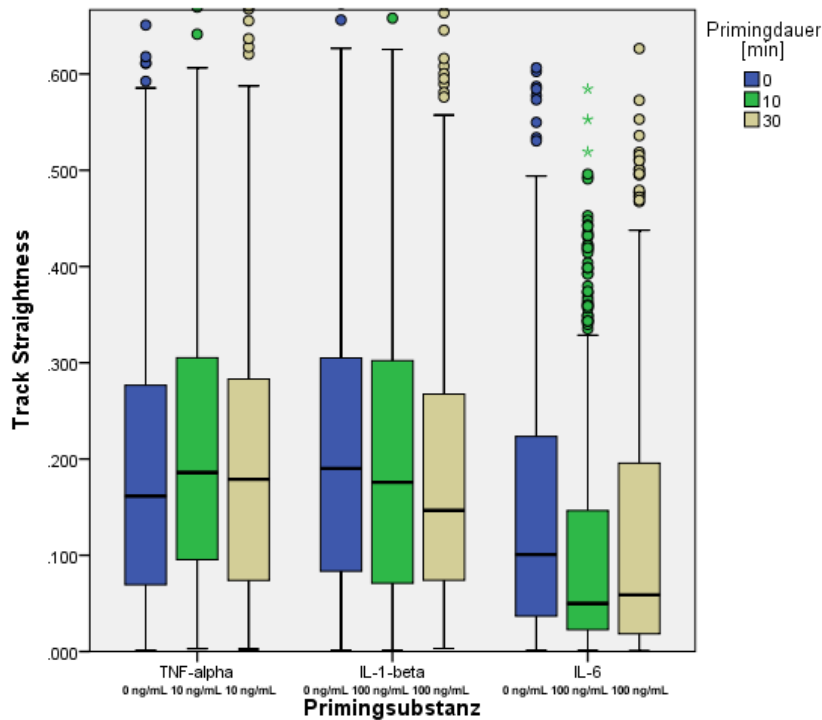


Abbildung 15 Track Straightness je Substanz je Primingdauer, analysiert über die gesamten 150 Minuten, TNF-alpha-Reihe mit N = 11 (0 ng/mL, 0 min), N = 8 (10 ng/mL, 10 min), N = 8 (10 ng/mL, 30 min), IL-1-beta-Reihe mit jeweils N = 8, IL-6-Reihe mit N = 7 (0 ng/mL, 0 min), N = 9 (100 ng/mL, 10 min), N = 7 (100 ng/mL, 30 min)

Bei 10-minütiger Vorbehandlung mit IL-6 (TS = 0,0500) sowie 30-minütiger Präinkubation (TS = 0,0589) zeigt sich eine Abnahme der TS gegenüber der Kontrollgruppe mit einem Wert von 0,101. Die Dauer des Primings hat hier demnach keine Auswirkung (siehe Tabelle 16).

Primingsubstanz	Primingdauer [min]	Median TS [μm]	Interquartilbereich [μm]	Maximum TS [μm]
TNF- α	0	0,162	0,208	0,651
	10	0,186	0,211	0,749
	30	0,179	0,209	0,671
IL-1 β	0	0,190	0,222	0,749
	10	0,176	0,232	0,658
	30	0,147	0,194	0,716
IL-6	0	0,101	0,187	0,695
	10	0,0500	0,124	0,687
	30	0,0589	0,177	0,626
Insgesamt	Insgesamt	0,140	0,215	0,749

Tabelle 16 Mediane, Maximalwerte und Interquartilbereiche der drei Versuchsreihen, bei Analyse über 150 Minuten

Die Werte der TS unterscheiden sich je substanzspezifischer Versuchsreihe zwischen der Kontrolle, des 10-minütigen und 30-minütigen Primings signifikant (siehe Tabelle 17).

Primingsubstanz	TNF- α	IL-1 β	IL-6
Kruskal-Wallis-Test (p-Werte)	0,009	0,002	<0,001
Paarweiser Vergleich der Primingdauern [min]	0 – 10: 0,006 0 – 30: n.s. 10 – 30: n.s.	0 – 10: n.s. 0 – 30: 0,002 10 – 30: n.s.	0 – 10: <0,001 0 – 30: <0,001 10 – 30: n.s.

Tabelle 17 Signifikanzen im Parameter TS zwischen den nicht vorbehandelten, den 10 Minuten und 30 Minuten geprimten Proben der substanzspezifischen Versuchsreihen

5.3. ROS-Produktion und NETosis

Da sich kein relevanter Primingeffekt zeigt, sollen die jeweiligen Gruppen für die Beurteilung der ROS-Produktion sowie der NETosis zusammengefasst werden. Für die Darstellung der Farbstoffreaktionen beschränken wir uns hier auf die Probanden der Versuchsreihe mit IL-6 (siehe Abbildung 16).

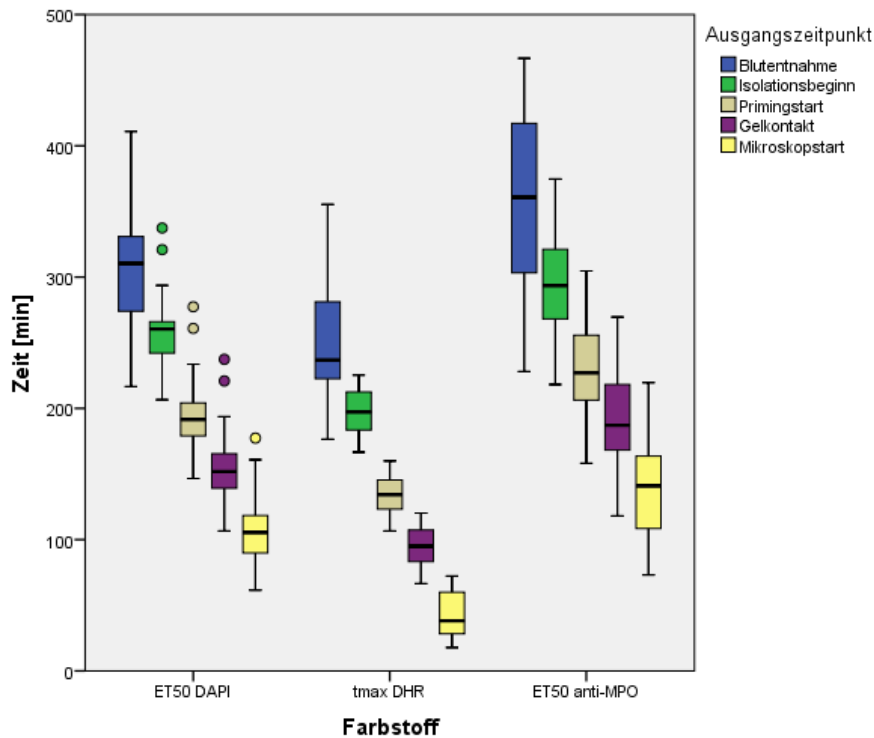


Abbildung 16 Zeitpunkte halbmaximaler Farbstoffreaktion für DAPI (ET50-Wert) und anti-MPO-Antikörper (ET50-Wert) sowie Zeitpunkt maximaler ROS-Produktion (tmax) der Versuchsreihe mit IL-6, gemessen von verschiedenen Ausgangszeitpunkten in der Versuchsdurchführung, N = 22 – 26 für DAPI, N = 20 für anti-MPO-Antikörper, N = 22 für Rhodamin

Der Median der maximalen ROS-Produktion liegt bei 38,2 Minuten gemessen ab Mikroskopstart. Die DAPI-positive Fläche erreicht ihren halbmaximalen Wert im Median 105 Minuten nach Mikroskopstart (siehe Tabelle 18). Dies zeigt eine charakteristische Korrelation zwischen dem Abfall der Migration der Granulozyten über die Zeit und einer bereits währenddessen einsetzenden Bildung reaktiver Sauerstoffradikale auf, sowie die Abhängigkeiten zwischen dem Ende der gerichteten Wanderung und der damit einhergehenden NETosis.

Fluoreszenzreaktion	Ausgangszeitpunkt	Median [min]	Interquartilbereich [min]	Minimum [min]	Maximum [min]
tmax Rhodamin- Fluoreszenz	Blutentnahme	237	64,9	177	355
	Isolationsbeginn	197	29,9	167	225
	Primingstart	134	25,1	107	160
	Gelkontakt	95,0	26,1	66,6	120
	Mikroskopstart	38,2	32,1	17,9	72,3
ET50 DNA-DAPI Addukt	Blutentnahme	310	57,4	217	411
	Isolationsbeginn	260	30,0	207	337
	Primingstart	191	26,2	147	277
	Gelkontakt	152	27,1	107	237
	Mikroskopstart	105	30,0	61,6	177
ET50 Anti-MPO- Antikörper APC konjugiert	Blutentnahme	361	115	228	467
	Isolationsbeginn	294	56,6	218	375
	Primingstart	227	50,3	158	305
	Gelkontakt	187	52,2	118	270
	Mikroskopstart	141	59,9	73,1	220

Tabelle 18 Mediane mit Interquartilbereichen, Maxima sowie Minima der Zeitwerte der Fluoreszenzreaktionen gemessen in Abhängigkeit verschiedener Zeitpunkte in der Versuchsdurchführung

In Abhängigkeit vom Ausgangszeitpunkt der Messung ist eine höhere zeitliche Streuung der detektierten Farbstoffreaktionen bei Betrachtung ab dem Zeitpunkt der Blutentnahme als bei der Zeitzählung ab den späteren Versuchsschritten ersichtlich. Dies lässt sich mithilfe des Interquartilbereiches darstellen. Dieser gibt beim Boxplot die Größe der Box an und damit die 50 % der Werte, die um den Median liegen, wieder. Hier zeigt sich somit beispielhaft für die Rhodamin-Fluoreszenz die zeitliche Variabilität der Abstände der Blutentnahme (Interquartilabstand 64,9 min) zum Isolationsbeginn (Interquartilbereich 29,9 min) bei den einzelnen Versuchen. Es lässt sich erkennen, dass eine Lagerung des abgenommenen Blutes im Rahmen weniger Stunden vor Beginn der Aufreinigung im späteren Verlauf keine verfrühten oder verzögerten Farbstoffreaktionen bedingt. Der Abstand der Blutentnahme vom Zeitpunkt des Mikroskopstarts variierte über alle Versuche zwischen 2 Stunden und 35 Minuten und 5 Stunden und 25 Minuten. Ab dem Beginn des Primingvorgangs war der zeitliche Abstand zum Mikroskopieren mit 80 bis 100 Minuten nahezu identisch.

5.4. Inter- und intraindividuelle Unterschiede bei Probanden

Die Track Length zeigt in Hinblick auf inter- sowie intraindividuelle Unterschiede eine große Schwankungsbreite. Bei Probanden mit mehreren Messungen wurde die prozentuale Medianabweichung vom intraindividuellen Mittelwert der TL Mediane berechnet (siehe Abbildung 17 und Tabelle 19).

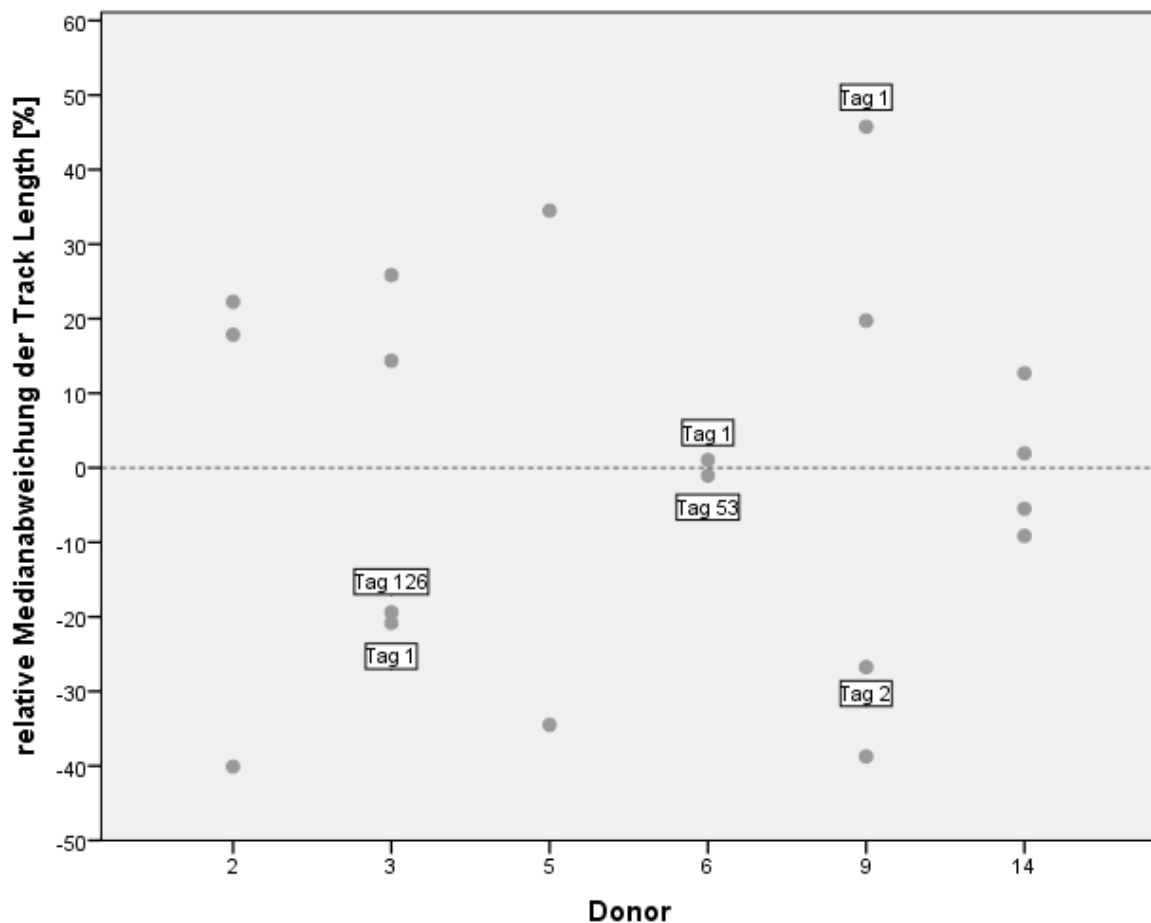


Abbildung 17 Relative prozentuale Medianabweichung vom Mittelwert der donorspezifischen TL Mediane in der ersten halben Stunde mit beispielhafter Angabe dreier zeitlicher Abstände der Versuchsdurchführung

Bei demselben Spender (Donor 9) wurde bei einem zeitlichen Abstand zwischen den Blutentnahmen von weniger als 30 Stunden ein deutlicher Medianunterschied in der TL von 117 μm zu 234 μm in der ersten halben Stunde gemessen. Betrachtet man Probanden zwischen deren Spenden längere Zeiträume von zwei beziehungsweise vier Monaten lagen (Donor 3 und Donor 6), finden sich zum Teil beinahe identische Werte (siehe Tabelle 19). Hier lässt sich die intraindividuelle Abhängigkeit der Ergebnisse erkennen.

Donor	Median TL [μm] je Versuch	Relative Medianabweichung [%] vom Mittelwert der TL Mediane
2	154	17,9
	159	22,3
	78,1	-40,1
3	188	25,8
	171	14,4
	120	-19,4
	118	-20,8
5	108	-34,5
	222	34,5
6	198	-1,05
	203	1,05
9	234	45,7
	117	-26,7
	98,3	-38,7
	192	19,7
14	130	-9,14
	146	1,94
	161	12,7
	135	5,49

Tabelle 19 Medianwerte der TL und relative Medianabweichung vom Mittelwert der donorspezifischen TL Mediane, angegeben nach Donor und Einzelversuchen

Die TL-Werte variieren über das gesamte Probandenklientel. Dies zeigt, dass die Messungen auch eine bedeutende interindividuelle Komponente aufweisen (siehe Tabelle 20).

Donor	2	3	5	6	9	14
Mittelwert der TL Mediane [μm]	130	149	165	200	160	143
Standardabweichung	45,4	35,4	80,7	2,97	63,5	13,8

Tabelle 20 Mittelwerte der donorspezifischen TL Mediane in der ersten halben Stunde

6. Diskussion

Zur experimentellen Untersuchung bestimmter Zellen wird üblicherweise eine Isolierung der jeweiligen Population benötigt. In der Literatur finden sich hierzu zahlreiche Vorgehensweisen, wobei es keine Übereinstimmung über die beste Variante für Studien zur Zellfunktionalität gibt. Mosca et al. verglichen 2016 sowohl die Effizienz als auch die Beeinflussung von chemotaktischer Aktivität und Phagozytoseleistung mehrerer Isolationsmethoden. So zeigen die Dichtegradientenzentrifugation nach Percoll und Ficoll gegenüber spontaner Sedimentation eine ähnliche Zellausbeute bei einem höheren Reinheitsgrad, aber auch eine erhöhte Chemotaxis mit resultierendem geringeren Ansprechen auf einen nachfolgenden Stimulus. (41) Die in vorliegender Arbeit verwendete Aufreinigungsmethode stellt eine positive Selektion mithilfe von Micro Beads dar, welche mit anti-CD15-Antikörpern konjugiert sind. Eine Auftrennung wird hier möglich durch CD15-Antigenexpression auf der Granulozytenoberfläche, die signifikant höher ist als bei Monozyten und Lymphozyten. (42) Die Isolierung stellt einen Stressfaktor für die Granulozyten dar und führt damit bereits zu einer Aktivierung der Zellen. (22) Die positive Selektion zeigt hierbei gegenüber den zuvor genannten anderen Methoden der Isolierung eine nachfolgend höhere ROS-Produktion bei Triggerung durch fMLP. Dies erlaubt den Rückschluss, dass in diesem Fall eine geringere Voraktivierung während der Isolation stattgefunden hat und so die Fähigkeit zum anschließenden Priming stärker erhalten bleibt. Das damit verbundene bessere Ansprechen auf den fMLP-Stimulus lässt diese Variante der Aufreinigung als Methode der Wahl zur Untersuchung der Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten bei Granulozyten erscheinen. (43) Betrachtet man die Expression verschiedener Oberflächenmarker wie CD15, CD16, CD64, CD62L und CD66b auf der Zelloberfläche der Granulozyten zeigen sich Unterschiede in Abhängigkeit von der Isolationsmethode, sodass diese in die Bewertung der Funktionalität der Immunzellen miteinbezogen werden muss. (43) Trotz der derzeitigen Verwendung von Vollblut in einigen Projekten wird für viele Studien dennoch eine potenziell aktivierende Aufreinigung benötigt. Mit dem hier erfolgten Vergleich der Isolationsmethoden kann die These der Beeinflussung der Migrationsergebnisse durch derartige Vorbehandlung unterstützt werden. Die CD15-Micro Beads gestützte Aufreinigung zeigt hierbei eine geringere Voraktivierung der Zellen mit dem Ergebnis einer weniger stark ausgeprägten Migrationsleistung. Die Isolierung mittels Doppelgradientenzentrifugation führt zu höheren TL-Werten, dies korreliert mit dem größeren Stress auf die Granulozyten während der Aufreinigung.

Mit dem stets identischen Versuchsaufbau der parallelen Beobachtung der Kontrolle sowie der 10 Minuten und 30 Minuten vorbehandelten Proben in den drei Kanälen derselben Kammer wurden für alle Gruppen gleiche Bedingungen erzielt, sodass eine hohe Vergleichbarkeit gegeben ist. Mit dem verwendeten Beobachtungssystem können idealerweise die Migrationsbewegungen einer großen Anzahl von Zellen in alle Richtungen beobachtet werden. Es können somit alle Bewegungen aufsummiert und die tatsächliche Migration dargestellt werden, sowie eine Aussage über die Zielgerichtetheit der Zellbewegungen zum eingesetzten Lockstoff hin getroffen werden.

Die mikroskopischen Bilddaten werden in die Imaris-Software eingepflegt und dort verarbeitet. Durch die Variation unterschiedlicher Einstellungsparameter kann der Algorithmus des Programms auf die studienspezifisch relevanten Bedingungen zugeschnitten werden. So können nach der Berechnung der gewünschten Werte die gewonnenen Daten exportiert und weiterverarbeitet werden. Die Software differenziert bei entsprechender teilweise arbeitsintensiver Modifikation durch den Auswertenden die Zellstrukturen von möglichen Artefakten in den Aufzeichnungen und verfolgt diese bei der Migration relativ zuverlässig. Bisweilen kann das Verlieren eines Tracks oder der Sprung von einer Zelle auf eine andere durch die Automatik beobachtet werden. Insgesamt bietet dieses Programm eine gute Möglichkeit eine große Anzahl an Zellen zu untersuchen und die negativen Aspekte können vom Auswertenden durch zahlreiche Einstellungsmöglichkeiten minimiert werden. (38)

Als Ausgangspunkt dieser Arbeit diente die Fragestellung nach dem Primingeffekt von TNF- α sowie IL-1 β . Diese Substanzen wurden bereits in einer vorangegangenen Arbeit untersucht. Die Existenz von Priming sowie die notwendigen Bedingungen und genauen Effekte konnten jedoch nicht abschließend geklärt werden (siehe 2.1. Fragestellung). Dort fanden sich Tendenzen eines stattgefundenen Primings bei zytometrischen Messungen des oxidativen Bursts. Bei der manuell getrackten Zellmigration ließ sich erkennen, dass die Migrationsfähigkeit durch Priming tendenziell über eine längere Zeit erhalten bleibt und zielgerichteter stattfindet. Es wurden die vorliegenden Konzentrationen von 10 ng/mL bei TNF- α und 100 ng/mL bei IL-1 β beibehalten, um hier eine Vergleichbarkeit zwischen den Arbeiten zu schaffen. (31) In der Literatur findet sich die Verwendung ähnlicher Konzentrationen. (22, 24, 44, 45) So wurde in zahlreichen Studien TNF- α als Primingsubstanz verwendet, zu IL-1 β ist die bisherige Datenlage deutlich begrenzter. Dennoch zeigen die vorhandenen Publikationen Effekte des

Primings mit diesen Substanzen auf, weshalb diese These mit unserer Methodik untersucht wurde. Elbim et al. untersuchten 2009 den Primingeffekt auf die Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten in Vollblut mittels Durchflusszytometrie, wobei sich bei TNF- α eine erhöhte Produktion, bei IL-1 β sowie IL-6 jedoch keine Wirkung zeigten. (34) Dewas et al. zeigten im Jahr 2003 eine fünffache Erhöhung der ROS-Produktion im Zuge einer Phosphorylierung von bestimmten p47^{phox}-Peptiden bei 20-minütiger Vorbehandlung mit TNF- α , bei IL-1 β war kein Effekt zu erkennen, was in dieser Versuchsreihe mit einer nicht erkennbaren Induktion der p47^{phox}-Phosphorylierung korrelierte. (24) Gegenteilige Effekte mit IL-1 β , erklärt durch die Aktivierung der MKK 3-p38 MAPK Kaskade, beschrieb Suzuki et al. 2001. (46) Brandolini et al. berichtete 1997 über eine erhöhte Elastasefreisetzung nach 10-minütiger beziehungsweise in vergleichbarer Weise nach 30-minütiger Vorbehandlung mit 100 ng/mL IL-1 β . (44) 1994 fanden Daniels et al. einen Anstieg des Prozentsatzes reaktiver Sauerstoffspezies produzierender Zellen bei Priming sowohl mit TNF- α als auch IL-1 β sowie IL-6. (47) Im selben Jahr berichteten Elbim et al. bei Vollbluttestungen von einem Primingeffekt in Form einer erhöhten ROS-Produktion bei TNF- α sowie IL-1 β , verneinten diesen jedoch im Versuch mit IL-6. Des Weiteren unterschieden sie zwei Subpopulationen nach Priming mit TNF- α und nachfolgender Stimulierung mit fMLP. Hier zeigte sich eine Population vermehrter Ansprechbarkeit, die andere Gruppe ließ diese Wirkung nicht erkennen. Es konnte also der Anteil geprimter Zellen je nach zugesetzter Substanz unterschieden werden. (20) Ebenfalls den Anteil der Zellen in einem geprimten Zustand untersuchten Bass et al. bereits 1986 bei Patienten mit akuter bakterieller Infektion. Sie fanden eine hohe Variabilität zwischen 0 und 80 %, was in einer sehr unterschiedlichen Ansprechbarkeit der Granulozyten im Fall einer notwendigen Immunabwehr resultiert. Bei diesen sich in einem natürlichen Primingzustand befindlichen Zellen konnte im Flowzytometer eine bis zu 4,6 Mal erhöhte Oxidationsleistung beobachtet werden. (21) Borish et al. berichteten 1989 über eine durch IL-6-Priming induzierte Modulation der Fähigkeit zum oxidativen Burst bei fMLP-Stimulation. (48) Zu demselben Ergebnis gelangten im gleichen Jahr Kharazmi et al. (49) 2014 untersuchte Wright et al. den Zusammenhang zwischen Neutrophilen und IL-6 und verglich eine gesunde Probandengruppe mit Patienten mit rheumatoider Arthritis. In Hinblick auf den oxidativen Burst konnte kein Effekt des IL-6 beobachtet werden. Bei alleiniger Behandlung mit IL-6 zeigte sich kein chemotaktischer Effekt verglichen mit zufälliger Migration. Wurde die Anzahl migrierter Zellen auf das Chemoattractant IL-8 hin nach Vorbehandlung mit dem IL-6 betrachtet, so war eine

vermehrte Chemotaxis zu erkennen. Aufgrund dieser Versuchsreihen haben wir uns für die Stimulation der Zellen mit 100 ng/mL des IL-6 als Primingsubstanz entschieden. Die Primingdauer betrug bei Wright et al. eine Stunde. Für die bessere Vergleichbarkeit mit den übrigen getesteten Substanzen haben wir die Inkubationszeiten von 10 Minuten und 30 Minuten beibehalten. (50) Es zeigt sich somit ein widersprüchliches Bild, ob ein Priming mit den vorher genannten Substanzen Auswirkungen auf die Migration sowie die ROS-Produktion hat.

Als Chemoattractant wurde fMLP verwendet, welches neben IL-8 den am häufigsten verwendeten Stimulus darstellt und auch zur Untersuchung der ROS-Produktion Anwendung findet. (51, 18, 22, 52, 20, 46) Das Tracking der Zellbewegungen lässt in allen Gruppen eine gerichtete Migration in positiver x-Richtung erkennen, welche im Versuchsaufbau der ibidi-Chemotaxiskammern stets die Wanderung auf das mit dem Chemoattractant fMLP gefüllte Reservoir anzeigt. Unter diesen Bedingungen bildet sich in dem Beobachtungskanal ein mit zunehmendem Abstand zum Reservoir abnehmendes Konzentrationsgefälle. In Korrelation dazu betrachtet man die Bewegung in y-Richtung, die über alle Zeitintervalle eine Streuung um Null zeigt. Somit kann der verwendete Gradient des Formylpeptids verifiziert werden und dient als Grundlage der weiteren Migrationsuntersuchung.

Die gemessenen Werte der Track Length bleiben bis zum Ende der Beobachtungszeit über dem Nullpunkt. Dieses Phänomen lässt sich mit minimalen Bewegungen nach Ablauf der Migration erklären, die von der Imaris-Software detektiert werden. Um einer Einbeziehung derartiger Artefakte in die Auswertung vorzubeugen, wurden Tracks mit einer Gesamtlänge von weniger als 25 μm aus den Berechnungen ausgeschlossen.

Zwischen der Kontrolle und den für 10 Minuten oder 30 Minuten mit der Primingsubstanz inkubierten Versuchsgruppen sind statistisch signifikante Unterschiede in der TL, gemessen in Zeitintervallen je 30 Minuten, zu erkennen. Ebenso ergibt sich eine statistische Signifikanz zwischen den drei Gruppen bei den Werten der TDX in der ersten halben Stunde. Die vorbehandelten Proben zeigen hier weniger Bewegung in x-Richtung. Diesen Unterschieden kann jedoch keine klinische Relevanz im menschlichen Körper beigemessen werden, da die effektiven Differenzen in der Bewegung im Rahmen einiger μm als minimal zu bezeichnen sind. Im Parameter TL zeigt sich sowohl bei der Auswertung mit Intervallen je 30 Minuten als auch über 150 Minuten eine Tendenz mit niedrigeren Werten bei der Versuchsreihe mit IL-1 β verglichen mit TNF- α sowie eine erneute Verringerung bei IL-6 im Vergleich zu IL-1 β . Bei der TDX liegen die Werte von IL-6 unter denen der anderen beiden Versuchsgruppen. Die Variabilität der TL-Werte der verschiedenen Versuchsreihen lässt sich am ehesten mit der

Reihenfolge der Durchführung und dem verbesserten Handling erklären, was zu weniger Voraktivierung und damit zu weniger artifiziell erzeugter Anregung zur Migration führt. Die TNF- α -Versuche sind eher zu Beginn des experimentellen Arbeitens anzusiedeln, gefolgt von IL-1 β sowie der Versuchsreihe mit IL-6 in der Schlussphase. Somit können diese abweichenden Werte als Folge einer verbesserten Handhabung der Methodik im Verlauf der Versuchsdurchführung diskutiert werden. Bei den geprimten Proben wird zunächst eine eher niedrigere TL im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes wird die Tendenz einer höheren TL bei erfolgtem Priming, am deutlichsten bei IL-6, sichtbar. Dies stützt die These einer zeitlichen Verlängerung der Migrationsfähigkeit bei zunächst erfolgter Hemmung des Bewegungsausmaßes in der ersten Stunde. Bei der Betrachtung der Track Straightness zeigen sich zwischen einzelnen Gruppen signifikante Unterschiede, allerdings sind die effektiven Differenzen minimal und die Signifikanz ist hier eher auf den großen Stichprobenumfang zurückzuführen.

Durch den Nachweis erheblicher intra- und interindividueller Unterschiede in den Ergebnissen zeigt sich im Nachgang die Wichtigkeit der parallelen Testung der Primingvarianten mit den jeweiligen Kontrollgruppen. In unserem Versuchsaufbau wurde stets ein Kanal der Chemotaxiskammer der Kontrolle vorgehalten, um eine direkte Vergleichbarkeit zu schaffen. Die Spezifitäten einzelner Probanden finden in den Forschungsarbeiten kaum Betrachtung. Lediglich 1986 erwähnten Bass et al. eine Variabilität in der Dauer des oxidativen Bursts zwischen 15 und 30 Minuten in ihren Messungen in Abhängigkeit der verschiedenen Donoren. (21)

Außerdem können wir darstellen, dass der Zeitpunkt der Blutentnahme bei der Versuchsdurchführung, sofern die Variabilität innerhalb weniger Stunden liegt, keine relevanten Auswirkungen auf die Versuchsergebnisse hat. Dies erleichtert also die Probandenakquise in Hinblick auf ein großzügigeres Festsetzen des Entnahmezeitpunktes.

Insgesamt ist in der momentanen Forschungslage ein auf der Messung der reaktiven Sauerstoffmetaboliten gelegener Schwerpunkt erkennbar. Hierbei liegt das Augenmerk im Allgemeinen auf der freigesetzten Menge, im Unterschied dazu betrachten wir den Zeitpunkt zu dem die Granulozyten ihre maximale Produktionsaktivität erreichen. (20, 24, 34, 46) Dabei lässt sich mit unserer Methodik kein früheres oder späteres Einsetzen der ROS-Produktion oder der NETosis bei erfolgtem Priming erkennen. In diesem Sinne sollten die zeitlichen Aspekte dieser Reaktionen weiter untersucht werden, um einen besseren Einblick in die Funktionalität der Granulozyten zu erhalten. Ein Effekt von Priming auf die NETosis wurde in der Literatur bisher unzureichend erforscht, sodass hierauf zukünftig ein Augenmerk gelegt

werden kann. Ebenso in Hinblick auf die Migration konnten wir interessante Beobachtungen feststellen, sodass dieses Gebiet weiter beforscht werden sollte.

7. Zusammenfassung

Zum Abschluss lässt sich sagen, dass keine relevanten Unterschiede in Hinblick auf eine Modulation der Granulozytenfunktionalität in Form eines Primingeffektes mit den untersuchten Substanzen TNF- α , IL-1 β und IL-6 erkennbar sind. Somit können wir die Existenz eines Primings mit der von uns verwendeten Methodik nicht bestätigen. Mit dem Schwerpunkt auf den zeitlichen Abläufen der ROS-Produktion sowie NETosis, also einem möglichen früheren oder späteren Einsetzen, lässt sich kein Priming erkennen. Das Ausmaß der Migration zeigt keine Verstärkung oder Abnahme durch die Vorbehandlung, sodass wir auch hier keinen Effekt sehen. Mit dem verwendeten System kann der verwendete Lockstoff fMLP als geeigneter chemotaktisch wirksamer Stimulus verifiziert werden. Die Zellmigration sowie die stattfindende ROS-Produktion und NETosis lassen sich mit dieser Methodik der mikroskopischen Untersuchung mithilfe der ibidi-Kammer und der Auswertung mittels der Imaris-Software gut beobachten und es kann ein genauer Einblick in das Verhalten der Granulozyten gewonnen werden. Außerdem führen unsere Untersuchungen zu der Feststellung starker inter- sowie intraindividuelle Unterschiede in den Ergebnissen der getesteten Probanden, was eine parallele Interpretation mit der zugehörigen Kontrollgruppe erforderlich macht. Eine Beeinflussbarkeit der Ergebnisse durch die verwendete Aufreinigungsmethode können wir bestätigen und finden eine im Vergleich mit der Doppelgradientzentrifugation geringere Voraktivierung der Granulozyten bei der positiven Selektion.

8. Abkürzungsverzeichnis

APC - Allophycocyanin

ARDS – acute respiratory distress syndrome

BSA – bovine serum albumine

DAPI - 4',6-Diamidino-2-phenylindole

DHR – Dihydrorhodamine 123

ERK – extracellular signal regulated kinase

FKS – fetales Kälberserum

fMLP – N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine

MAPK – mitogenaktivierte Proteinkinase

MPO – Myeloperoxidase

NADPH – Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NCF-1 – neutrophil cytosol factor 1

NET – neutrophil extracellular trap

IL-1 β – Interleukin-1-beta

IL-6 – Interleukin-6

IL-8 – Interleukin-8

ROS – reactive oxygen species

TD – Track Duration

TDX – Track Displacement X

TDY – Track Displacement Y

TNF- α – Tumornekrosefaktor-alpha

TL – Track Length

TS – Track Straightness

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau der Versuchsreihen.....	11
Abbildung 2 Parameter und Detektionsmodi der beobachteten Granulozytenfunktionalität ..	12
Abbildung 3 Wellenlängen [nm] der Absorptions- sowie Emissionsmaxima der Farbstoffe..	15
Abbildung 4 Softwareverarbeitungsprozesse aufgeschlüsselt nach Migration und Farbanalyse	18
Abbildung 5 ET50-Wert als Zeitpunkt halbmaximaler DNA- bzw. MPO-Freisetzung	20
Abbildung 6 Zeitpunkt maximaler ROS-Produktion am Maximum der Fluoreszenzdetektion	21
Abbildung 7 Vergleich der Aufreinigungsmethoden Leuko-Lympho-Spin sowie positiver Selektion mit CD15-Micro Beads anhand des Wertes Track Length, gemessen je halbe Stunde	22
Abbildung 8 Versuchsreihe mit TNF-alpha, TL je 30 Minuten Messintervall unter Angabe der jeweiligen zugegebenen Konzentrationen und Primingdauer.....	24
Abbildung 9 Versuchsreihe mit IL-6, TL je 30 Minuten Messintervall unter Angabe der jeweiligen zugegebenen Konzentrationen und Primingdauer.....	26
Abbildung 10 Versuchsreihe mit IL-1-beta, TL je 30 Minuten Messintervall unter Angabe der jeweiligen zugegebenen Konzentrationen und Primingdauer.....	28
Abbildung 11 Mediane des Wertes Track Length je Versuchsgruppe je Zeitintervall.....	30
Abbildung 12 TDX in den ersten 30 Minuten, unterteilt nach verwendeter Primingsubstanz und Primingdauer	31
Abbildung 13 TDY in den ersten 30 Minuten, angegeben pro Primingsubstanz und Dauer des erfolgten Primings	33
Abbildung 14 TL je Substanz je Primingdauer, analysiert über die gesamten 150 Minuten...	35
Abbildung 15 Track Straightness je Substanz je Primingdauer, analysiert über die gesamten 150 Minuten	37
Abbildung 16 Zeitpunkte halbmaximaler Farbstoffreaktion für DAPI (ET50-Wert) und anti- MPO-Antikörper (ET50-Wert) sowie Zeitpunkt maximaler ROS-Produktion (tmax) der Versuchsreihe mit IL-6, gemessen von verschiedenen Ausgangszeitpunkten in der Versuchsdurchführung	39
Abbildung 17 Relative prozentuale Medianabweichung vom Mittelwert der donorspezifischen TL Mediane in der ersten halben Stunde mit beispielhafter Angabe dreier zeitlicher Abstände der Versuchsdurchführung	41

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Absorptions- sowie Emissionsmaxima der Farbstoffe.....	15
Tabelle 2 Wellenlängenbereiche der Absorption der Filterwürfel.....	17
Tabelle 3 Mediane und Maximalwerte der TL, aufgeschlüsselt nach Aufreinigungsmethode und Zeitintervallen	23
Tabelle 4 Signifikanzen der TL bei Vergleich der Aufreinigungsmethoden	23
Tabelle 5 Medianwerte und Interquartilbereiche der TNF-alpha-Versuchsreihe	25
Tabelle 6 Medianwerte und Interquartilbereiche der Versuchsreihe mit IL-6.....	26
Tabelle 7 Medianwerte und Interquartilbereiche der IL-1-beta-Versuche.....	27
Tabelle 8 Signifikanzen der TL zwischen den nicht geprierten, für 10 Minuten geprierten sowie 30 Minuten vorbehandelten Proben der TNF-alpha-, IL-1-beta- und IL-6-Versuchsreihe je Zeitintervall	29
Tabelle 9 Mediane der Track Length [μm] je Zeitintervall und Versuchsgruppe	31
Tabelle 10 Mediane und Interquartilbereiche der TDX je Primingsubstanz und Primingdauer	32
Tabelle 11 Signifikanzen im Wert TDX zwischen den nicht vorbehandelten, 10 Minuten und 30 Minuten geprierten Proben der TNF-alpha-, IL-1-beta- und IL-6-Versuchsreihen	32
Tabelle 12 Medianwerte und Interquartilbereiche der TDY, angegeben nach Primingsubstanz und Primingdauern	33
Tabelle 13 Signifikanzen im Wert TDY zwischen den nicht vorbehandelten, 10 Minuten und 30 Minuten geprierten Proben der TNF-alpha-, IL-1-beta- und IL-6-Versuchsreihen	34
Tabelle 14 Medianwerte und Maxima der Track Length, beobachtet über 150 Minuten je Primingsubstanz und Dauer	36
Tabelle 15 Signifikanzen der TL, gemessen über 150 Minuten	36
Tabelle 16 Mediane, Maximalwerte und Interquartilbereiche der drei Versuchsreihen, bei Analyse über 150 Minuten	37
Tabelle 17 Signifikanzen im Parameter TS zwischen den nicht vorbehandelten, den 10 Minuten und 30 Minuten geprierten Proben der substanzspezifischen Versuchsreihen.....	38
Tabelle 18 Mediane mit Interquartilbereichen, Maxima sowie Minima der Zeitwerte der Fluoreszenzreaktionen gemessen in Abhängigkeit verschiedener Zeitpunkte in der Versuchsdurchführung	40
Tabelle 19 Medianwerte der TL und relative Medianabweichung vom Mittelwert der donorspezifischen TL Mediane, angegeben nach Donor und Einzelversuchen.....	42

Tabelle 20 Mittelwerte der donorspezifischen TL Mediane in der ersten halben Stunde..... 42

11. Literaturverzeichnis

1. Holländer GA, editor. Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis. 1. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2006. Available from: URL: http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?id=2671272&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm.
2. Hoth M, Wischmeyer E. Immunsystem. In: Behrends JC, editor. Physiologie. 3., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017. p. 201–29 (Duale Reihe).
3. Walzog B, Fandrey J. Blut: Ein flüssiges Organsystem: Abwehrmechanismen des Körpers. In: Kurtz A, Pape H-C, Silbernagl S, Klinke R, Brenner B, editors. Physiologie. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2014. p. 278–89.
4. Ajitkumar A, Ramphul K. Chediak Higashi Syndrome. Treasure Island (FL); 2018.
5. Leliefeld PHC, Wessels CM, Leenen LPH, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care* 2016; 20:73.
6. Leoratti FMdS, Trevelin SC, Cunha FQ, Rocha BC, Costa PAC, Gravina HD et al. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(6):e1710.
7. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89(10):3503–21.
8. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010; 33(5):657–70. Available from: URL: https://ac.els-cdn.com/S1074761310004176/1-s2.0-S1074761310004176-main.pdf?_tid=6d2f54ee-27b7-42f1-9f87-211aedcc2bea&acdnat=1529421331_bd374c3bfa3774e3ee062c2ecb9edf23.
9. Babior BM. Oxidants from phagocytes: Agents of defense and destruction. *Blood* 1984; 64(5):959–66.
10. Teng T-S, Ji A-L, Ji X-Y, Li Y-Z. Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *J Immunol Res* 2017; 2017:9671604.
11. Ohno Y, Hirai K, Kanoh T, Uchino H, Ogawa K. Subcellular localization of H₂O₂ production in human neutrophils stimulated with particles and an effect of cytochalasin-B on the cells. *Blood* 1982; 60(1):253–60.
12. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149(3 Pt 1):818–24.
13. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176(2):231–41.
14. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303(5663):1532–5.
15. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 2012; 198(5):773–83.
16. Yipp BG, Kubes P. NETosis: How vital is it? *Blood* 2013 [cited 2018 Apr 18]; 122(16):2784–94.
17. Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJD, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: Phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* 2005; 78(5):1025–42.
18. Miralda I, Uriarte SM, McLeish KR. Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7:217.
19. El-Benna J, Dang PM-C, Gougerot-Pocidalo M-A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: Role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* 2008; 30(3):279–89.
20. Elbim C, Bailly S, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect Immun* 1994; 62(6):2195–201.

21. Bass DA, Olbrantz P, Szejda P, Seeds MC, McCall CE. Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. *J Immunol* 1986; 136(3):860–6.
22. El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie J-C, Gougerot-Pocidallo M-A, Dang PM-C. Priming of the neutrophil respiratory burst: Role in host defense and inflammation. *Immunol Rev* 2016; 273(1):180–93.
23. el Benna J, Faust LP, Babior BM. The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem* 1994; 269(38):23431–6.
24. Dewas C, Dang PM-C, Gougerot-Pocidallo M-A, El-Benna J. TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 2003; 171(8):4392–8.
25. Suzuki K, Hino M, Hato F, Tatsumi N, Kitagawa S. Cytokine-specific activation of distinct mitogen-activated protein kinase subtype cascades in human neutrophils stimulated by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor-alpha. *Blood* 1999; 93(1):341–9.
26. McLeish KR, Merchant ML, Creed TM, Tandon S, Barati MT, Uriarte SM et al. Frontline Science: Tumor necrosis factor- α stimulation and priming of human neutrophil granule exocytosis. *J Leukoc Biol* 2017; 102(1):19–29.
27. Drost EM, MacNee W. Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: Effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *Eur J Immunol* 2002; 32(2):393–403.
28. McLeish KR, Knall C, Ward RA, Gerwins P, Coxon PY, Klein JB et al. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF. *J Leukoc Biol* 1998; 64(4):537–45.
29. Demers M, Wong SL, Martinod K, Gallant M, Cabral JE, Wang Y et al. Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth. *Oncoimmunology* 2016; 5(5):e1134073.
30. Fadini GP, Menegazzo L, Rigato M, Scattolini V, Poncina N, Bruttocao A et al. NETosis Delays Diabetic Wound Healing in Mice and Humans. *Diabetes* 2016; 65(4):1061–71.
31. Pfaehler S-M. Die Auswirkung von Priming (TNF α , IL-1 β) auf die Migration und den respiratorischen BURST von neutrophilen Granulozyten [Masterarbeit]. Regensburg: Universität Regensburg; 2016.
32. Kapuściński J, Szer W. Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. *Nucleic Acids Res* 1979; 6(11):3519–34.
33. Emmendörffer A, Hecht M, Lohmann-Matthes M-L, Roesler J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods* 1990; 131(2):269–75.
34. Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry A* 2009; 75(6):475–81.
35. Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, Vasson M-P. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: A comparison of three fluorescent probes. *Clinica Chimica Acta* 2003; 331(1-2):103–10.
36. Life Technologies Corporation. Fluorescence SpectraViewer | Thermo Fisher Scientific - DE [cited 2019 Mar 1]. Available from: URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>.
37. Leica Application Suite X: Leica Microsystems CMS GmbH.
38. Imaris: Bitplane AG.
39. Phoenix 64 NLME: Certara.
40. Microsoft Excel: Microsoft.
41. Mosca T, Forte WCN. Comparative Efficiency and Impact on the Activity of Blood Neutrophils Isolated by Percoll, Ficoll and Spontaneous Sedimentation Methods. *Immunol Invest* 2016; 45(1):29–37.

42. Preobrazhensky SN, Bahler DW. Immunomagnetic bead separation of mononuclear cells from contaminating granulocytes in cryopreserved blood samples. *Cryobiology* 2009; 59(3):366–8.
43. Zhou L, Somasundaram R, Nederhof RF, Dijkstra G, Faber KN, Peppelenbosch MP et al. Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19(7):1065–74.
44. Brandolini L, Sergi R, Caselli G, Boraschi D, Locati M, Sozzani S et al. Interleukin-1 beta primes interleukin-8-stimulated chemotaxis and elastase release in human neutrophils via its type I receptor. *Eur Cytokine Netw* 1997; 8(2):173–8.
45. Hurtado-Nedelec M, Makni-Maalej K, Gougerot-Pocidallo M-A, Dang PM-C, El-Benna J. Assessment of priming of the human neutrophil respiratory burst. *Methods Mol Biol* 2014; 1124:405–12.
46. Suzuki K, Hino M, Kutsuna H, Hato F, Sakamoto C, Takahashi T et al. Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1beta. *J Immunol* 2001; 167(10):5940–7.
47. Daniels RH, Elmore MA, Hill ME, Shimizu Y, Lackie JM, Finnen MJ. Priming of the oxidative burst in human neutrophils by physiological agonists or cytochalasin B results from the recruitment of previously non-responsive cells. *Immunology* 1994; 82(3):465–72.
48. Borish L, Rosenbaum R, Albury L, Clark S. Activation of neutrophils by recombinant interleukin 6. *Cell Immunol* 1989; 121(2):280–9.
49. Kharazmi A, Nielsen H, Rechnitzer C, Bendtzen K. Interleukin 6 primes human neutrophil and monocyte oxidative burst response. *Immunol Lett* 1989; 21(2):177–84.
50. Wright HL, Cross AL, Edwards SW, Moots RJ. Effects of IL-6 and IL-6 blockade on neutrophil function in vitro and in vivo. *Rheumatology (Oxford)* 2014; 53(7):1321–31.
51. Elbim C, Guichard C, Dang PMC, Fay M, Pedruzzi E, Demur H et al. Interleukin-18 primes the oxidative burst of neutrophils in response to formyl-peptides: role of cytochrome b558 translocation and N-formyl peptide receptor endocytosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12(3):436–46.
52. Dularay B, Elson CJ, Clements-Jewery S, Damais C, Lando D. Recombinant human interleukin-1 beta primes human polymorphonuclear leukocytes for stimulus-induced myeloperoxidase release. *J Leukoc Biol* 1990; 47(2):158–63.

12. Danksagung

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer und Leiter des Forschungslabors der Klinik für Anästhesiologie Dr. rer. nat. Michael Gruber für die großartige Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Tätigkeit, das stete offene Ohr für Fragen und den Glauben an meine Arbeit und meine Fähigkeiten.

Danken möchte ich außerdem meiner Doktormutter PD Dr. Sigrid Wittmann für die gute Betreuung und die unkomplizierte Zusammenarbeit in der Bearbeitung meiner Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt Gini, Ruth, Sigrid, Gabi, Marion und Simon, allen Mitarbeitern des Anästhesielabors für die jederzeit verfügbare Hilfe bei Fragen zur Versuchsdurchführung und das angenehme Miteinander.

Ich möchte auch den mit mir zusammen im Labor tätigen Doktoranden für die gegenseitige Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit bei begrenzten Mikroskopkapazitäten und die schöne gemeinsame Zeit danken.

Mein Dank gilt ebenso meinen Probanden, die sich zu verschiedensten Tageszeiten für die Blutentnahme zur Verfügung gestellt haben.

Außerdem möchte ich meiner Kommilitonin Sophie danken, die den Anstoß zu meiner Arbeit im Anästhesielabor gegeben hat.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meiner Mama, meiner Schwester und meinen Großeltern, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet und mir den Rücken freigehalten haben.

Danken möchte ich auch meinem Freund Thomas und meinen Mädels in Eggenfelden und Regensburg, die mir in dieser arbeitsintensiven Zeit eine unglaublich wichtige Stütze waren und sich immer meine Geschichten angehört haben.

13. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sarah Willnecker
Anschrift	Landshuter Straße 86 84307 Eggenfelden
E-Mail	sarah.willnecker@gmx.de
Geburtsdatum	27.11.1995
Geburtsort	Eggenfelden
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulischer Werdegang

2002 – 2006	Grundschule Eggenfelden
09/2006 – 06/2014	Karl-von-Closen-Gymnasium Eggenfelden Allgemeine Hochschulreife

Universitärer Werdegang

10/2014 – 11/2020	Studium der Humanmedizin Universität Regensburg
09/2016	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2019	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2019 – 10/2020	Praktisches Jahr: Chirurgie, Kreisklinik Mühldorf am Inn Innere Medizin, Rottal-Inn-Klinik Eggenfelden Allgemeinmedizin, Dr. Balk/Ortmann Neumarkt-Sankt-Veit
11/2020	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, 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.

Sarah Willnecker