

Aus dem Lehrstuhl für Anästhesiologie
Prof. Dr. med. Bernhard M. Graf, M. Sc.
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Einfluss von Akute-Phase-Proteinen auf die
Granulozytenfunktionalität in vitro**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Isabell Judith Wild

2025

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Datum der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

PD Dr. Martin Kees

PD Dr. Daniel Popp

13.12.2024

Inhalt

1	Einleitung	6
1.1	Neutrophile Granulozyten.....	6
1.1.1	PMNs auf Wanderschaft	6
1.1.2	Verteidigungsmechanismen von PMNs	8
1.2	Akute-Phase-Proteine und ihre Rolle im Immunsystem	10
1.2.1	C-reaktives Protein	10
1.2.2	Ferritin.....	11
1.2.3	Fibrinogen.....	12
1.3	Fetales Kälberserum als häufig genutzter Bestandteil von Zellkulturmedien .	13
1.4	Verschiedene Aktivierungssubstanzen und Aktivierungsmarker für Granulozyten.....	13
1.5	Hypothese und Studienplan	14
2	Material und Methoden	18
2.1	Granulozytenisolierung.....	18
2.1.1	Blutentnahme und Probenaufbereitung	18
2.1.2	Dichtegradientenzentrifugation	18
2.2	Untersuchung der Granulozyten in der Durchflusszytometrie	19
2.2.1	Detektion des oxidativen Bursts.....	20
2.2.2	Antigenexpression von CD11b, CD62L und CD66b	21
2.3	„Live-Cell-Imaging“ der Granulozyten durch Fluoreszenzmikroskopie	21
2.3.1	Vorbereitung des Versuchs.....	22
2.3.2	Berechnung der Verdünnung der Zellmischung.....	22
2.3.3	Aufbau und Befüllung der μ -Slides	23
2.3.4	Aufnahme und Analyse der Bilddaten.....	24
2.4	Statistische Analyse	27

3	Ergebnisse	29
3.1	Qualitätskontrolle der "Live-Cell-Imaging"-Versuche	29
3.1.1	Positive Track Displacement Length X und ungerichtete Track Displacement Length Y	29
3.1.2	Hohe Track Duration vieler Granulozyten	31
3.2	Probandencharakteristika.....	31
3.3	Ergebnisse der Vorversuche zur Methodenoptimierung	32
3.3.1	Ergebnisse zur Wirkung von Fetalem Kälberserum auf PMNs	32
3.3.2	Ergebnisse zur Wirkung von Ionomycin auf PMNs	38
3.4	Ergebnisse der Durchflusszytometrie der Hauptversuche	46
3.4.1	Überblick der Ergebnisse des Einflusses von CRP, Ferritin und Fibrinogen auf die Antigenexpression und den oxidativen Burst der PMNs	47
3.4.2	Ergebnisse zum Einfluss von CRP auf die Antigenexpression und den oxidativen Burst der PMNs	48
3.4.3	Ergebnisse zum Einfluss von Ferritin auf die Antigenexpression und den oxidativen Burst der PMNs	50
3.4.4	Ergebnisse zum Einfluss von Fibrinogen auf die Antigenexpression und den oxidativen Burst der PMNs	63
3.5	Ergebnisse der „Live-Cell-Imaging“-Versuche.....	71
3.5.1	Ergebnisse zum Einfluss von CRP auf die Migration, ROS-Produktion und -Intensität, die MPO-Freisetzung und das NETose-Verhalten der PMNs	72
3.5.2	Ergebnisse zum Einfluss von Ferritin auf die Migration, ROS-Produktion und -Intensität, die MPO-Freisetzung und das NETose-Verhalten der PMNs	78
4	Diskussion.....	85
4.1	Beeinflussung der neutrophilen Granulozyten durch FKS.....	85
4.2	Beeinflussung der neutrophilen Granulozyten durch Ionomycin	86

4.3	Beeinflussung der neutrophilen Granulozyten durch CRP	89
4.4	Beeinflussung der neutrophilen Granulozyten durch Ferritin.....	90
4.5	Beeinflussung der neutrophilen Granulozyten durch Fibrinogen.....	92
4.6	Limitierungen.....	92
5	Zusammenfassung.....	94
6	Anhang	95
6.1	Ergänzende Tabellen	95
6.2	Materialliste nach Methoden	96
6.3	Abbildungsverzeichnis.....	101
6.4	Tabellenverzeichnis	106
6.5	Abkürzungsverzeichnis	107
	Literaturverzeichnis	109

1 Einleitung

Bei einer Infektion mit systemischer Entzündungsreaktion werden Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) von stimulierten Makrophagen und Monozyten freigesetzt. Daraufhin regelt der Körper die Basaltemperatur hoch und die Leber synthetisiert verstärkt oder vermindert verschiedene Akute-Phase-Proteine (APP). Diese Reaktion wird als Akute-Phase-Reaktion (APR) bezeichnet. Ziel der Akute-Phase-Reaktion ist es, die Abwehrfunktionen des Körpers zu aktivieren. Außerdem kommt es im Rahmen einer Akute-Phase-Reaktion zu einem Anstieg der Leukozyten (Leukozytose), wobei der größte Anteil im peripheren Blut von den neutrophilen Granulozyten gestellt wird (Neutrophilie) [1, 3]. Sowohl neutrophile Granulozyten als auch Akute-Phase-Proteine sind Teil des angeborenen Immunsystems [2, 3]. Daher könnte man vermuten, dass es eine gegenseitige Beeinflussung von Neutrophilen und APPs gibt. In dieser Arbeit sollen mögliche Effekte von APPs (C-reaktives-Protein (CRP), Fibrinogen und Ferritin) auf ausgewählte Parameter verschiedener Granulozytenfunktionen in vitro untersucht werden.

1.1 Neutrophile Granulozyten

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) stellen im Wesentlichen, mit 60 % der Leukozyten, die zelluläre Abwehr der unspezifischen Immunabwehr dar [1, 4]. Sie werden in den venösen Sinussen des Knochenmarks gebildet [5]. Es gibt außerdem noch basophile (0 - 1 %) und eosinophile (1 - 3 %) Granulozyten, die jedoch nur einen sehr geringen Teil der Granulozyten ausmachen. Neutrophile phagozytieren beispielsweise Eindringlinge wie Bakterien oder beschädigte Zellen des Körpers [1].

1.1.1 PMNs auf Wanderschaft

Befinden sich pathogene Keime im Gewebe, wird dies von Mastzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen wahrgenommen. Diese Immunzellen produzieren daraufhin Zytokine und andere proinflammatorische Substanzen, die wiederum zu einer Aktivierung der Endothelzellen in den angrenzenden Blutgefäßen führen. Diese Aktivierung wird von den Granulozyten registriert [6]. Infolgedessen wandern die PMNs aus der Blutbahn aus. Dabei durchdringen sie aktiv die Gefäßwand und migrieren anschließend, geleitet durch einen chemotaktischen Gradienten, in das Gewebe [1].

1.1.1.1 Diapedese der Granulozyten durch eine Rekrutierungskaskade

Die Diapedese erfolgt in den meisten Geweben über das Endothel mit einer Rekrutierungskaskade. Diese Kaskade beinhaltet Anbinden, „Rolling“, Adhäsion und „Crawling“ [7].

Das Anbinden und „Rolling“ (dt. rollen) an der Gefäßwand führt zu einem erleichterten Kontakt zwischen Granulozyten und Endothel und wird unter anderem durch bestimmte Zelladhäsionsmoleküle, sog. Selektine, vermittelt. Auf der Endotheloberfläche handelt es sich dabei unter anderem um P-Selektin und E-Selektin. Diese beiden Selektine binden an ihren Liganden P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL1), welcher auf den PMNs sitzt. So treten frei fließende PMNs erstmals mit der Endotheloberfläche in Wechselwirkung. Auf den PMNs ist außerdem L-Selektin (CD62L) membranständig exprimiert. Beim „Rolling“ kommt es zu einer Ablösung von L-Selektinen. Diese Ablösung gilt als Indikator für das „Priming“ (d.h. die partielle Aktivierung) der PMNs. [7–9]. Für die starke Adhäsion und das „Crawling“ (dt. Kriechen/Krabbeln) des einzelnen Neutrophilen am Endothel sind andere Oberflächenproteine vorhanden. Diese werden als Integrine bezeichnet. Dazu zählen das Lymphozytenfunktion-assoziierte Antigen-1 (LFA-1; Komplex aus CD11a und CD18) und das Makrophagen-1-Antigen (MAC-1; Komplex aus CD11b mit CD18), welche auf der Granulozytenoberfläche sitzen. LFA-1 und MAC-1 binden an das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 und -2 (ICAM1 und ICAM2) am Endothel. Nach der Bindung werden die Granulozyten flacher und „krabbeln“ am Endothel entlang. Dabei ermitteln sie eine passende Stelle für den Austritt. Durch die Interaktion der PMNs mit dem Endothel werden granulozyteninterne Signalwege aktiviert, die zu einer Stabilisierung der Adhäsion führen. Die Signalwege haben außerdem eine Initialisierung der Zellmotilität zur Folge [7, 10]. Anschließend wird die Gefäßwand, welche von innen nach außen aus Endothelzellen, Perizyten und einer Basalmembran besteht, überwunden. Dies kann über einen parazellulären oder transzellulären Weg passieren [6, 10]. Im Rahmen des parazellulären Wegs kommt es durch die Wechselwirkung der PMNs mit dem Endothel über ICAM-1 und CD18 zu einer Lockerung der interzellulären Verbindungen im Endothel [6, 10]. Nach der Lockerung bewegen sich die Granulozyten über Interaktionen mit verschiedenen Adhäsionsmolekülen zwischen den Endothelzellen hindurch [11, 12]. Überwinden die PMNs die Gefäßwand transzellulär bilden sie Ausstülpungen, die eine Kanalentstehung in der Endothelzelle erleichtern. Dies wird genutzt, um die Endothelzelle zu durchqueren. Dabei werden die Zell-Zell-Bindungen der

Endothelzellen nicht getrennt [13]. Ob der parazelluläre oder der transzelluläre Weg genutzt wird, hängt vom Gewebe ab [10].

1.1.1.2 Chemotaxis der Granulozyten in das Gewebe

Nach dem Verlassen der Blutbahnen migrieren die Granulozyten entlang eines chemotaktischen Gradienten zum Ort des Geschehens. Beispielsweise folgen sie Komplementfaktoren wie C5a oder, im Rahmen einer bakteriellen Infektion, N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), welches aus der unmittelbaren Umgebung eines infizierenden Bakteriums stammt. C5a und fMLP sind sogenannte Endzielchemoattraktanten. Sie überbieten in der Hierarchie die Zwischenchemoattraktanten wie zum Beispiel IL-8. So wird sichergestellt, dass die Granulozyten auch am Infektionsherd ankommen [14, 15].

1.1.2 Verteidigungsmechanismen von PMNs

Sind die PMNs schließlich bei den Pathogenen angekommen, ist der nächste Schritt die Eliminierung. So phagozytieren die PMNs die Mikroben, produzieren reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS), degranulieren antimikrobielle Substanzen und gehen in die NETose [16]. Im Folgenden wird vor allem auf die Mechanismen eingegangen, die in dieser Arbeit untersucht werden.

1.1.2.1 Phagozytose von Pathogenen und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies

Die Granulozyten erkennen die Mikrobe über „pathogenassoziierte molekulare Muster“ („pathogen-associated molecular pattern“, PAMPs) mithilfe von Mustererkennungsrezeptoren („pattern recognition receptors“, PRRs) wie z.B. Toll-like-Rezeptoren (TLR) [17, 18]. Gefördert wird dies durch vorherige Opsonierung der Mikrobe durch Antikörper, die von den PMNs unter anderem über Fcγ-Rezeptoren erkannt werden. Nach Identifizierung des Eindringlings wird dieser von der Granulozytenmembran komplett umschlossen und es bildet sich ein Phagosom. Dieses verschmilzt mit primären und sekundären Granula des Granulozyten, welche antimikrobielle Bestandteile wie Proteasen und die Myeloperoxidase (MPO) enthalten. Hinzu kommt, dass die Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase (Nox) aktiviert wird. Sie besteht aus einem membrangebunden Flavocytochrom-b-₅₅₈ und den verschiedenen, im Zytoplasma enthaltenen, löslichen Komponenten p47phox, p67phox, p40phox und Rac. Die NADPH-Oxidase produziert Superoxidanionen (O_2^-). Diese Superoxidanionen ini-

tialisieren wiederum die Bildung anderer reaktiver Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$) und hypochlorige Säure (HOCl), welche letztendlich zur Eliminierung des phagozytierten Pathogens im Phagolysosom beitragen. Aufgrund des hohen Sauerstoffverbrauchs wird dieser Vorgang auch als „respiratory Burst“ bezeichnet [19, 20]. Neutrophile können auch nach extrazellulär ROS produzieren. Dies hat jedoch nicht nur den positiven Effekt des Abtötens von Eindringlingen, sondern kann auch begünstigend für die Entstehung von Pathologien wie Ischämie-Reperfusionsschäden, Transplantatabstoßungen und Atherosklerose sein [21].

1.1.2.2 Die Bedeutung der Myeloperoxidase

Die Myeloperoxidase ist Hauptbestandteil der primären, auch azurophil genannten, Granula [22, 23]. Sie ist eine Häm-Peroxidase und verbraucht einen Großteil des produzierten H_2O_2 , um verschiedene aromatische Verbindungen zu Substratradikalen zu oxidieren. Einzigartig an MPO ist, dass sie Chloridionen zu HOCl oxidieren kann, ein wichtiges Oxidationsmittel der PMNs für Bakterien [24]. MPO kann nach extrazellulär produziert werden. Dies ist zum Beispiel bei mehrzelligen Organismen der Fall, also wenn das angedockte Ziel zu groß für eine Phagozytose ist. Es kann auch passieren, dass bei der Phagozytose eine Leckage entsteht und MPO nach extrazellulär austritt. Erhöhte MPO-Freisetzung wird jedoch auch mit oxidativem Stress und letztendlich mit verschiedenen Organschäden wie kardiovaskulären Erkrankungen und Lungenschäden in Verbindung gebracht [25, 26].

1.1.2.3 Die Bildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Ein weiterer Mechanismus zur Abwehr von Eindringlingen ist die Bildung von sogenannten „neutrophil extracellular traps“ (NETs). Dabei findet ein Zelltod der Granulozyten statt, der NETose genannt wird [27]. Diese Form des Zelltods wurde als neue Form des Granulozytentodes erstmals 1996 beschrieben. Damals wurden die Granulozyten mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) stimuliert und starben durch Dekondensation des Chromatins mit anschließender Zersetzung der Kernhülle und Freisetzung des Chromatins [28]. Im Jahr 2004 wurden dann erstmals die NETs als extrazelluläre, 15 – 17 nm große, netzartige, antibakterielle Strukturen dargestellt. Sie bestehen aus Chromatin (DNA und verschiedene Proteine) und diversen zytosolischen und granulären Proteinen wie neutrophile Elastase (NE), Cathepsin G und MPO [29]. Die NETs können Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten abfangen, neutralisieren und vernichten [30]. Die NET-Bildung wird i.d.R. über einen Nox-abhängigen oder einen Nox-unabhängigen Weg ausgelöst. Welcher Weg genutzt wird, hängt vom Stimulus ab [31]. Bei

der Nox-abhängigen NETose wird das Nox-Enzym gebildet, welches ROS produziert (siehe 1.1.2.1). ROS führt zu einer Freisetzung der Enzyme MPO und NE, die daraufhin zum Zellkern wandern. Dort spalten die Enzyme die Histone und erleichtern so die Chromatindekondensation. Die Nox-unabhängige NETose erfordert einen starken Kalziumeinstrom. Die Peptidylarginin-Deiminase 4 (PAD4) wandert im Komplex mit Ca^{2+} in den Zellkern und citrulliniert dort die Histone. Diese Citrullinierung führt zur Chromatindekondensation. Der anfängliche Kalziumeinstrom führt außerdem zur Produktion von ROS durch die Mitochondrien. Es wird somit auch bei der Nox-unabhängigen NETose ROS produziert. Diese Produktion läuft jedoch nicht über die NADPH-Oxidase [27]. Während das Chromatin dekondensiert, bildet die Kernmembran deutliche Vesikel und zerfällt schließlich. Anschließend erfolgt eine Vermischung des Chromatins mit den Zytosolbestandteilen, was final zur Ruptur der Zellmembran und zur Freisetzung der NETs führt [32].

1.2 Akute-Phase-Proteine und ihre Rolle im Immunsystem

Akute-Phase-Proteine sind Teil der unspezifischen, humoralen Immunabwehr und werden überwiegend in der Leber synthetisiert [1]. Per definitionem sind es Proteine, deren Plasmaspiegel sich im Rahmen einer Entzündungsreaktion, einer Akute-Phase-Reaktion, um mindestens 25 % verändert [3]. Es werden wenigstens 40 Plasmaproteine als APPs beschrieben, zu denen Gerinnungsproteine, Komplementfaktoren, Antiproteasen und Transportproteine gehören [33]. Außerdem findet eine Unterscheidung zwischen positiven und negativen APPs statt. Bei den positiven APPs (z.B. CRP, Serum Amyloid A, Haptoglobin, C3, C4, Ferritin, Fibrinogen usw.) steigt der Plasmaspiegel im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion. Im Gegensatz dazu sinkt der Plasmaspiegel der negativen APPs (z.B. Albumin, Transferrin, Alpha-Fetoprotein, Faktor XII usw.) während einer Akute-Phase-Reaktion [3]. Die APPs, die für diese Arbeit relevant sind, sind CRP, Ferritin und Fibrinogen. Ihre Struktur und Aufgaben werden in den folgenden Absätzen genauer beschrieben.

1.2.1 C-reaktives Protein

Das C-reaktive Protein wurde 1930 zum ersten Mal in Seren von Patienten mit einer akuten Pneumokokkeninfektion nachgewiesen [34]. Es kommt sowohl als natives CRP als Pentamer (nCRP, mit fünf Untereinheiten) als auch als Monomer (mCRP) im menschlichen Körper vor. Die genauen Unterschiede der beiden CRP-Isoformen, hin-

sichtlich ihrer Funktion während einer Entzündung, sind jedoch noch nicht gut verstanden. CRP bindet Ca^{2+} -abhängig an Liganden wie z.B. Phosphocholin (PC), Polysaccharide und Chromatin [35]. PC ist beispielsweise ein Bestandteil von Phospholipiden in Zellmembranen sowie von komplexen Polysacchariden in Pflanzen, Pilzen und Bakterien [36]. Nach der Bindung von CRP an einen passenden Liganden kommt es zu einer Rotation der Untereinheiten des CRPs. Diese Rotation der Untereinheiten erleichtert die Interaktion diverser Immunzellen über die Immunglobulinrezeptoren Fc γ RI und Fc γ RII mit CRP [33, 35]. Es bindet somit auch an die Fc-Rezeptoren der neutrophilen Granulozyten, wobei hier die Affinität zu Fc γ RII wohl höher ist als zu Fc γ RI [37]. CRP besitzt die Fähigkeit Agglutination, Komplementbindung, bakterielle Lyse und Phagozytose zu fördern [38]. Es wird durch das Zytokin IL-6 reguliert [39]. Unter physiologischen Bedingungen beträgt der Plasmaspiegel von CRP weniger als 1 mg/L [35]. Bei bakteriellen oder viralen Infektionen kann die CRP-Konzentration im Blut innerhalb von 48h bis auf das 100-fache ansteigen. Hierbei führen bakterielle Infektionen i.d.R. zu höheren CRP-Konzentrationen als virale Infektionen [40]. Zu einer Erhöhung der CRP-Konzentration kommt es aber nicht nur durch Infektionen, sondern auch durch Traumata, Gewebnekrosen, Neoplasien, Alterung oder einfach den meisten Entzündungen [40]. Es gibt jedoch auch Erkrankungen, die trotz schwerer Entzündung zu keinem oder nur geringem Anstieg des CRPs führen. Dazu gehören Sklerodermie, Dermatomyositis, das Sjögren-Syndrom oder Colitis ulcerosa. Somit ist das nicht vorhandene CRP kein Beweis für das Fehlen einer Pathologie [39].

1.2.2 Ferritin

Ferritin ist ein typischerweise aus 24 Untereinheiten (Polypeptidketten) aufgebautes Eisen-Speicherprotein mit einem Außendurchmesser von ca. 12 nm. Es gibt zwei verschiedene Typen an Untereinheiten, sog. high- (schwere, H) und low- (leichte, L) Ketten. Ferritin kann sich aus verschiedenen Anteilen der Untereinheitstypen zusammensetzen. Somit gibt es unterschiedliche Isoformen (H₂₄L₀, H₂₂L₂ usw.), die gewebespezifisch verteilt sind. Die Untereinheiten bilden gemeinsam eine Proteinkäfigstruktur, also eine kugelförmige Proteinhülle [41, 42]. Die H-Kette von Ferritin besitzt eine Ferrooxidaseaktivität, die bei der Aufnahme von Fe^{2+} , dieses zu Fe^{3+} oxidiert. Vor der Abgabe wird Fe^{3+} wieder zu Fe^{2+} reduziert [43]. Es können im inneren „Käfig“ des Ferritins jeweils bis zu 4000 Fe-Atome aufgenommen werden. Damit ist Ferritin zugleich wichtig für die Versorgung des Körpers mit Eisen, aber auch für den Schutz des Kör-

pers vor toxischen Wirkungen des Eisens unerlässlich [42]. Die wahrscheinlich wichtigste Funktion von Eisen im Körper ist die Beteiligung an dem Protein Hämoglobin, welches für den Sauerstofftransport im Blut zuständig ist [1]. Ferritin wird in verschiedenen Organen, wie der Leber und der Niere, aber auch durch Makrophagen produziert. Die Makrophagen recyceln dabei das Häm aus den Erythrozyten. Die Ferritinsynthese wird durch oxidative Schäden, den Eisen-Status und verschiedene Zytokine beeinflusst [42, 44]. Somit produzieren Makrophagen, nach Stimulation durch IL-1 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) im Rahmen einer Akuten-Phase-Reaktion, vermehrt Ferritin. Zusätzlich führen diese Zytokine direkt zu einer vermehrten Lyse von Erythrozyten, wodurch wieder mehr Häm freigesetzt wird. Das Häm wird daraufhin vermehrt durch Makrophagen phagozytiert und somit entsteht erneut Fe²⁺, welches in Ferritin eingebaut werden muss [44, 45]. Ferritin ist auch in der Lage eine Entzündung zu begrenzen, indem es vermehrt Fe-Atome speichert, also den Anteil an freien Fe-Atomen verringert. So werden diese Fe-Atome verschiedenen Pathogenen vorenthalten [46]. Beim gesunden Menschen liegt die Ferritinkonzentration im Blut zwischen 20 und 300 ng/mL. Bei verschiedenen Erkrankungen kann sie auf über 1000 ng/mL ansteigen oder sogar über die 10000 ng/mL (bei diversen Autoimmunerkrankungen) hinausgehen [44]. Ein erniedrigter Ferritin-Wert spricht für einen Eisenmangel, wie er beispielsweise bei chronischen Blutverlusten vorkommt [1].

1.2.3 Fibrinogen

Fibrinogen ist ein Glykoprotein und besteht aus zwei Gruppen von A α -, B β - und γ -Ketten. Die Ketten sind durch Disulfidbrücken verbunden [47]. Es ist ein Protein der Gerinnungskaskade und somit Teil der Hämostase. Fibrinogen wird im Rahmen der Hämostase durch Thrombin proteolytisch zu Fibrin gespalten, welches letztendlich ein Fibringerüst und damit einen Teil der Grundlage für einen Thrombus bildet. Fibrinogen verfügt über viele Bindungsstellen, die teilweise schon im ungespalteten Fibrinogen für Interaktionen zur Verfügung stehen. Manche Bindungsstellen werden aber auch erst durch die Spaltung zu Fibrin freigelegt. Über diese Interaktionsstellen kann Fibrin(ogen) mit anderen hämostatischen Faktoren wie Thrombin oder Faktor XIII, mit pro- und antifibrinolytischen Proteinen, mit extrazellulären Matrixproteinen und zellulären Rezeptoren in Wechselwirkung treten [48]. Fibrinogen kann an die Leukozytenintegrine MAC-1 und $\alpha_x\beta_2$ (CD11c/CD18) binden, welche auf Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen exprimiert werden [49]. Die Bindung über MAC-1 treibt proinflamm-

atorische Signalwege an, welche letztendlich eine Freisetzung von Entzündungszytokinen wie TNF α und IL-1 β bewirken [50, 51]. Außerdem können Peptide, die bei der Fibrinbildung freigesetzt werden (z.B. Fibrinopeptid B) als Chemoattraktanten für PMNs wirken [52].

Der gesunde Mensch hat einen Plasmaspiegel zwischen 1,5 – 3,5 mg/mL Fibrinogen im Blut. Die Expression von Fibrinogen kann im Rahmen einer Akute-Phase-Reaktion oder durch Verletzungen ansteigen. Stimuliert wird diese Konzentrationserhöhung von Fibrinogen beispielsweise durch Glukokortikoide und dem Zytokin IL-6 [53]. Manche Fibrinabbauprodukte wie D-Dimere dienen in der klinischen Praxis häufig als Indikatoren für Entzündungen, erhöhte Gerinnungsaktivität und Risikoprädiktoren für thrombotische Ereignisse [54].

1.3 Fetales Kälberserum als häufig genutzter Bestandteil von Zellkulturmedien

Werden menschliche Zellen für die Forschung extrahiert und sollen deshalb außerhalb des Körpers eine Zeit lang weiterleben, brauchen sie eine Umgebung, die dieses Überleben gewährleistet. Die Umstände und Bedingungen der Experimente sollten denen des menschlichen Körpers ähneln, um eine gewisse Übertragbarkeit der Forschungsergebnisse zu erhalten. Diese körperähnlichen Bedingungen werden häufig mit verschiedenen Nährmedien in der Zellkultur nachgestellt. Fetales Kälberserum (FKS) ist ein solcher, häufig genutzter Bestandteil von Zellkulturmedien [55]. Die genauen Bestandteile sind nicht bekannt, aber es enthält verschiedene Komponenten wie Hormone, Vitamine, Transportproteine, Spurenelemente, Ausbreitungs- und Wachstumsfaktoren, die das Überleben und die Vermehrung von Zellen gewährleisten [56].

1.4 Verschiedene Aktivierungssubstanzen und Aktivierungsmarker für Granulozyten

Viele verschiedene Substanzen/Trigger können zu einer Aktivierung von PMNs führen. Diese Trigger interagieren über Rezeptoren auf der Granulozytenoberfläche mit den PMNs und haben die Auslösung verschiedener Signalwege in den PMNs zur Folge. Im Folgenden wird kurz auf die Aktivierungssubstanzen eingegangen, deren Wirkweise für das Verständnis dieser Arbeit wichtig sind.

fMLP. N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin ist ein bakterielles Produkt und führt zu einer starken chemotaktischen Migration der PMNs [57]. Es bindet an einen Formyl-

Peptid-Rezeptor, welcher ein G-Protein-gekoppelten-Rezeptor ist [58]. FMLP erreicht die Anregung der PMNs, welche zur Migration führt, unter anderem durch Aktivierung der Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K), was letztendlich die Aktivierung der NADPH-Oxidase zur Folge hat [59].

TNF α . Tumor-Nekrose-Faktor- α ist ein körpereigenes Zytokin und bindet an verschiedene Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie (z.B. TNFR1 und TNFR2). TNF-Rezeptoren erwirken eine intrazelluläre Signalübertragung, indem sie Adapterproteine an den Rezeptorkomplex rekrutieren. Im Allgemeinen lösen TNFR1 und TNFR2 proinflammatorische Signale aus, wobei TNFR1 dabei auch eine proapoptotische Reaktion hervorruft [58].

PMA. Phorbol 12-Myristat 13-Acetat ist ein Diacylglycerin-Mimetikum und führt zu einem Kalziumeinstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol. Das wiederum führt zu einer erhöhten Aktivität der Proteinkinase C (PKC), die die NADPH-Oxidase phosphoryliert und somit aktiviert. PMA ist ein klassisches Beispiel für einen nicht-physiologischen Auslöser der Nox-abhängigen NETose [27].

Ionomycin. Ionomycin ist ein Kalzium-Ionophor und führt somit zu einem starken Kalziumeinstrom in die Granulozyten. Daraufhin wird die PAD4 aktiviert. Ionomycin ist somit das typische Beispiel für einen Trigger der Nox-unabhängigen NETose [27].

CD11b/CD62L/CD66b. Dies sind Antigene auf der Granulozytenoberfläche und werden allgemein als Marker für die PMN-Aktivierung benutzt. Hierbei gilt eine Steigerung der Expression von CD11b und CD66b, sowie eine Abnahme der Expression von CD62L, als Zeichen für die Aktivierung der PMNs [60].

1.5 Hypothese und Studienplan

„Die Akute-Phase-Proteine CRP, Ferritin und Fibrinogen beeinflussen die Funktionalitäten von PMNs in vitro.“ Diese Hypothese soll mit dem Studienplan geprüft und schließlich verifiziert oder widerlegt werden.

Studienplan.

Für alle Versuche werden PMNs durch Dichtegradientenzentrifugation von gesunden Spendern isoliert und anschließend mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Zunächst werden Vorversuche zur Optimierung des Versuchsaufbaus und den Versuchsbedingungen durchgeführt. Um den Einfluss von FKS auf die PMNs zu untersuchen werden die Daten durch „Live-Cell-Imaging“-Versuche erhoben. Mit Ionomycin werden die Daten sowohl mittels „Live-Cell-Imaging“ als auch mit Hilfe der Durchflusszytome-

trie gewonnen. Das Vorgehen dabei gleicht dem der Hauptversuche. Für die Hauptversuche (Studienplan in Abbildung 1) werden die PMNs mit den Akute-Phase-Proteinen CRP, Ferritin und Fibrinogen inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie oder „Live-Cell-Imaging“ durch ein Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es wird Ferritin (1) und Ferritin (2) unterschieden, da sie von unterschiedlichen Herstellern kommen (siehe 2.2).

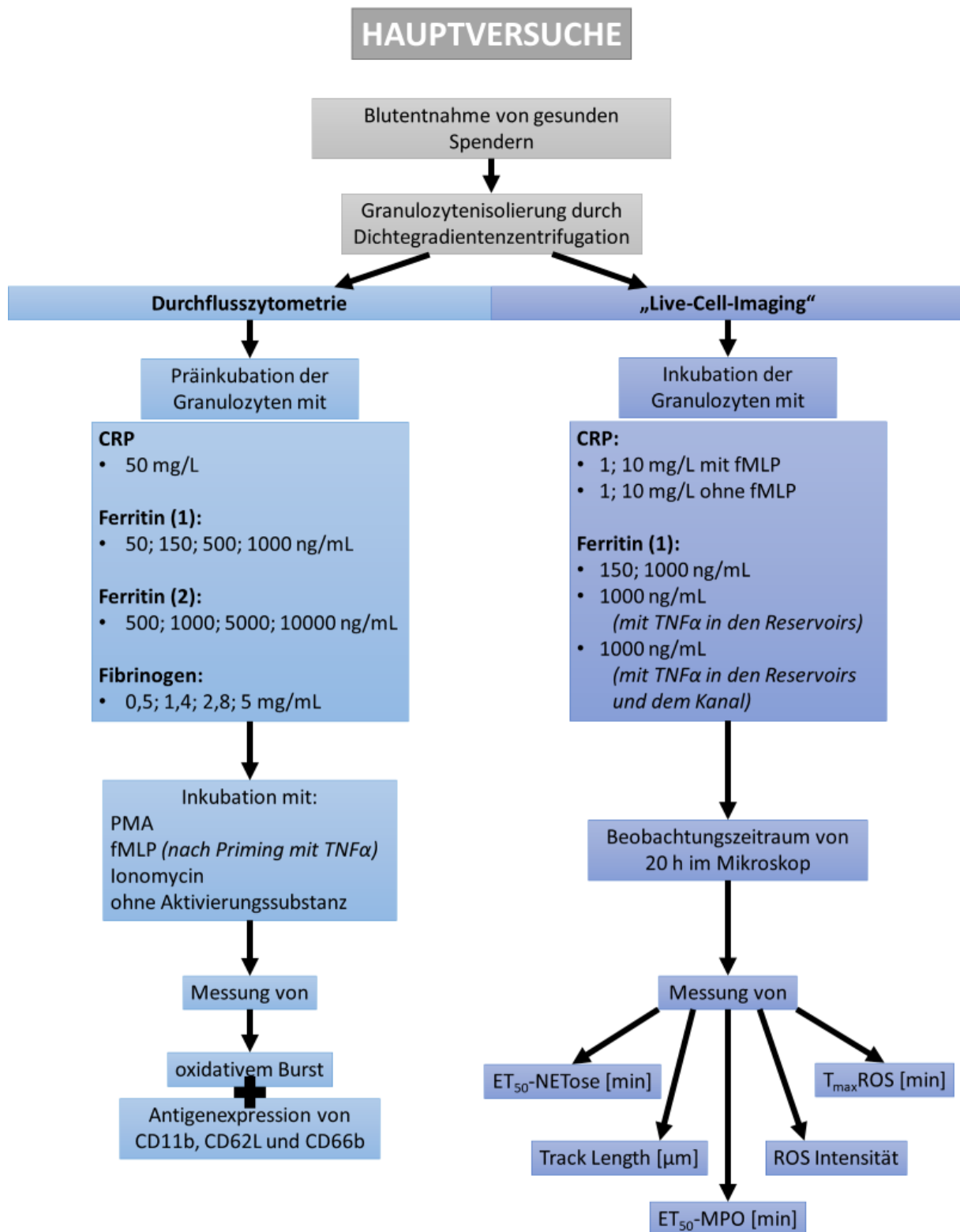


Abbildung 1: Studienplan der Hauptversuche.

Bei den Experimenten der Durchflusszytometrie werden die PMNs nach Inkubation mit einem der drei APPs zusätzlich entweder mit den Aktivierungssubstanzen TNF α /fMLP, PMA und Ionomycin oder ohne Aktivierungssubstanz inkubiert. Anschließend werden im FACS verschiedene Parameter detektiert. Dabei handelt es sich um die ROS-Produktion und die Antigenexpression von CD11b, CD62L und CD66b. Zudem werden „Live-Cell-Imaging“-Versuche mit CRP und Ferritin durchgeführt. Hierbei wird das Verhalten der PMNs über einen Beobachtungszeitraum von 20 h aufgezeichnet, indem alle 45 s ein Foto gemacht wird. Anschließend werden die entstandenen Filme bezüglich der Migration (Track Length [μ m]), der ROS-Produktion (T_{\max} ROS [min]) und ROS-Intensität (mediane Intensität [afu]), der Freisetzung der Myeloperoxidase (ET_{50} MPO) sowie der NETose-Fähigkeit (ET_{50} NETose) analysiert und ausgewertet.

2 Material und Methoden

Der Versuchsaufbau basiert auf unseren früheren Studien [61–64]. Alle Experimente wurden von der Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt (Votum no. 20-1919-101). Eine vollständige Liste der Materialien wird im Anhang (6.2) aufgeführt.

2.1 Granulozytenisolierung

Den ersten Schritt der Versuchsdurchführung stellt die Isolierung der Granulozyten dar. Dazu wird Blut von Spendern entnommen und zentrifugiert, sodass die Bestandteile des Bluts nach ihrer Dichte aufgeteilt werden und sich so die Granulozyten von den anderen Zellen differenzieren lassen.

2.1.1 Blutentnahme und Probenaufbereitung

Das Blut wird von freiwilligen Probanden gewonnen, welche eine Datenschutz- und Einverständniserklärung unterschrieben haben. Für die Blutentnahme wird venöses Blut, nach sorgfältiger Desinfektion, aus der Ellenbeuge oder dem Handrücken entnommen. Dazu wird eine Safety-Multifly-Kanüle 0,9 x 19 mm (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) und eine S-Monovette 7,5 mL Lithium-Heparin (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) verwendet.

2.1.2 Dichtegradientenzentrifugation

Es werden in zwei Zentrifugengefäße jeweils 3 mL LeukoSpin-Medium gegeben und darüber 3 mL PBMC(LymphoSpin)-Medium (beides pluriSelect Life Science, Leipzig, Deutschland) geschichtet. Beides wurde vorher auf Raumtemperatur gebracht. Zuletzt werden 3 mL Probandenblut auf das LymphoSpin-Medium pipettiert. Dabei ist es wichtig, dass sich das Blut nicht mit dem LymphoSpin-Medium vermischt. Die Zentrifugengefäße kommen zur Zelltrennung für 20 min bei 2000 rpm (756g) und Raumtemperatur in die Zentrifuge (Megafuge 1.0 R; Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland). Um die Flüssigkeitsschichten beim Bremsen nicht wieder zu vermengen, erfolgt das Zentrifugieren ohne Verwendung der Zentrifugenbremse. Aufgrund der physikalischen Eigenschaften bilden sich verschiedene Phasen. Der Ring, in dem sich die Granulozyten befinden, ist milchig-weiß und befindet sich direkt oberhalb der erythrozytenreichen Phase (Abbildung 2). Die Phasen oberhalb des Granulozytenrings werden entfernt. Es werden jeweils 500 µL aus dem Granulozytenring entnommen und in ein Reaktionsgefäß pipettiert.

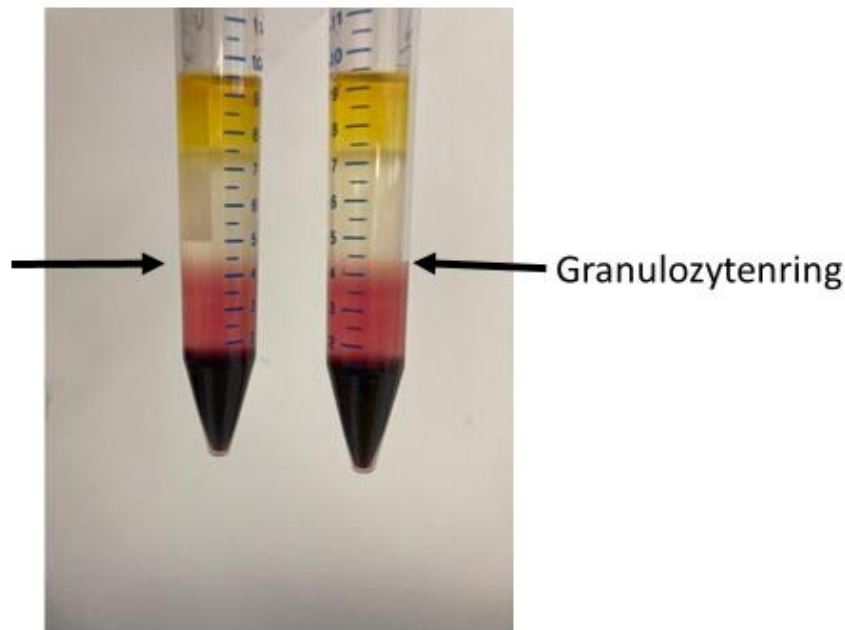


Abbildung 2: Die verschiedenen Phasen im Zentrifugengefäß nach der Dichtegradientenzentrifugation. Die Pfeile zeigen auf den Ring, den die Granulozyten bilden.

2.2 Untersuchung der Granulozyten in der Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wird mit einem FACS Calibur („fluorescence-activated cell sorting“) und der CellQuest Pro Software-Version 5.2 (beides BD Biosciences, Eremboegem, Belgien) gearbeitet. Alle Messungen werden mit der FlowJo Version 10.0.7 (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA) ausgewertet. PMNs werden auf Grund ihrer Größe und Granularität (Forward Scatter (FSC)/Side Scatter (SSC)) identifiziert. Fluoreszenzintensitäten werden mittels Fluoreszenzdetektoren gemessen. Aus den relativen Intensitäten der Zellen wird ein Median gebildet. Die Einheit der Fluoreszenzintensitäten ist „artificial fluorescence units“ [afu]. Mittels Durchflusszytometrie werden die ROS-Produktion und die Expression der Oberflächenproteine CD11b, CD62L und CD66b detektiert.

Die isolierten Granulozyten werden aufgeteilt. Anschließend werden sie mit den zu prüfenden Substanzen für 30 min bei 37 °C im Wasserbad präinkubiert. In den Vorversuchen handelt es sich bei der Substanz um Ionomycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA) in den Konzentrationen 0,005 - 5 μ M. Die Hauptversuche werden mit den APPs CRP (50 mg/L; Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, Deutschland), Fibrinogen (0,5 – 5 mg/mL; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), Ferritin (1) (50 – 1000 ng/mL; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) oder Ferritin (2) (500 – 10000 ng/mL; Merck Millipore S.A.S., Molsheim Cedex, Frankreich)

durchgeführt. Als Kontrolle werden jedes Mal auch PMNs ohne Testsubstanz, nur mit RPMI 1640 Medium (Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland) mit 10 % FKS (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) (Kontrolle) inkubiert. Für die Messung des Oxidativen Bursts und der Antigenexpression werden die PMNs unterschiedlich weiterverarbeitet. In jeder Probe sind 25 % RPMI mit 10 % FKS, zusätzlich zu den PMNs und den APPs, enthalten. Eine Übersicht über den Versuchsablauf der Hauptversuche findet sich in Abbildung 3.

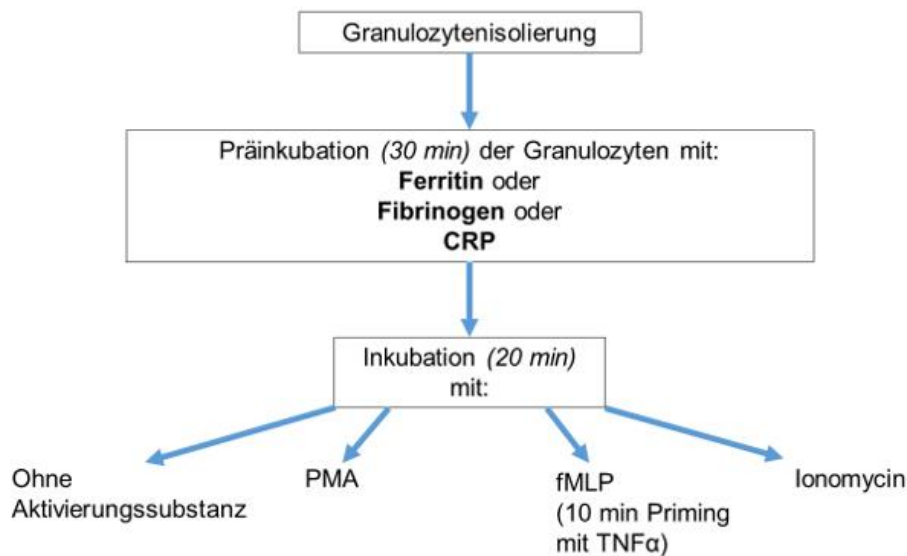


Abbildung 3: Übersicht der Hauptversuche der Durchflusszytometrie.

2.2.1 Detektion des oxidativen Bursts

Anschließend an die Präinkubation mit Ionomycin oder den APPs werden die Granulozyten einmalig gewaschen. Waschen bedeutet, dass zu der Probe 2 mL Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) hinzugefügt und diese für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert wird. Die Flüssigkeit (mit u.a. den ungebundenen APPs) wird anschließend dekantiert, die Zellen bleiben erhalten. Für die Detektion des oxidativen Bursts wird 1 mL PBS (ohne Calcium Chlorid und Magnesium Chlorid) zugegeben. Zusätzlich werden 10 μ L Dihydrorhodamin 123 (DHR, 10 μ M, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und 10 μ L Seminalphtharhodafuor (SNARF, 10 μ M, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) hinzugefügt. DHR ist eine Substanz, die durch ROS zum Farbstoff Rhodamin123 oxidiert wird und von einem Fluoreszenzdetektor detektiert werden kann. In den Hauptversuchen werden verschiedenen Aktivierungssubstanzen zu den PMNs hinzugefügt und für 20 min bei

37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Vorversuche mit Ionomycin werden ohne zusätzliche Aktivierung durchgeführt. Bei den Aktivierungssubstanzen handelt es sich um 10 µL fMLP (10 µM, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St.Louis, USA) oder 10 µL PMA (10 µM, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) oder 35 µL Ionomycin (10 µg/mL). Die Proben, welche mit fMLP aktiviert werden sollen, werden vor der Inkubation noch mit TNF α (PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland) für 10 min gepreimt (Konzentration TNF α : 10 ng/mL). Kurz vor der Messung werden 10 µL Propidium Iodid (PI, 1,5 mM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) hinzugegeben. Dies ist ein Farbstoff, welcher perforierte Zellmembranen durchdringen kann und somit zugrunde gegangene PMNs markiert.

2.2.2 Antigenexpression von CD11b, CD62L und CD66b

Für die Darstellung der Oberflächenantigene werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Diese Fluoreszenzfarbstoffe sind dabei an Antikörper gekoppelt, die an bestimmte Antigene auf der Granulozytenoberfläche binden. Das FACS detektiert diese Fluoreszenzfarbstoffe. Somit werden spezifische Antigene auf den Granulozyten nachgewiesen. Folgende Fluoreszenzfarbstoffe werden benutzt: Phycoerythrin (PE, Nachweis von CD11b), Fluorescein Isothiocyanate (FITC, Nachweis von CD62L) und Allophycocyanin (APC, Nachweis von CD66b) (alle drei BioLegend, San Diego, USA). Vor der Zugabe dieser Farbstoffe werden die PMNs, wie bereits unter 2.2.1 beschrieben, mit Ionomycin oder den verschiedenen APPs präinkubiert und anschließend mit fMLP, PMA oder Ionomycin aktiviert.

2.3 „Live-Cell-Imaging“ der Granulozyten durch Fluoreszenzmikroskopie

Zum „Live-Cell-Imaging“ wird ein Leica DMI8 Mikroskop, kombiniert mit einem motorisch verstellbarem Mikroskoptisch, einer Leica DFC9000 Kamera und einer pE-4000 Lichtquelle (alles Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Auf dem Mikroskoptisch befindet sich eine Klimakammer, die für konstante Versuchsbedingungen (37 °C und 5 % CO₂) sorgt. Sie enthält während des Versuchs das µ-Slide (Ibidi, Martinsried, Deutschland), welches mit den PMNs befüllt ist. Beim Live-Cell-Imaging liegt der Fokus auf der Dynamik verschiedener Parameter, welche die Granulozytenfunktionalitäten repräsentieren. Die Parameter sind sowohl das Migrationsverhalten (Track Length), die ROS-Produktion (T_{max}ROS) und die Intensität dieser

(ROS-Intensität) als auch die Freisetzung der MPO ($ET_{50}MPO$) und die NET-Formation ($ET_{50}NETose$). Zur Detektion von ROS wird DHR123 (siehe 2.2.1) benutzt. Die Myeloperoxidase wird durch den Fluoreszenzfarbstoff APC, der an einen Antikörper gekoppelt ist (Anti-MPO-APC, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland), sichtbar gemacht. Freie DNA wird mittels 4',6'-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) nachgewiesen. Nach Mikroskop-Start nimmt die Leica Application Suite X Software (Version 3.4.2.18368) alle 45 s je ein Foto im Phasenkontrast und den Fluoreszenzkanälen auf. Die Gesamtlaufzeit eines Experiments beträgt 20 h.

2.3.1 Vorbereitung des Versuchs

Vor dem Experiment wird ein Vormedium vorbereitet, welches aus 20 μ L Minimum Essential Medium (MEM, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 10 μ L Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$, VWR International GmbH, Radnor, Pennsylvania, USA), 50 μ L RPMI 1640 Medium und 20 μ L destilliertem Wasser besteht. Dieses Vormedium wird zusammen mit dem μ -Slide bei 37 °C und 5 % CO_2 über Nacht inkubiert. Je nach Versuch kann die Menge an destilliertem Wasser und RPMI 1640 Medium variieren. Das Volumen wird im Verlauf durch das gleiche Volumen eines Akute-Phase-Proteins ersetzt.

2.3.2 Berechnung der Verdünnung der Zellmischung

Die mittels Dichtegradientenzentrifugation isolierten Granulozyten müssen auf eine Zielzellzahl von 18 Millionen Zellen pro Milliliter verdünnt werden. Diese Konzentration wird von der Firma IBIDI als optimale Konzentration für die Kanäle der μ -Slides angegeben. Das gewünschte Endvolumen wird mittels Neubauerzählkammer ermittelt. Die isolierten Zellen werden gewaschen, der Überstand wird abpipettiert, und mit RPMI 1640 Medium inklusive 10 % FKS auf das berechnete Endvolumen gebracht. In der Vorversuchsreihe, welche die Auswirkung von verschiedenen FKS-Konzentrationen auf die PMNs untersucht, wird RPMI 1640 und die entsprechende FKS-Konzentration hinzugefügt.

2.3.3 Aufbau und Befüllung der μ -Slides

Das μ -Slide besteht aus drei Kammern. Jede Kammer besteht aus einem zentralen Kanal mit zwei, an den Kanal angeschlossenen, Reservoirs (Abbildung 4, [65]). Sowohl die Reservoirs als auch die Kanäle besitzen jeweils oben und unten ein Zugang. Über diesen Zugang werden sie mit Hilfe von speziellen, abgerundeten Pipettenspitzen (Ibidi, Martinsried, Deutschland) befüllt.

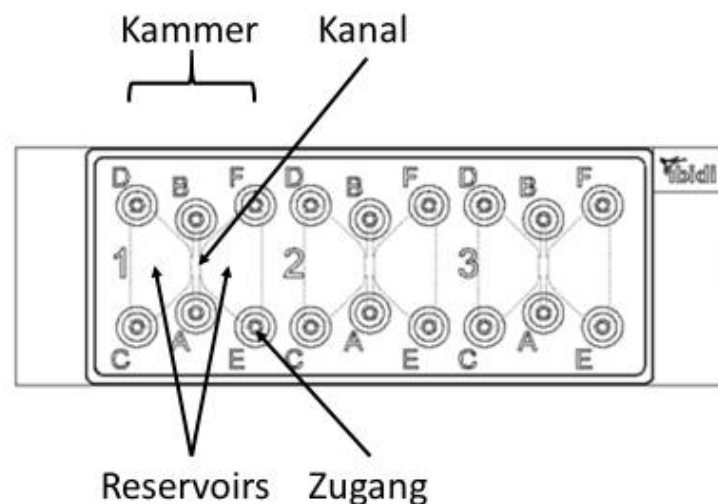


Abbildung 4: Aufbau eines IBIDI μ -Slide [65].

Der Kanal wird mit 6,5 μ L Medium befüllt. Dieses wird einer Mischung entnommen, die aus 17 μ L Zellen (mit 18×10^6 Zellen/mL), 18 – 33 μ L Vormedium (inklusive DHR123, Anti-MPO-APC und DAPI), 50 μ L PureCol Type I Bovine Collagene Solution (Kollagen, Advanced BioMatrix, Carlsbad, USA) und 5 – 15 μ L der zu prüfenden Substanz besteht. Bei den Substanzen handelt es sich entweder um CRP (finale Konzentrationen im Kanal: 1 – 10 mg/L), Ionomycin (0,1 - 0,5 μ M) oder Ferritin (150 – 1000 ng/mL). Bei einigen Versuchen mit Ferritin wird außerdem noch TNF α (Endkonzentration im Kanal: 10 ng/mL) als zusätzliche Aktivierungssubstanz beigelegt. Bei der FKS-Versuchsreihe wird keine zusätzliche Substanz hinzugefügt. Das μ -Slide wird mit den befüllten Kanälen 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, damit das Gel fest wird. Durch die eben beschriebene Herstellung des finalen Mediums für den Kanal, ändert sich die finale Konzentration von FKS auf 1,7 %. Auch bei den anderen FKS-Konzentrationen gibt es durch die Herstellung des finalen Mediums eine Konzentrationsänderung (Tabelle 1). Anschließend an die Inkubation der Kanäle werden die Reservoirs mit 65 μ L

RPMI 1640 inklusive 10 % FKS und der gleichen Konzentration an endogener Substanz wie im Kanal versehen. In der FKS-Versuchsreihe variiert das anteilige FKS wieder. Des Weiteren wird bei einigen Versuchen mit Ferritin TNF α mit in die Reservoirs gefüllt. Bei einem Großteil der Versuche wird im linken Reservoir außerdem fMLP mit einer Konzentration von 10 nM als Chemoattraktant hinzugefügt. Das μ -Slide wird am Mikroskop in die Klimakammer platziert.

Die verschiedenen FKS-Konzentrationen im Kanal und den Reservoirs werden zur besseren Übersicht in Tabelle 1 zusammengefasst. Wird in dieser Arbeit von einer FKS-Konzentration geschrieben, ist immer die Konzentration gemeint, in welcher die PMNs nach der Zählung aufgenommen wurden.

FKS-Konzentration im Medium, in welches die PMNs aufgenommen werden [%]	Finale FKS-Konzentration im Kanal [%]	FKS-Konzentration in den Reservoirs [%]
0	0	0
1	0,17	1
5	0,83	5
10	1,7	10
60	10	10

Tabelle 1: Die verschiedenen FKS-Konzentrationen in den Versuchen mit zugehöriger finaler Konzentration im Kanal und den Reservoirs. Die linke Spalte gibt die FKS-Konzentration an, welche anteilig am RPMI-Medium ist, in welchem die PMNs nach Isolation aufgenommen werden. Die mittlere Spalte gibt die FKS-Konzentration an, welche sich final im Kanal befindet. Die rechte Spalte gibt die FKS-Konzentration an, welche sich gleichzeitig in den angrenzenden Reservoirs befindet.

2.3.4 Aufnahme und Analyse der Bilddaten

Nach dem 20-stündigen Beobachtungszeitraum wird zur Auswertung der Bilder die IMARIS Software (Bitplane, Zürich, Schweiz) verwendet. Jeder Kanal des μ -Slides zählt insgesamt 1600 Bilder. Die Migration wird im Phasenkontrast analysiert. Dabei erkennt das Programm die Zellen halbautomatisch und verfolgt diese über den gesamten Zeitraum („tracken“). Die erhobenen Daten werden daraufhin in Excel (2016) exportiert. Dabei handelt es sich um die Track Length (TL), welche die gesamte Migrationslänge eines Granulozyts in μm angibt. Dazu kommt die Track Displacement Length X (TDX) und Track Displacement Length Y (TDY), welche nur den Anteil der Migration der Zelle in X- oder Y-Richtung in μm beschreibt (Abbildung 5). Zusätzlich wird die Track Duration (TD) aufgenommen. Sie zeigt die Zeit in Sekunden [s] an, die ein Granulozyt am Stück migriert. Um Artefakte auszuschließen, werden nur Zellen in

das Ergebnis eingeschlossen, welche innerhalb einer halben Stunde weiter als 25 μm (Track Length) migrierten und länger als 15 min (Track Duration) kontinuierlich beobachtet werden konnten.

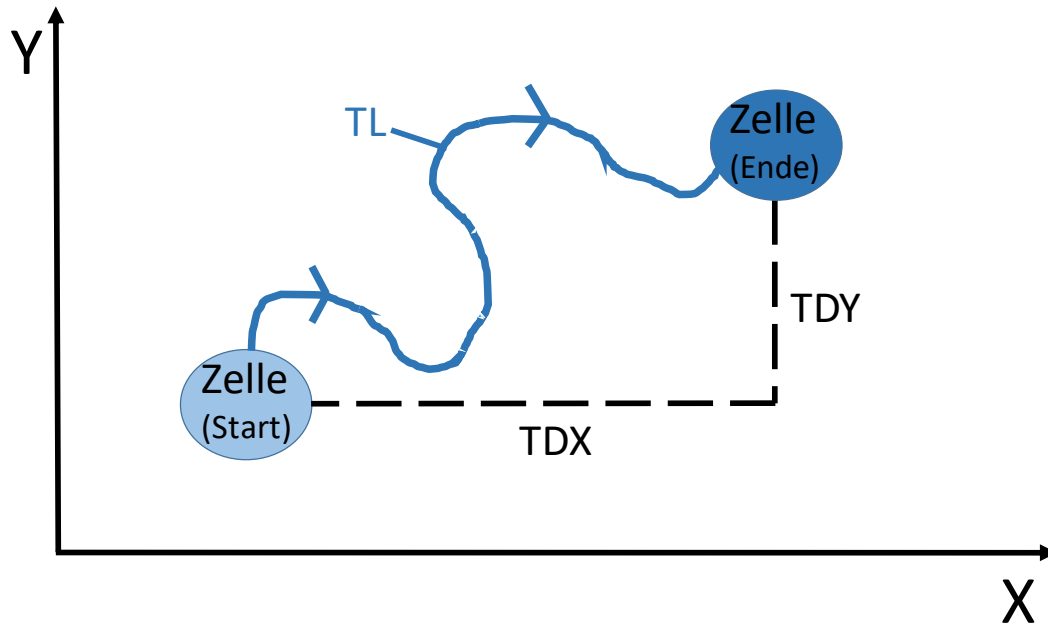


Abbildung 5: Veranschaulichung der Migrationsparameter: TL = Track Length, TDX = Track Displacement Length X, TDY = Track Displacement Length Y.

Anhand der Daten der Fluoreszenzaufnahmen berechnet IMARIS über die gesamten 20 h (Aufnahme eines Bildes alle 225 s) die Fläche der „leuchtenden Flecken“. Diese Flächen spiegeln die ROS-Produktion, MPO-Freisetzung und NET-Formationen der PMNs wider. Auch diese Daten werden in Excel exportiert. Anhand der Summe der Rhodamin-positiven Flächen je Zeitpunkt wird in Excel der Wert T_{maxROS} berechnet. Dieser stellt den Zeitpunkt der maximalen Anzahl ROS-produzierender Zellen dar. Dazu wurde ein Polynom dritten Grades der Parabel-ähnlichen Kurve angepasst (Abbildung 6).

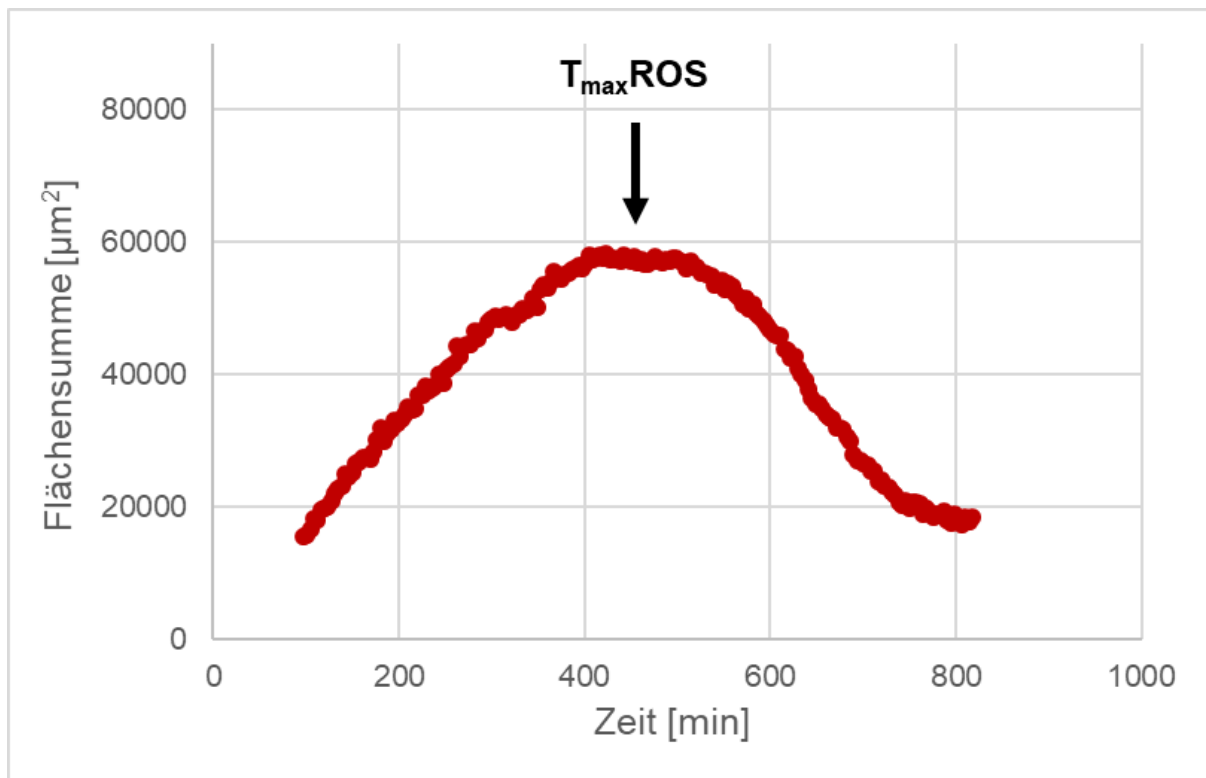


Abbildung 6: Beispielgraph ROS-Produktion und Ermittlung von $T_{\max} \text{ROS}$.

Die Daten der NET-Formationen und MPO-Freisetzung zeigen sich in einer sigmoidalen Kurve (Abbildung 7). An diese Messpunkte wird mit dem Programm Phoenix 64 Version 8.0.0 (Certara, New York, USA) eine Kurvenfunktion angepasst, um einen ET_{50} -Wert zu berechnen. Dieser zeigt an, zu welchem Zeitpunkt, die Hälfte der Zellen in NETose gegangen sind bzw. bei der Hälfte der Zellen MPO detektiert wurde. ET_{50} -Werte, welche Zeitpunkte angeben, die jenseits der Versuchsdauer liegen, werden ausgeschlossen.

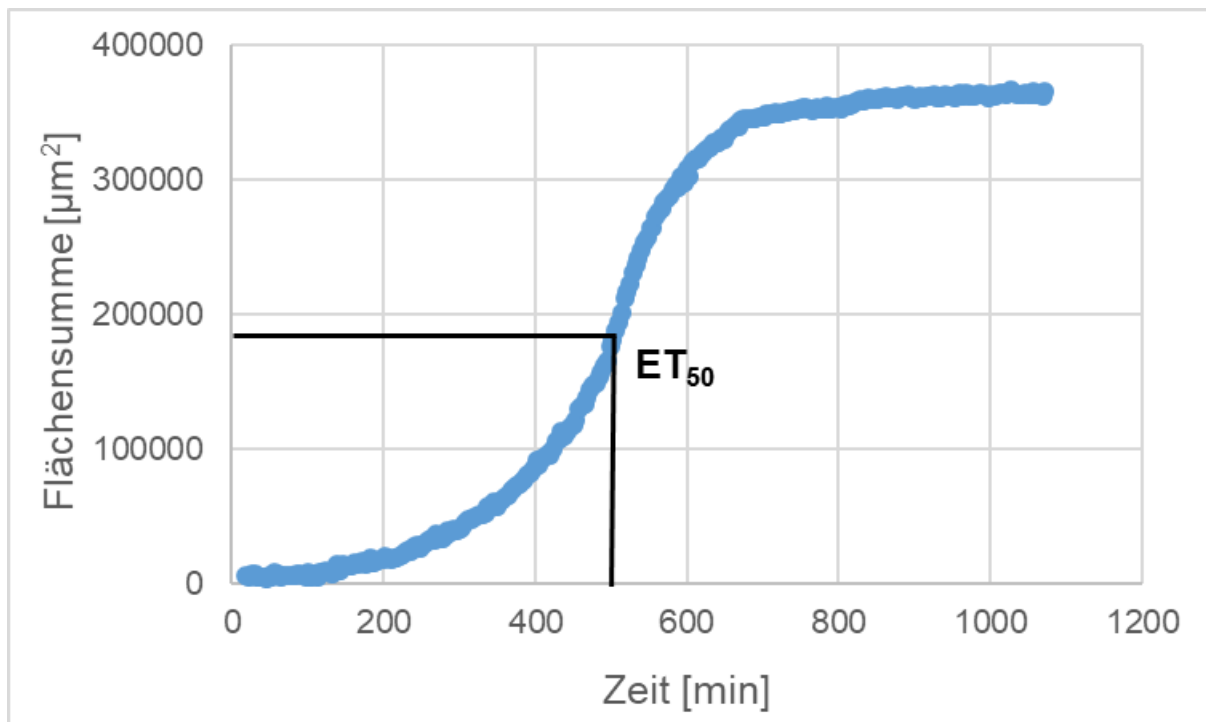


Abbildung 7: Beispielgraph ET_{50} -Wert NETose oder MPO-Freisetzung.

Für die Interpretation der ROS Intensität wird die Helligkeit der „leuchtenden Flecken“ gemessen. Hierbei wird die mittlere Intensität pro Zelle pro Zeitpunkt gemessen und der Median der mittleren Intensitäten aller Zellen pro Zeitpunkt gebildet. Letztendlich werden alle Mediane in einem größeren Zeitraum (1 – 2 h) zusammengefasst. Die Intensität der ROS-Produktion wird in der Einheit [afu] angegeben.

2.4 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wird SPSS Statistics (Version 25 und Version 26) verwendet. In dieser Arbeit wird zur besseren Vergleichbarkeit der verschiedenen Ergebnisse und aufgrund teilweise geringer Anzahl der Werte nur mit nicht-parametrischen Tests (Mann-Whitney U oder Kruskal-Wallis) gearbeitet. In Abbildungen werden die Daten als Boxplots graphisch zusammengefasst (Aufbau Boxplot: Abbildung 8). Um die Ergebnisse und insbesondere den zeitlichen Verlauf der Intensität der ROS-Produktion anschaulicher darzustellen, wird ein Liniendiagramm mit Fehlerbalken, welche ein 95 % Konfidenzintervall (CI) angeben, verwendet. Als statistisch signifikant werden p-Werte < 0,05 angesehen.

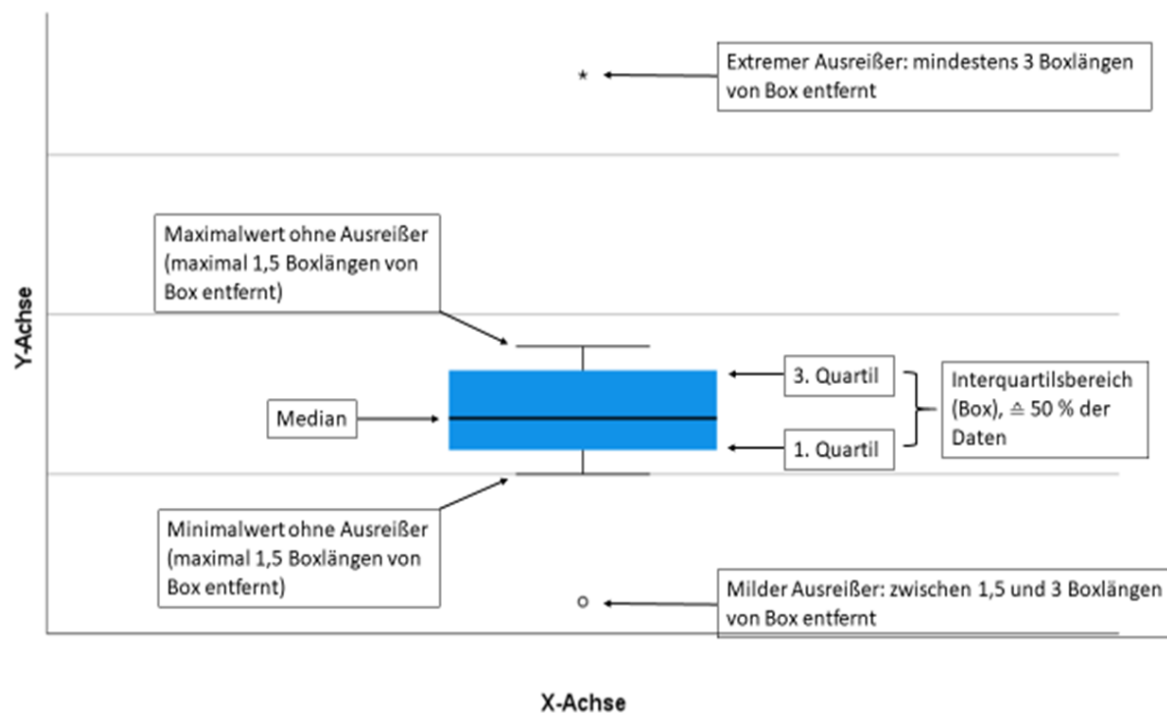


Abbildung 8: Aufbau eines Boxplots.

3 Ergebnisse

Die Parameter, die verschiedene Granulozytenfunktionalitäten beschreiben, stehen bei der Präsentation der Ergebnisse im Fokus. Die Durchflusszytometrie gibt Veränderungen der Antigenexpression von CD11b, CD62L, CD66b und des oxidativen Bursts an. Das „Live-Cell-Imaging“ detektiert die Track Length, die NETose-Formation und Freisetzung der Myeloperoxidase, die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies und die Intensität der ROS-Produktion. Zur Qualitätskontrolle wird bei jedem Versuch TDX, TDY und die Track Duration mit ausgewertet.

3.1 Qualitätskontrolle der “Live-Cell-Imaging”-Versuche

Die folgenden Parameter sind Zeichen für konstante Versuchsbedingungen und die Reproduzierbarkeit der Experimente. Sie werden bei jedem Versuch mit ausgewertet. Im Folgenden gehe ich beispielhaft auf die Parameter ein. Wenn es bei den einzelnen Auswertungen der Experimente nicht extra erwähnt wird, verhalten sich diese Parameter bei jedem Versuch mit der gleichen Tendenz.

3.1.1 Positive Track Displacement Length X und ungerichtete Track Displacement Length Y

Der Median der TDX aller Zellen gibt an, ob sich die Gesamtheit der PMNs in eine X-Richtung bewegt. Somit kann überprüft werden, ob der chemotaktische Gradient, der mit fMLP aufgebaut wurde, funktioniert. Es wird also erwartet, dass sich die Granulozyten auf das fMLP zu bewegen. In Abbildung 9 ist beispielhaft die TDX einer Kontrolle dargestellt. Es wird deutlich, dass sich die Gesamtheit der Granulozyten in der ersten halben Stunde ca. 50 μm in positiver X-Richtung bewegt. In der zweiten halben Stunde sind es weitere 62 μm . Schließlich sinkt der Wert ab der dritten halben Stunde, bis die PMNs von Minute 151 bis Minute 180 gesamt noch 6 μm in positiver X-Richtung migrieren. Da sich das fMLP auch in positiver X-Richtung befindet, ist die Qualitätskontrolle mit TDX erfolgreich.

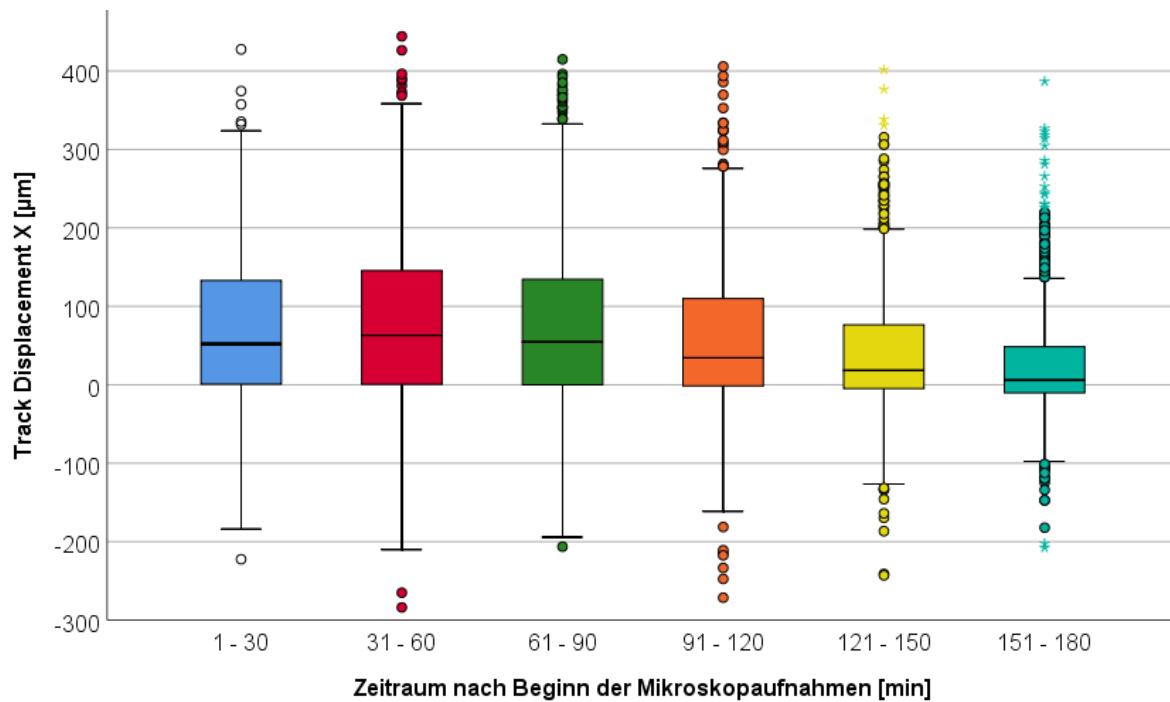


Abbildung 9: Beispiel für die Auswertung von TDX.

Mit Hilfe von TDY wird die Verschiebung der Gesamtheit der PMNs in Y-Richtung untersucht. Da sich in Y-Richtung kein chemotaktischer Gradient befindet gilt der Versuch bezüglich TDY als erfolgreich, wenn sich zu allen Zeitpunkten der Median von TDY aller Zellen um den Wert 0 µm herum befindet, wie es in Abbildung 10 der Fall ist.

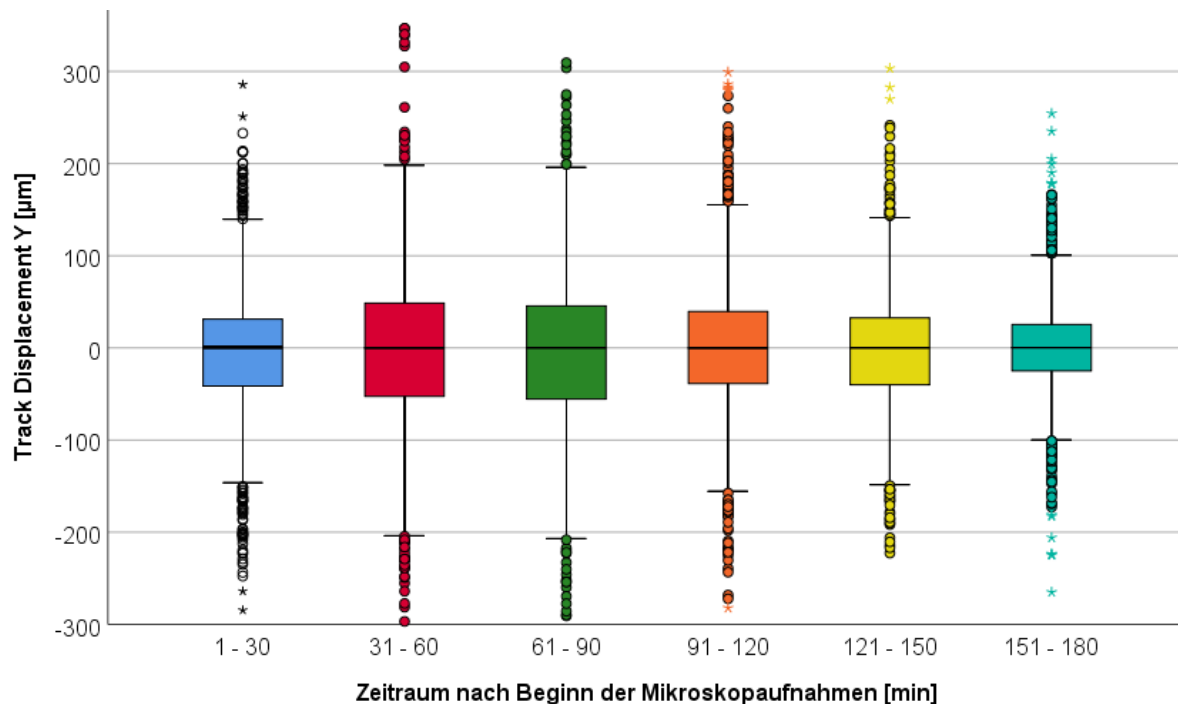


Abbildung 10: Beispiel für die Auswertung von TDY.

3.1.2 Hohe Track Duration vieler Granulozyten

Im folgenden Histogramm sieht man die Verteilung und Häufigkeit der einzelnen Track Durations der Granulozyten (Abbildung 11). Die Versuchsbedingungen sind diejenigen einer Kontrollgruppe. Die x-Achse beginnt bei 900 s, da eine Track Duration < 900 s ausgeschlossen wurde und endet bei 1800 s, da dies einer halben Stunde entspricht und die Auswertung der Migrationsdaten in Beobachtungsintervallen von einer halben Stunde erfolgt ist. Die Abbildung zeigt, dass viele PMNs eine lange Track Duration haben.

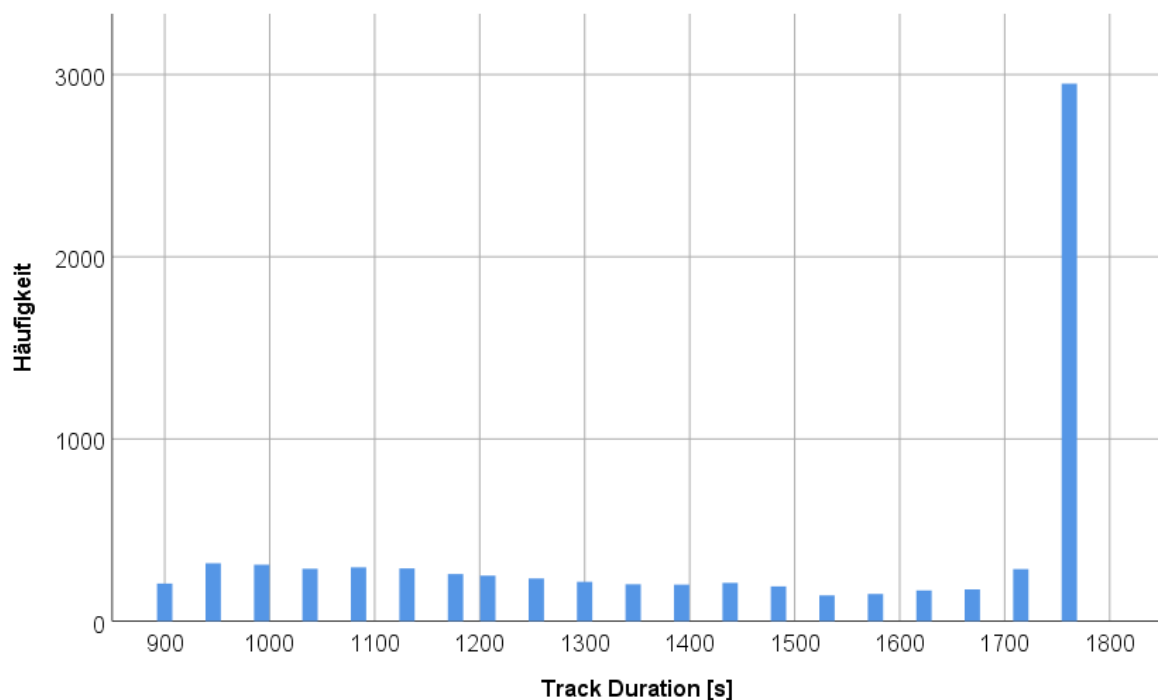


Abbildung 11: Verteilung der Track Duration aller Granulozyten eines Versuchs.

3.2 Probandencharakteristika

Die Auswertung der Fragebögen, die jeder Proband vor der Blutentnahme ausfüllen musste, ergibt folgende Tabelle 2. Es wurden insgesamt 52 Versuche durchgeführt.

Eigenschaft	Median (Minimum – Maximum)
Anzahl Versuche	52
männlich/weiblich	31/21
Alter [a]	23 (20-61)
Größe [cm]	177 (158-196)
Gewicht [kg]	67,5 (46-102)
BMI [kg/m ²]	22 (18-29)

Tabelle 2: Eigenschaften der Granulozytenspender. Für jeden Versuch wird ein Proband benötigt. Insgesamt waren es 35 unterschiedliche Probanden. Einige haben zweifach (n = 9), dreifach (n = 1) oder siebenfach (n = 1) gespendet, wobei immer mehrere Tage zwischen zwei Blutentnahmen lagen.

3.3 Ergebnisse der Vorversuche zur Methodenoptimierung

Es wurden „Live-Cell-Imaging“-Versuche mit verschiedenen Konzentrationen FKS (0; 1; 5; 10; 60 %) durchgeführt. Die Vorversuche mit Ionomycin wurden mittels „Live-Cell-Imaging“ (0,1; 0,5 µM) und der Durchflusszytometrie (0,005; 0,05; 0,5; 5 µM) angesetzt. In der folgenden Auswertung werden statistisch signifikante Veränderungen der jeweiligen Werte häufig mit einer eckigen Klammer in der Abbildung angegeben. Hierbei zeigen die Enden der Klammer auf die Bedingungen, zwischen welchen die signifikante Veränderung besteht. Außerdem ist die Klammer mit dem dazugehörigen p-Wert beschriftet.

3.3.1 Ergebnisse zur Wirkung von Fetalem Kälberserum auf PMNs

Es wurden insgesamt 15 Versuche mit unterschiedlichen FKS-Konzentrationen geplant und umgesetzt. Diese Experimente wurden alle als „Live-Cell-Imaging“ durchgeführt. Bei zwei der 15 Versuche zeigte sich bei der Auswertung ein massiver Bakterienbefall. Weitere einzelne Kanäle waren aufgrund der Zerstörung des Gels im Kanal beim Befüllen der Reservoirs nicht auswertbar. Diese Ergebnisse gehen daher nicht in die Gesamtauswertung mit ein.

3.3.1.1 „Live-Cell-Imaging“ der PMNs

Alle 15 Versuche beinhalteten fMLP als Chemoattraktant. Es wurden keine Daten anhand der Durchflusszytometrie ermittelt.

3.3.1.1.1 Track Length

In Abbildung 12 wird die Track Length für verschiedene Konzentrationen an FKS dargestellt. Für jede Konzentration findet eine weitere Unterteilung in Halb-Stunden-Abschnitte statt. Somit steht im folgenden Diagramm blau für die erste halbe Stunde des Beobachtungszeitraums, rot für die zweite halbe Stunde usw.

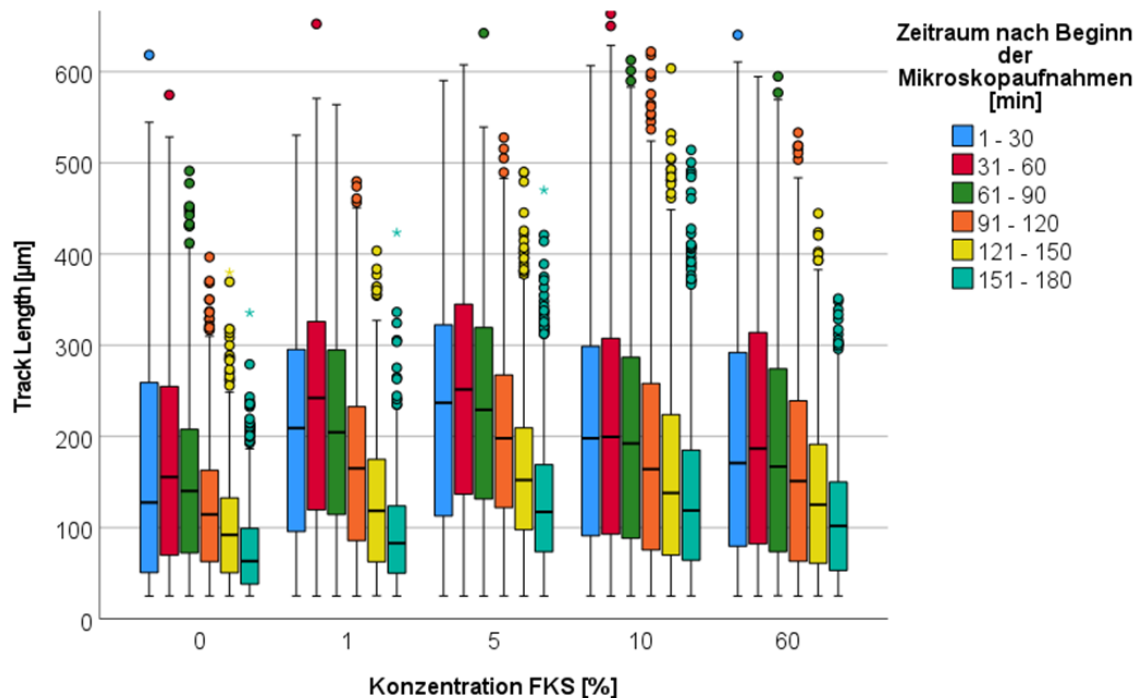


Abbildung 12: Track Length der Granulozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen von FKS, aufgeteilt in Halb-Stunden-Zeitintervalle.

Es ist zu erkennen, dass die Track Length im Median in der ersten halben Stunde je nach Bedingung zwischen 100 und 250 µm liegt. In der zweiten halben Stunde ist die Track Length im Vergleich zur ersten halben Stunde ein wenig länger, um ab der dritten halben Stunde bis zur sechsten halben Stunde kontinuierlich abzunehmen.

Zur besseren Übersicht und um die Auswirkungen der verschiedenen Konzentrationen besser vergleichen zu können, werden in Abbildung 13 die ersten beiden halben Stunden zusammengefasst. Somit wird die komplette erste Stunde des Beobachtungszeitraums dargestellt.

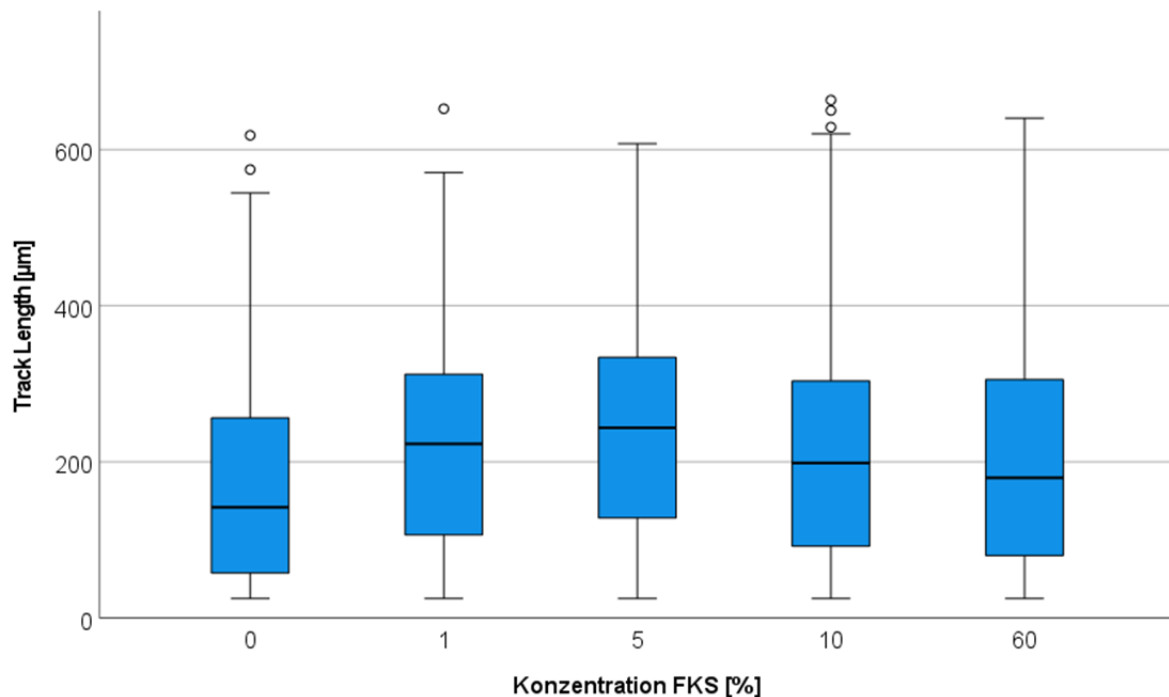


Abbildung 13: Track Length der Granulozyten mit verschiedenen Konzentrationen FKS. Es wird die erste Stunde des Beobachtungszeitraums dargestellt. Die Anzahl der beobachteten Zellen liegt pro Boxplot zwischen 2184 und 3657.

Die PMNs migrieren ohne FKS (0 %) im Median in der ersten Stunde am wenigsten weit (142 µm). Die Track Length steigert sich, bis mit 5 % FKS das Maximum erreicht wird (244 µm). Mit 10 % (199 µm) und 60 % (180 µm) FKS verkürzt sich die Track Length der PMNs wieder. Sämtliche paarweisen Vergleiche, außer der Vergleich der Gruppen mit 10 % und 60 % FKS, zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$).

3.3.1.1.2 NETose und Freisetzung der Myeloperoxidase

Nun wird auf die ET_{50} -Werte der NETose Formation und der Freisetzung von MPO eingegangen. Abbildung 14 zeigt die ET_{50} -Werte der NETose der PMNs.

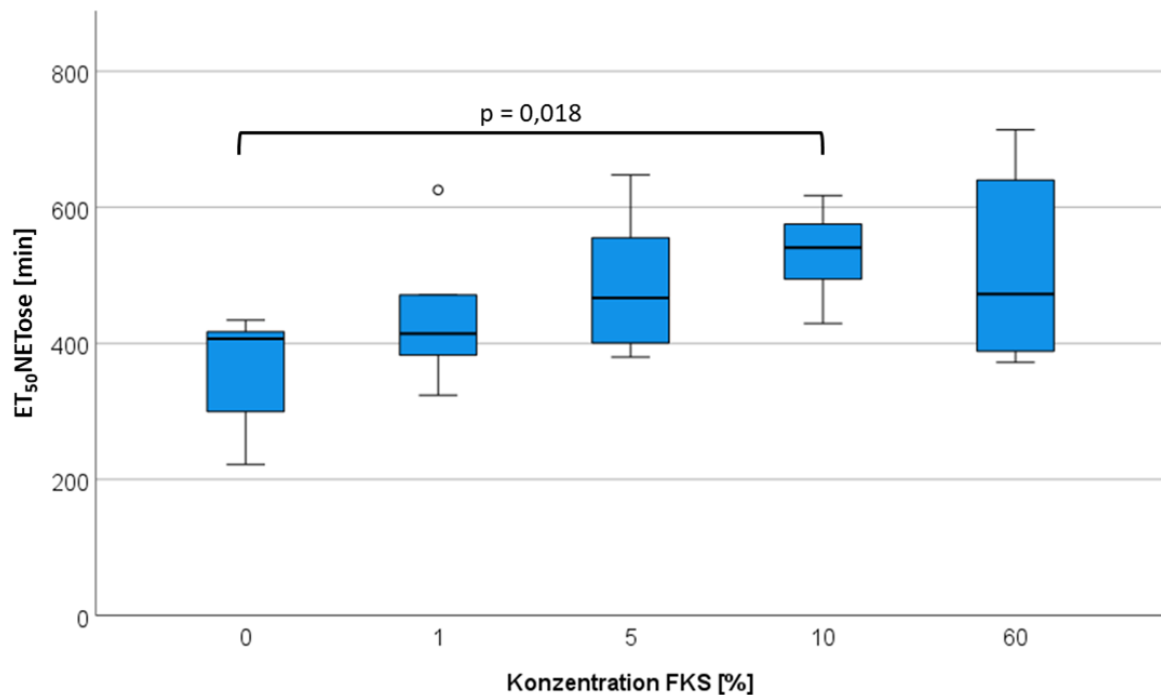


Abbildung 14: Darstellung der ET_{50} -Werte der NETose bei unterschiedlichen Konzentrationen FKS. N liegt pro Boxplot zwischen 6 und 8.

Es wird deutlich, dass mit steigender FKS-Konzentration die Mediane der ET_{50} -Werte ansteigen, also die NETose später einsetzt. Das Maximum liegt mit 541 min in der 10 %-Gruppe, der Unterschied zur 0%-Gruppe (407 min) ist signifikant.

Als nächstes werden die ET_{50} -Werte der Freisetzung von MPO verglichen (Abbildung 15). Für die Bedingung 1 % FKS konnte wegen technischer Probleme nur ein Versuch ausgewertet werden, weshalb diese nicht in der Abbildung dargestellt ist.

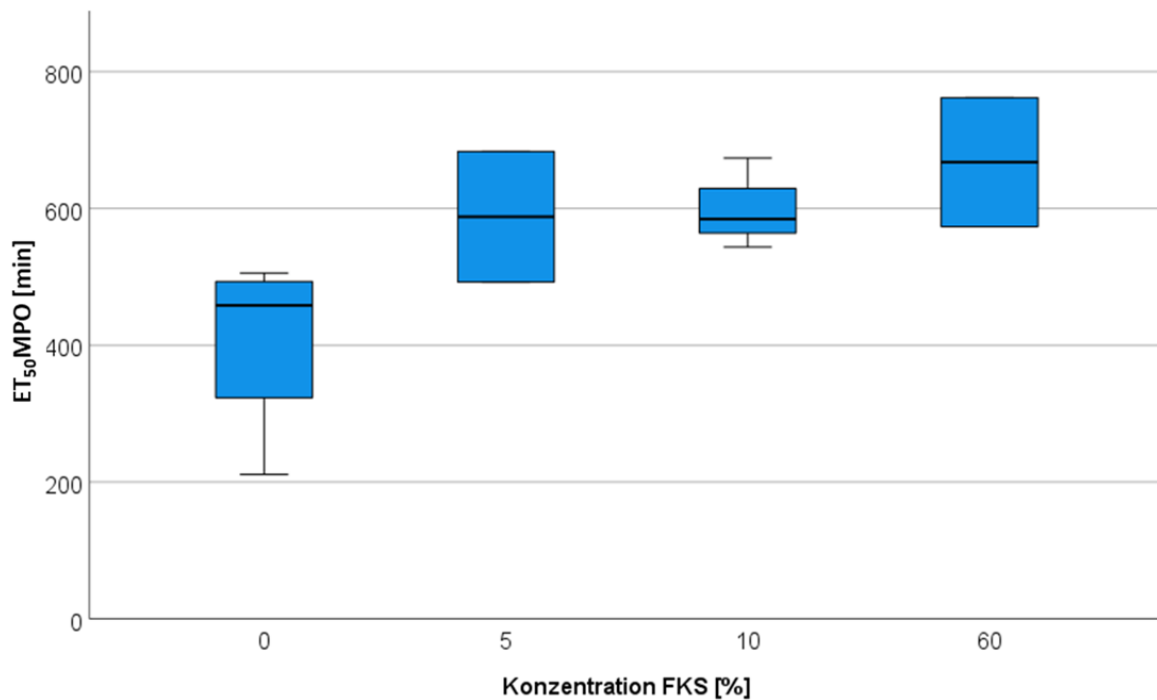


Abbildung 15: Darstellung der ET_{50} -Werte der MPO-Freisetzung bei unterschiedlichen Konzentrationen FKS. N liegt pro Boxplot zwischen 2 und 5.

Mit steigender FKS-Konzentration steigen auch die ET_{50} MPO-Werte von 435 min ohne FKS auf 668 min bei 60 % FKS an, allerdings nicht-signifikant.

3.3.1.1.3 ROS-Produktion und Intensität

T_{\max} ROS ist der Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion durch die PMNs. Er wird in nachfolgender Abbildung 16 für die verschiedenen Konzentrationen FKS dargestellt.

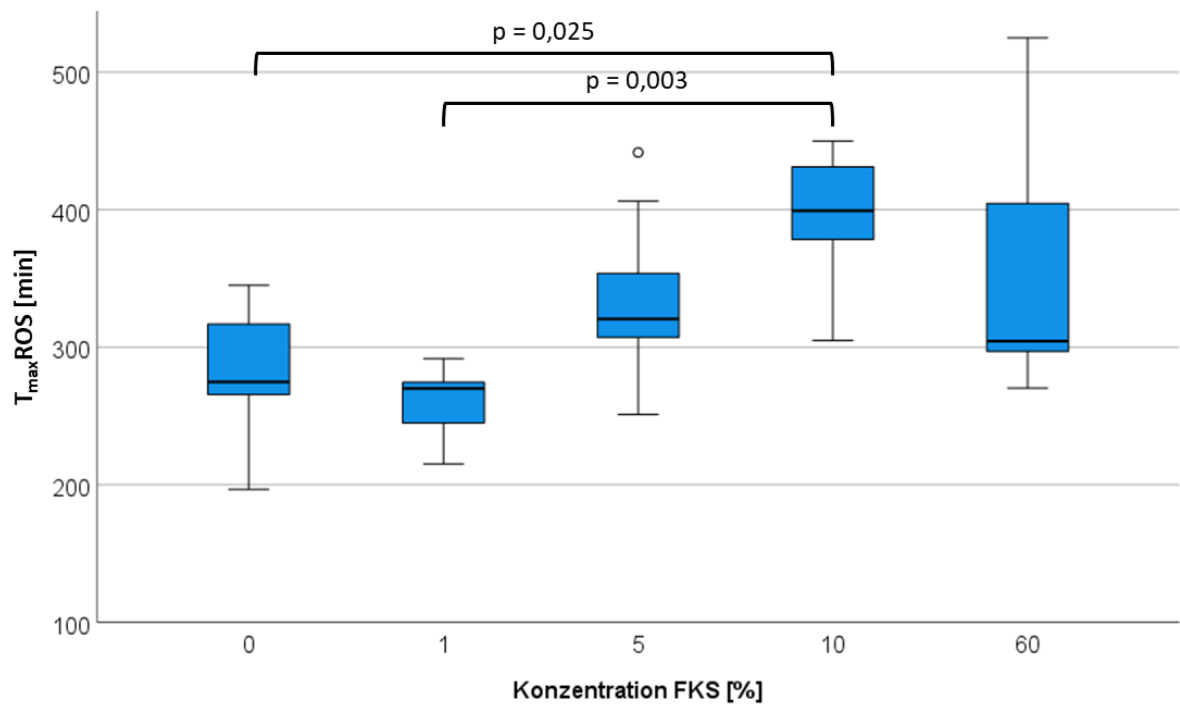


Abbildung 16: $T_{\max}ROS$ -Werte der PMNs bei unterschiedlichen FKS-Konzentrationen. N liegt pro Boxplot zwischen 5 und 9.

Die $T_{\max}ROS$ -Werten zeigen, dass eine höhere FKS-Konzentration den Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion tendenziell verzögert. Der höchste $T_{\max}ROS$ -Wert liegt in der 10 % FKS-Gruppe mit 399 min. Hierbei ist die Veränderung der $T_{\max}ROS$ -Werte statistisch signifikant zwischen den Gruppen 0 % FKS (275 min) und 10 % FKS sowie zwischen den Gruppen 1 % FKS (270 min) und 10 % FKS.

Als letzter Parameter wird die Intensität der ROS-Produktion bewertet (Abbildung 17).

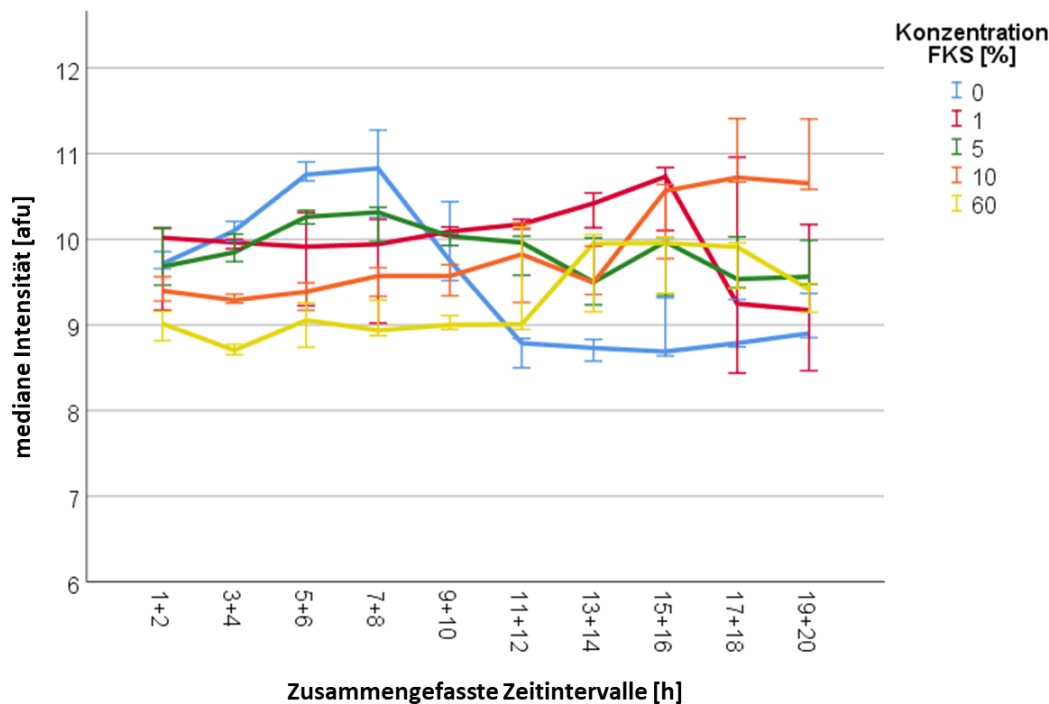


Abbildung 17: Mediane Intensität der ROS-Produktion durch PMNs bei unterschiedlichen Konzentrationen von FKS über 20 h hinweg. Fehlerbalken: 95 % Konfidenzintervall (CI). N liegt pro Gruppe im Zeitintervall 1 + 2 h zwischen 192 und 305 und im Zeitintervall 19 + 20 h zwischen 64 und 145.

Die mediane Intensität der ROS-Produktion durch die PMNs nach Einfluss einer der fünf Konzentrationen FKS liegt zu Beginn zwischen 9,0 und 10,0 afu. Dabei ist die geringste mediane Intensität mit 9,0 afu diejenige der 60 % FKS-Gruppe. Zum Zeitpunkt 1 + 2 h zeigen die vier anderen FKS-Gruppen jeweils einen signifikanten Unterschied zur 60 % FKS-Gruppe ($p < 0,001$). Betrachtet man den Gesamtverlauf jeder Kurve für sich, nehmen die 0 %-Kurve und die 1 %-Kurve über den 20 h-Zeitraum ab. Die 5 %-Kurve verändert sich wenig. Die 10 %-Kurve und die 60 %-Kurve nehmen zu. Zum Zeitpunkt 19 + 20 h liegen die Mediane der medianen ROS-Intensität zwischen 8,9 (0 % FKS) und 10,7 (10 % FKS) afu.

3.3.2 Ergebnisse zur Wirkung von Ionomycin auf PMNs

Zuerst wurden die verschiedenen Funktionen der PMNs nach Inkubation mit Ionomycin mittels Durchflusszytometrie untersucht. Im weiteren Verlauf wurde die Auswirkung von Ionomycin auf die PMNs durch „Live-Cell-Imaging“-Versuche geprüft.

3.3.2.1 Daten der Durchflusszytometrie

Es wurden zwei Versuche mit 0 (Kontrolle); 0,005; 0,05; 0,5 und 5 μM Ionomycin mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Dafür wurden die PMNs isoliert und anschließend 20 min mit der jeweiligen Konzentration Ionomycin inkubiert. Als Parameter für

die Granulozytenfunktionalität lag der Schwerpunkt auf der Ermittlung der Veränderung des Oxidativen Bursts und der Veränderung der Expression der Oberflächenproteine CD11b, CD62L und CD66b.

3.3.2.1.1 Oxidativer Burst

Für die Messung des Oxidativen Bursts wurden pro Versuch zwei Ansätze vorbereitet. Die Auswertung der Daten ergibt folgende Abbildung 18.

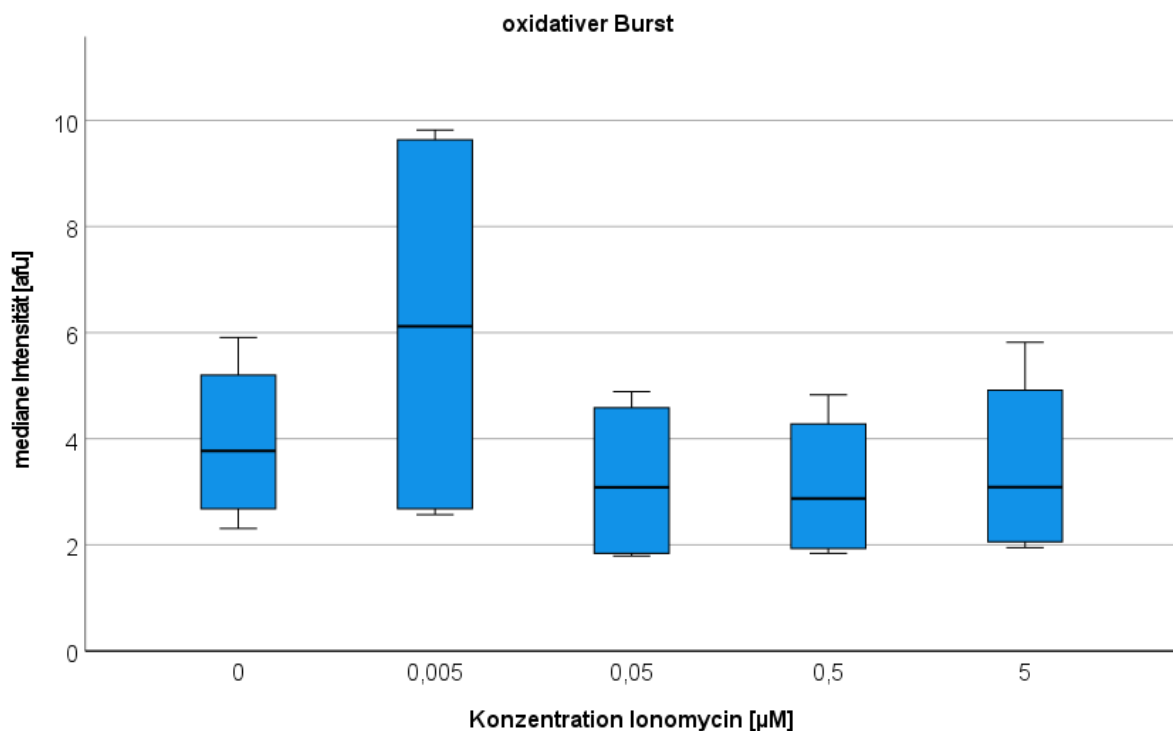


Abbildung 18: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Aktivierung mit verschiedenen Konzentrationen Ionomycin. N liegt pro Boxplot bei 4.

Die mediane Fluoreszenzintensität der Zelloberflächen liegt bei den verschiedenen Konzentrationen Ionomycin zwischen 2,9 und 6,1 afu. Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Veränderungen der medianen Intensität zwischen der Kontrolle und den einzelnen Ionomycin-Gruppen.

3.3.2.1.2 Antigenexpression

Für die Messung der Antigenexpression wurden ebenfalls zwei Versuche mit jeweils zwei Ansätzen durchgeführt. Es wird nacheinander auf die Oberflächenproteine CD11b, CD62L und CD66b eingegangen.

Die folgende Abbildung 19 ist eine Darstellung der medianen Intensität von CD11b nach Aktivierung der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ionomycin.

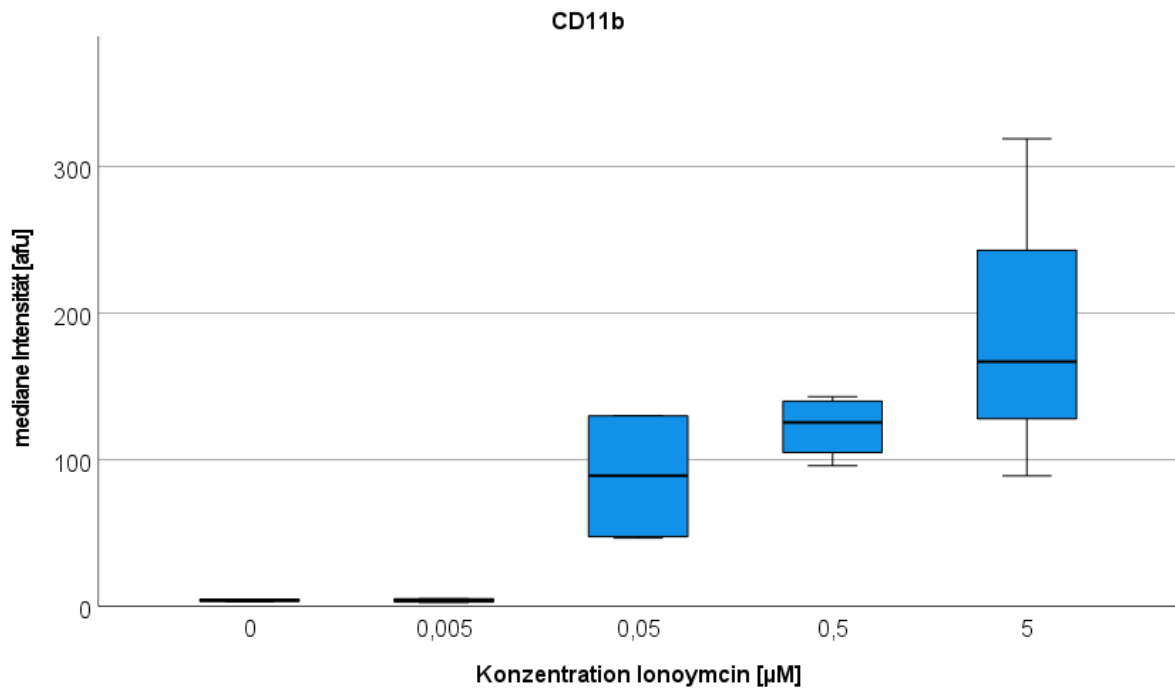


Abbildung 19: Mediane Intensität von CD11b nach Aktivierung der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ionomycin. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 4.

Die Abbildung zeigt, dass die mediane Intensität von 0 µM Ionomycin (4 afu) bis 5 µM Ionomycin (167 afu) durchgehend ansteigt.

Die Ergebnisse bezüglich des Oberflächenproteins CD62L werden in Abbildung 20 präsentiert. Hierbei wird darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse als nicht realistisch eingeschätzt werden, da sich die Werte von denen aus späteren Versuchen, vor allem bezüglich der Kontrolle (0 µM Ionomycin) und der 0,5 µM-Ionomycin Gruppe, stark unterscheiden (siehe Abbildung 29, Abbildung 42, Abbildung 53). Gründe dafür werden unter 4.2 diskutiert.

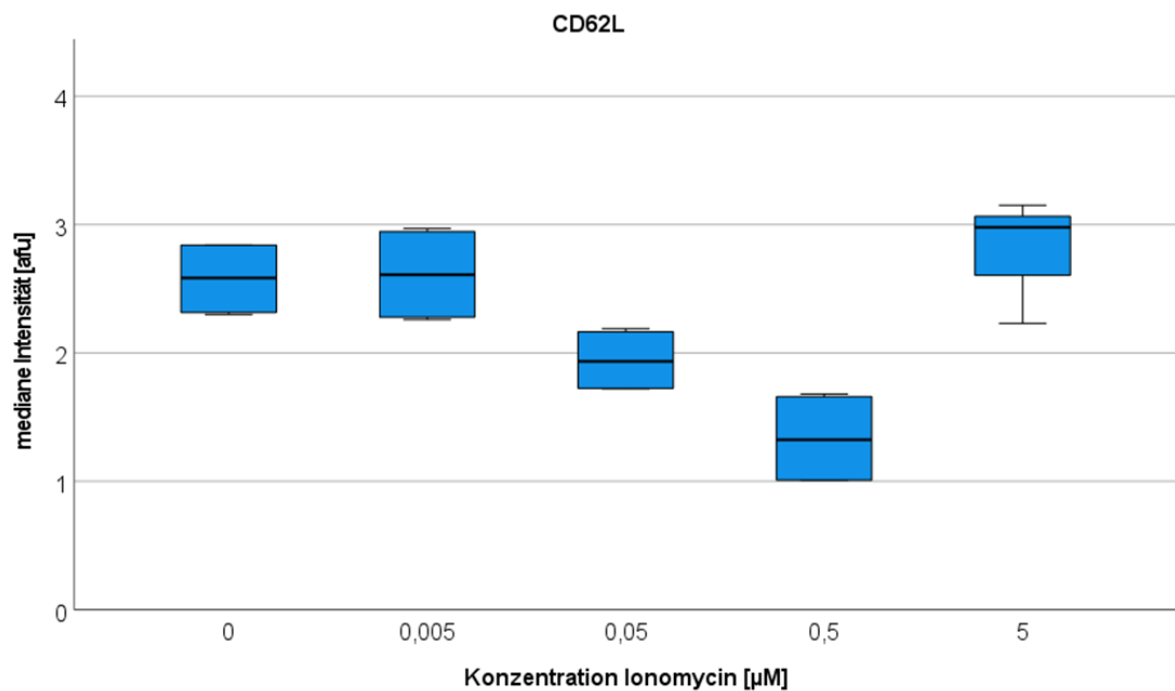


Abbildung 20: Mediane Intensität von CD62L nach Aktivierung der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ionomycin. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 4.

Als letzten Parameter der Durchflusszytometrie wird die Expression des Oberflächenproteins CD66b ausgewertet (Abbildung 21).

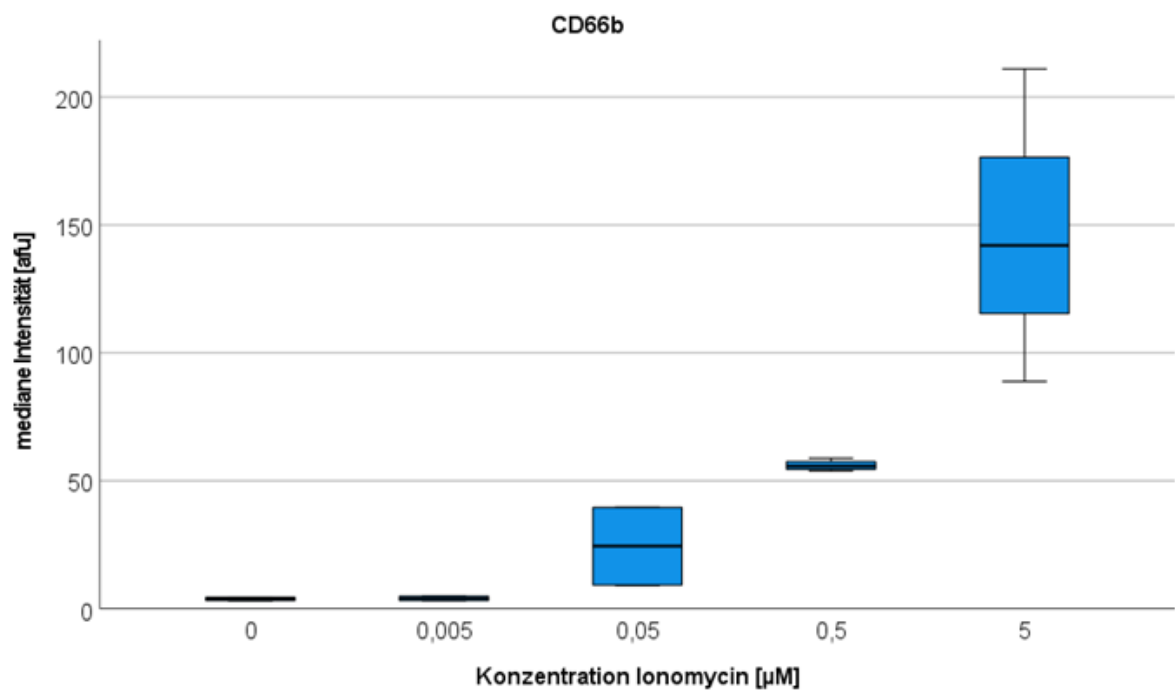


Abbildung 21: Mediane Intensität von CD66b nach Aktivierung der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ionomycin. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 4.

Es lässt sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der medianen Intensität feststellen, wobei das Maximum in der 5 μM -Gruppe (142 afu) liegt.

3.3.2.2 „Live-Cell-Imaging“ der PMNs

Es wurden vier Versuche mit „Live-Cell-Imaging“ durchgeführt. Die Ionomycin-Konzentrationen lagen bei 0 μM (Kontrolle), 0,1 μM und 0,5 μM . Es wurde stets fMLP als Chemoattraktant in einem Reservoir verwendet.

3.3.2.2.1 Track Length

Folgende Abbildung 22 zeigt die erste Stunde der Migrationsdaten nach Inkubation der PMNs mit Ionomycin.

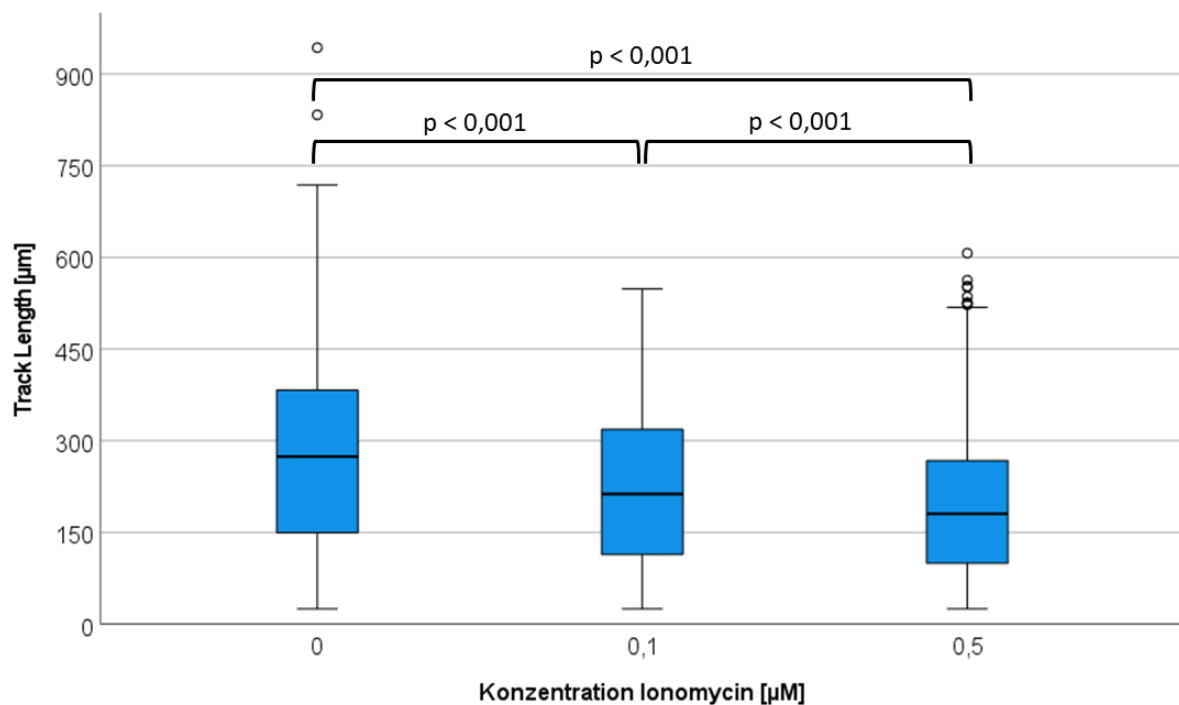


Abbildung 22: Track Length der PMNs unter Einfluss verschiedener Konzentrationen Ionomycin. Es wird die erste Stunde des Beobachtungszeitraums dargestellt. Die Anzahl der beobachteten Zellen liegt pro Boxplot zwischen 1146 und 2223.

Die PMNs migrieren im Median in der Kontrollgruppe 274 μm weit. Mit steigender Konzentration Ionomycin nimmt die Track Length ab (0,1 μM -Gruppe: 213 μm ; 0,5 μM -Gruppe: 181 μm). Diese Veränderung ist im paarweisen Vergleich der Gruppen statistisch signifikant.

3.3.2.2.2 NETose und Freisetzung der Myeloperoxidase

Als Maß für die NETose wird der ET_{50} -Wert herangezogen. Abbildung 23 zeigt die ET_{50} -Werte der in NETose gegangenen PMNs unter Einfluss verschiedener Konzentrationen Ionomycin.

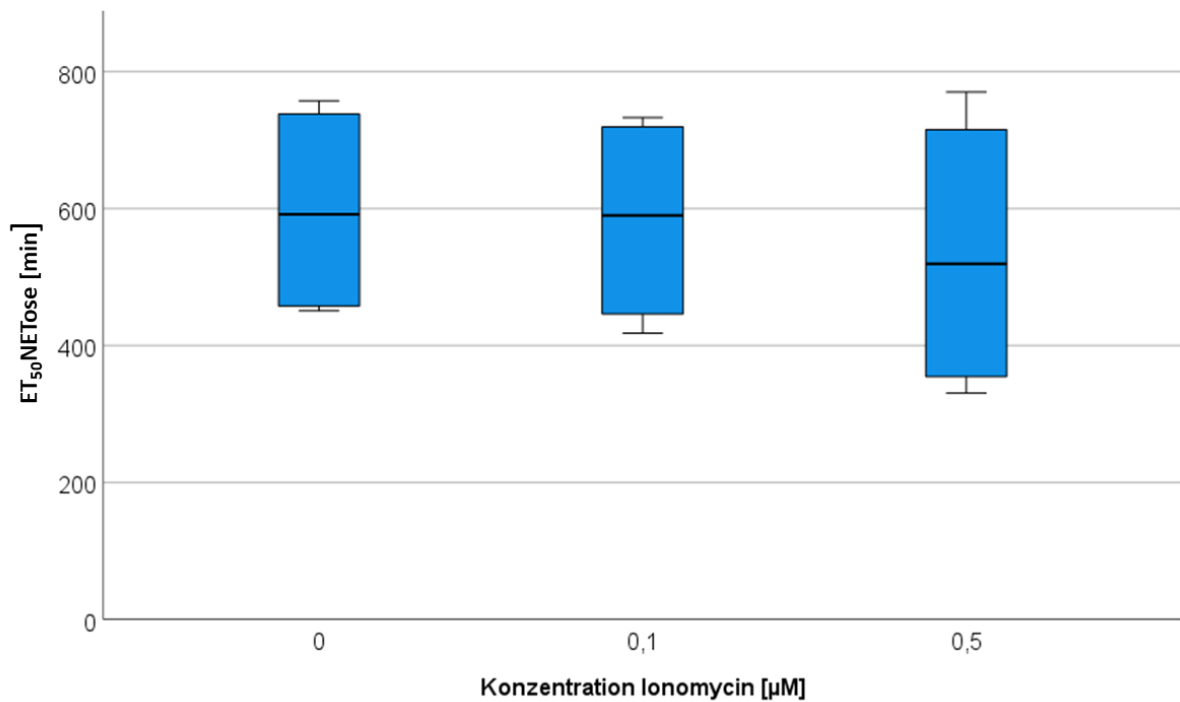


Abbildung 23: Darstellung der ET_{50} -Werte der NETose unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Ionomycin. N liegt pro Boxplot bei 4.

Die Mediane der ET_{50} -NETose-Werte der verschiedenen Gruppen liegen bei 592 min (Kontrolle), 590 min (0,1 µM-Gruppe) und 520 min (0,5 µM-Gruppe). Es gibt keine signifikanten Veränderungen der ET_{50} -NETose-Werte im paarweisen Vergleich dieser Gruppen.

Werden die ET_{50} -Werte der Freisetzung von MPO betrachtet, so ergibt sich daraus folgende Abbildung 24.

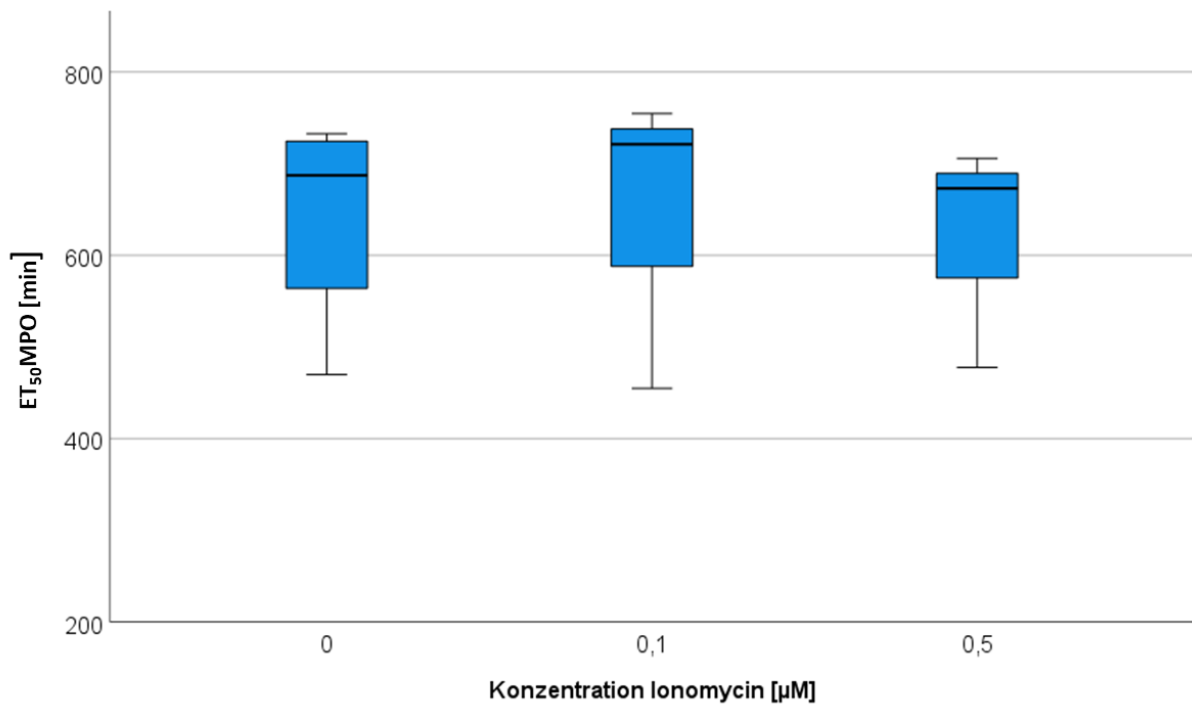


Abbildung 24: Darstellung der ET_{50} -Werte der MPO-Freisetzung unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Ionomycin. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 4.

Die Mediane der drei Gruppen liegen bei 687 min (Kontrolle), 721 min (0,1 µM-Gruppe) und 673 min (0,5 µM-Gruppe). Es gibt keine signifikanten Veränderungen der ET_{50} -MPO-Werte im paarweisen Vergleich dieser Gruppen.

3.3.2.2.3 ROS-Produktion und Intensität

Die Zeitpunkte der maximalen ROS-Produktion der PMNs unter Einfluss verschiedener Konzentrationen Ionomycin werden in Abbildung 25 dargestellt.

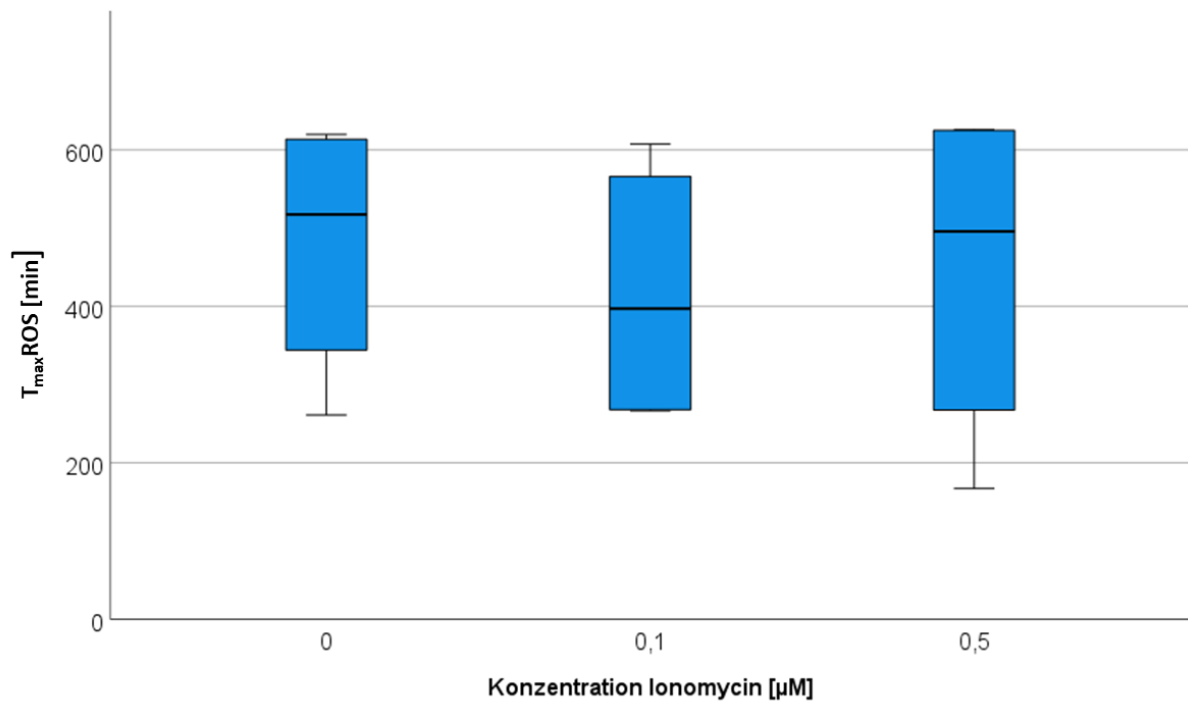


Abbildung 25: Darstellung der $T_{max}ROS$ -Werte unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Ionomycin. N liegt pro Boxplot bei 4.

Die Mediane der $T_{max}ROS$ -Werte der verschiedenen Gruppen liegen bei 518 min (Kontrolle), 397 min (0,1 µM-Gruppe) und 496 min (0,5 µM-Gruppe). Diese Veränderungen sind statistisch nicht signifikant.

Als letzter Parameter wird die Intensität der ROS-Produktion durch die PMNs nach Einfluss verschiedener Konzentrationen Ionomycin betrachtet (Abbildung 26).

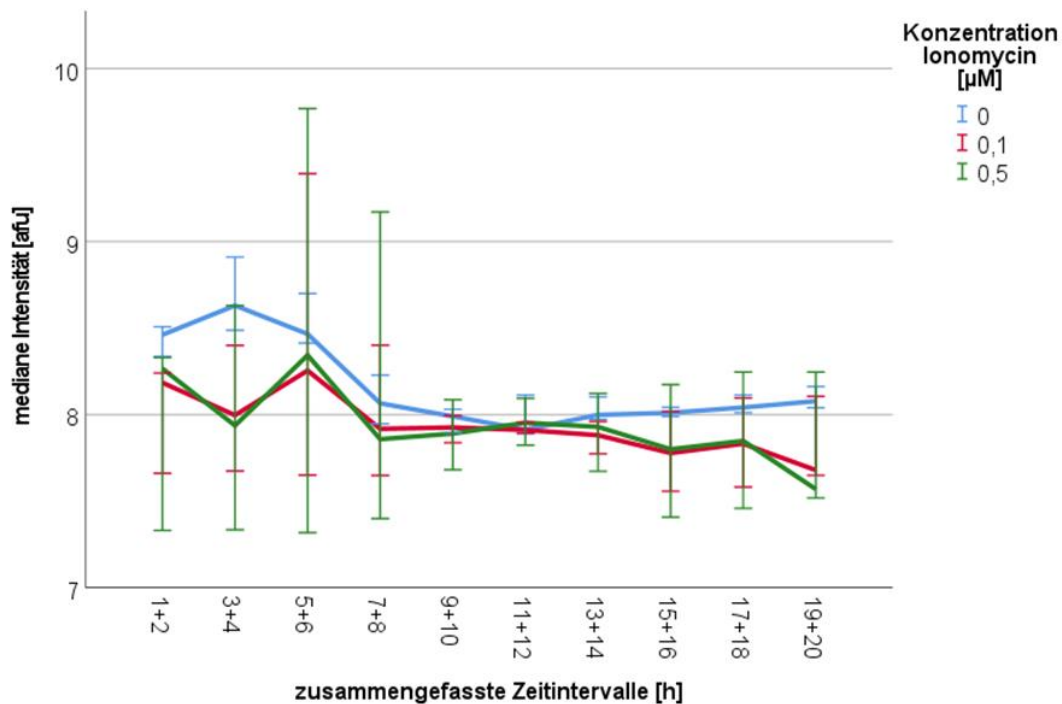


Abbildung 26: Mediane Intensität der ROS-Produktion durch PMNs unter Einfluss verschiedener Konzentrationen Ionomycin über 20 h. Fehlerbalken: 95 % CI. N liegt pro Gruppe zum Zeitintervall 1 + 2 h zwischen 62 und 257 und im Zeitintervall 19 + 20 h zwischen 63 und 254.

Der Median der medianen Intensität der ROS-Produktion der Kontrolle liegt bei 8,5 afu, der der 0,1 μ M-Gruppe bei 8,2 afu und derjenige der 0,5 μ M-Gruppe bei 8,3 afu. Hierbei ist der Unterschied der Kontrolle zur 0,1 μ M-Gruppe sowie der Unterschied der Kontrolle zur 0,5 μ M-Gruppe statistisch signifikant (jeweils $p < 0,001$). Zum Zeitpunkt 19 + 20 h liegen die Mediane der medianen ROS-Intensität zwischen 7,6 (0,5 μ M-Gruppe) und 8,1 (Kontrolle) afu.

3.4 Ergebnisse der Durchflusszytometrie der Hauptversuche

Im Folgenden wird auf die Ergebnisse eingegangen, die mittels Durchflusszytometrie gewonnen worden sind. Dabei stehen die Antigenexpression und die Erzeugung des oxidativen Bursts durch die Granulozyten im Vordergrund. Es wurden Versuche mit den endogenen Substanzen CRP, Ferritin und Fibrinogen in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Dabei wurden die PMNs mit den APPs für 30 min präinkubiert und anschließend mit $\text{TNF}\alpha$ /fMLP ($\text{TNF}\alpha$: 10 ng/mL; fMLP: 100 nM), PMA (100 nM) oder Ionomycin (0,5 μ M) für 20 – 30 min (genaue Zeitangaben und Ablauf unter 2.2.1) aktiviert. Die Messung des oxidativen Bursts wurde im Zeitraum von 2 h 45 min bis 3 h 55 min nach der Blutentnahme durchgeführt, die der Antigenexpression im Zeitraum von 3 h 10 min bis 4 h 20 min.

3.4.1 Überblick der Ergebnisse des Einflusses von CRP, Ferritin und Fibrinogen auf die Antigenexpression und den oxidativen Burst der PMNs

Die PMNs wurden für den Überblick mit einer Konzentration pro APP präinkubiert. Hierbei weist Ferritin eine Konzentration von 500 ng/mL, Fibrinogen eine Konzentration von 2,8 mg/mL und CRP eine Konzentration von 50 mg/L auf. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche unter diesen Bedingungen. Die Spalte „beobachteter Parameter“ führt die gemessenen Granulozytenfunktionalitäten auf. In der Spalte rechts daneben werden die verwendeten APPs eingetragen („Endogener Modulator“). Die vier Spalten unter „Vergleich“ zeigen, mit welcher Substanz die PMNs nach der Präinkubation aktiviert worden sind. In der Statistik werden die Unterschiede zur Kontrolle geprüft. Die Kontrolle sind PMNs, welche mit der gleichen Substanz aktiviert worden sind, ohne vorher mit einer endogenen Substanz präinkubiert worden zu sein. Die Pfeile markieren die Felder mit einer signifikanten Veränderung im Vergleich zur Kontrolle. Die genauen Werte (mediane Fluoreszenzintensität, relative Änderung gegenüber der Kontrolle, Anzahl) sind im Anhang in Tabelle 6 aufgeführt.

Beobachteter Parameter	Endogener Modulator (Präinkubation)	Vergleich			
		ohne Aktivierungssubstanz (gegen Kontrolle ohne Präinkubation)	TNFα/fMLP (gegen Kontrolle TNFα/fMLP ohne Präinkubation)	PMA (gegen Kontrolle PMA ohne Präinkubation)	Ionomycin (gegen Kontrolle Ionomycin ohne Präinkubation)
Burst	Ferritin	n.s.	n.s.	↑ (+ 346 %; p = 0,047)	↑ (+ 30 %; p = 0,014)
	Fibrinogen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	CRP	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD11b	Ferritin	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Fibrinogen	↑ (+ 1859 %; p = 0,004)	n.s.	n.s.	n.s.
	CRP	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD62L	Ferritin	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Fibrinogen	↓ (- 82 %; p = 0,004)	n.s.	n.s.	n.s.
	CRP	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD66b	Ferritin	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Fibrinogen	↑ (+ 428 %; p = 0,005)	↑ (+ 60 %; p = 0,016)	n.s.	n.s.
	CRP	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 3: Überblick der Durchflusszytometer Ergebnisse; Eingesetzte Konzentrationen der Modulatoren: Ferritin (500 ng/mL), Fibrinogen (2,8 mg/mL), CRP (50 mg/L). Konzentrationen der Aktivierungssubstanzen: TNFα (10 ng/mL), fMLP (100 nM), PMA (100 nM), Ionomycin (0,5 µM); die Pfeile markieren eine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle, n.s. steht für nicht signifikant. N liegt pro Kästchen zwischen 2 und 10.

Es lässt sich feststellen, dass Ferritin nach Aktivierung mit PMA oder Ionomycin den oxidativen Burst der PMNs signifikant steigert. Ohne Aktivierungssubstanz hat Fibrinogen einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl aller drei exprimierten Oberflächenproteine. Dabei wird vermehrt CD11b und CD66b sowie vermindert CD62L exprimiert.

Eine signifikante Steigerung der Expression von CD66b zeigt sich ebenfalls nach Präinkubation mit Fibrinogen und anschließender Aktivierung durch TNF α /fMLP.

3.4.2 Ergebnisse zum Einfluss von CRP auf die Antigenexpression und den oxidativen Burst der PMNs

Es wurden drei Messungen mittels Durchflusszytometrie nach Präinkubation der PMNs mit CRP (50 mg/L) durchgeführt.

3.4.2.1 Oxidativer Burst

Wird das Ausmaß des oxidativen Bursts nach Präinkubation der PMNs mit 50 mg/L CRP bestimmt, ergibt sich folgende Abbildung 27.

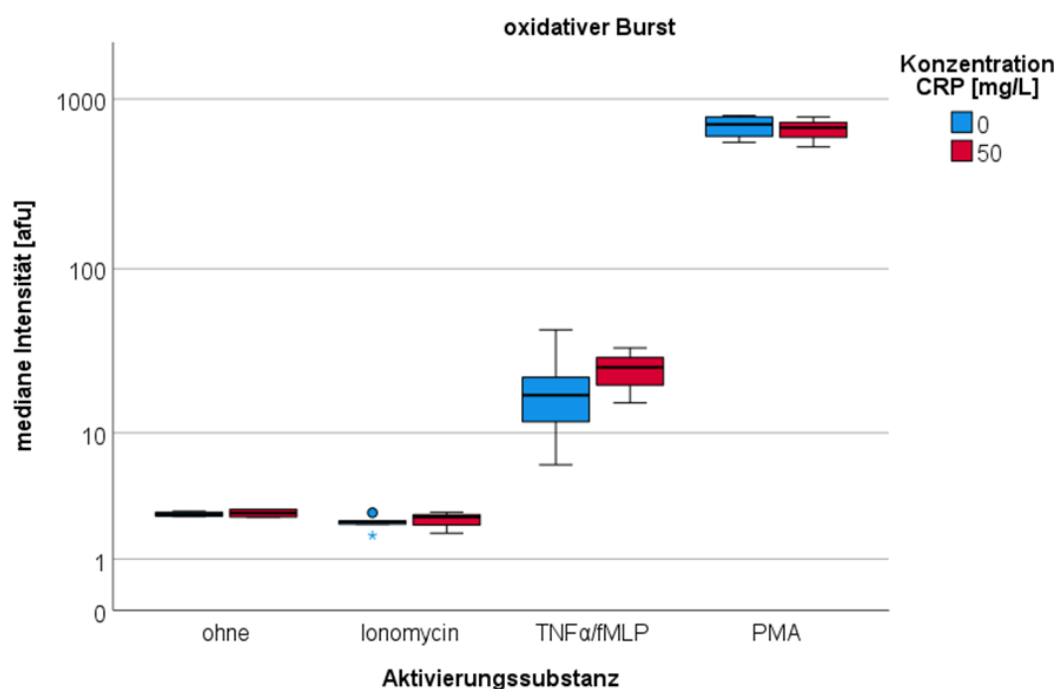


Abbildung 27: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit 50 mg/L CRP und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNF α /fMLP oder PMA. N liegt pro Boxplot zwischen 2 und 5.

Aus der Abbildung geht hervor, dass es jeweils keine Veränderung des oxidativen Bursts durch Präinkubation der PMNs mit CRP gibt.

3.4.2.2 Antigenexpression

Die Antigenexpression von CD11b nach Präinkubation der PMNs mit 50 mg/L CRP wird in Abbildung 28 dargestellt.

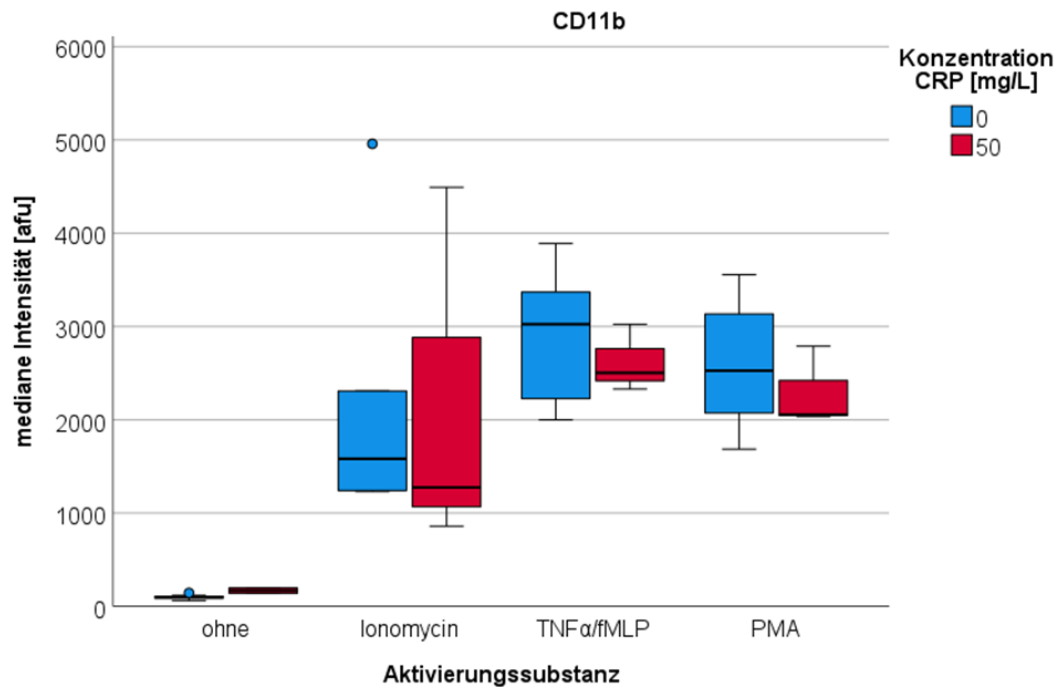


Abbildung 28: Mediane Intensität von CD11b der PMNs nach Präinkubation mit 50 mg/L CRP und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNFα/fMLP oder PMA. N liegt pro Boxplot zwischen 2 und 10.

Werden die Veränderungen innerhalb einer Gruppe der gleichen Aktivierungssubstanz betrachtet, sind diese nicht signifikant. Es lässt sich keine vermehrte Expression von CD11b feststellen.

Als nächstes wird die Expression von CD62L veranschaulicht (Abbildung 29).

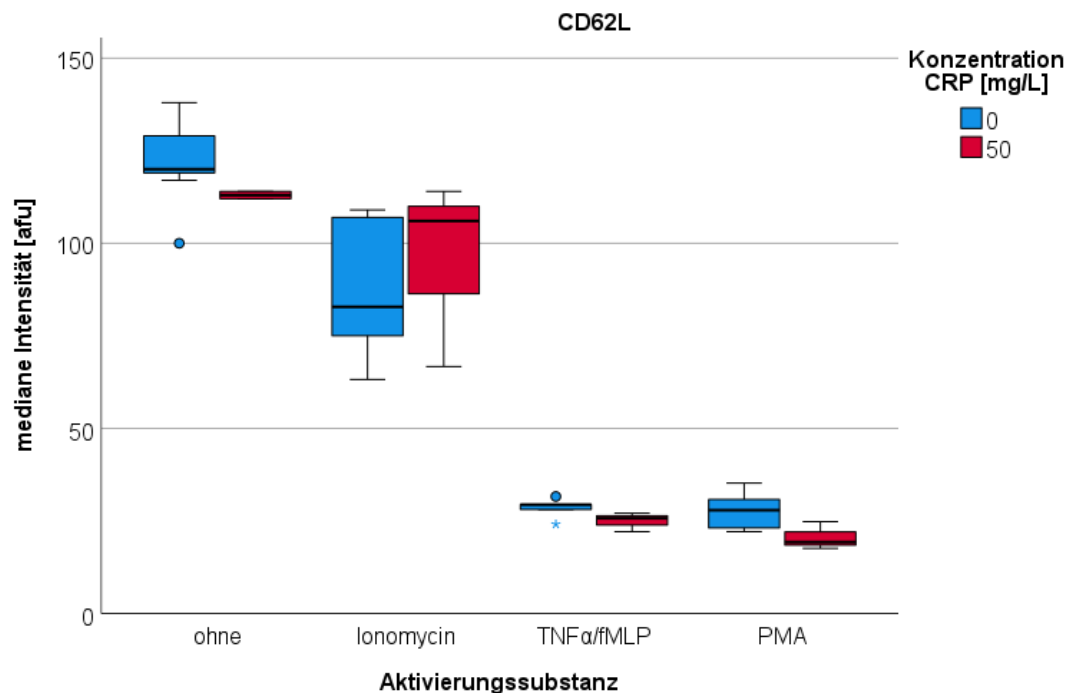


Abbildung 29: Mediane Intensität von CD62L der PMNs nach Präinkubation mit 50 mg/L CRP und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNFα/fMLP oder PMA. N liegt pro Boxplot zwischen 2 und 10.

Auch hier gibt es innerhalb einer Gruppe der gleichen Aktivierungssubstanz keine signifikante Veränderung der Expression von CD62L nach Präinkubation der PMNs mit CRP.

In Abbildung 30 wird die Veränderung der Expression von CD66b dargestellt.

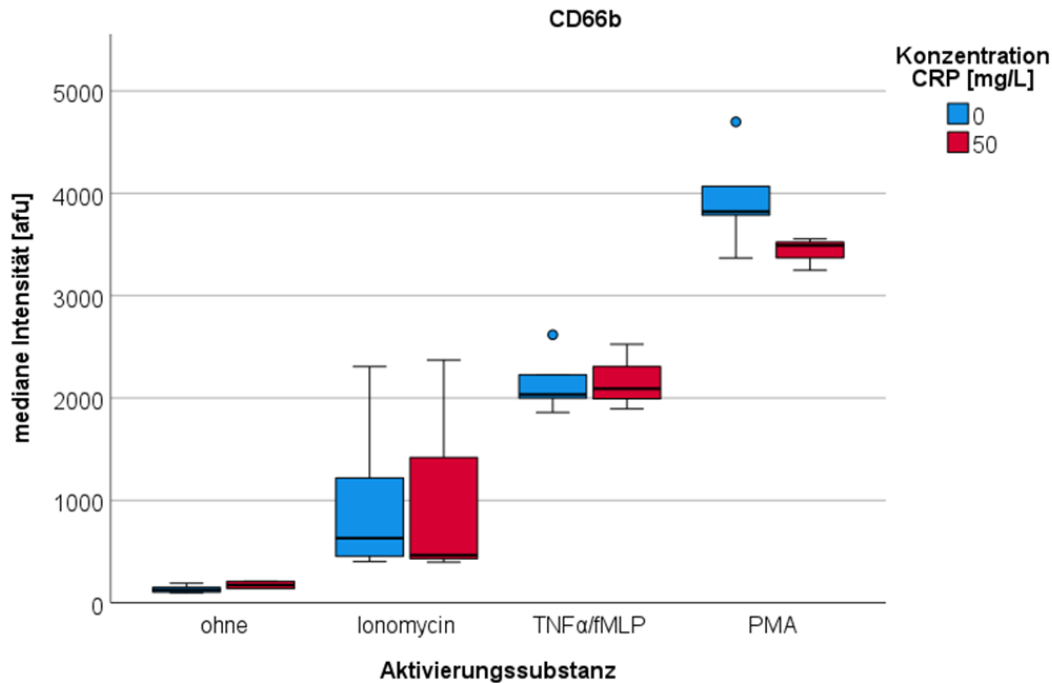


Abbildung 30: Mediane Intensität von CD66b der PMNs nach Präinkubation mit 50 mg/L CRP und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNFα/fMLP oder PMA. N liegt pro Boxplot zwischen 2 und 10.

Werden die Werte innerhalb einer Gruppe der gleichen Aktivierungssubstanz verglichen, lassen sich keine signifikanten Veränderungen der Expression von CD66b nach Präinkubation der PMNs mit CRP messen.

3.4.3 Ergebnisse zum Einfluss von Ferritin auf die Antigenexpression und den oxidativen Burst der PMNs

Es wurde eine Konzentrationsreihe mit Ferritin durchgeführt. Dabei wurde mit Substanzen von zwei verschiedenen Anbietern gearbeitet. Ferritin (1) ist von „Sigma-Aldrich“ (dieses Ferritin wurde auch in den Versuchen der Überblickstabelle (siehe Tabelle 3) benutzt) und Ferritin (2) von „Merck“. Aktiviert wurde mit TNFα/fMLP, Ionomycin und PMA, oder es wurde keine Aktivierungssubstanz benutzt.

3.4.3.1 Oxidativer Burst

Abhängig vom Ferritin gab es unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Ausmaßes des oxidativen Bursts durch die PMNs. Deswegen wird im Folgenden separat auf die Ergebnisse der beiden Substanzen eingegangen. Zuerst wurde mit Ferritin (1) gear-

beitet. Mit diesem wurde in den Konzentrationen 50, 150, 500 und 1000 ng/mL experimentiert. Abbildung 31 zeigt die mediane Intensität des oxidativen Bursts nach Präinkubation der PMNs mit Ferritin und anschließender Aktivierung mit Ionomycin bzw. ohne anschließende Aktivierung.

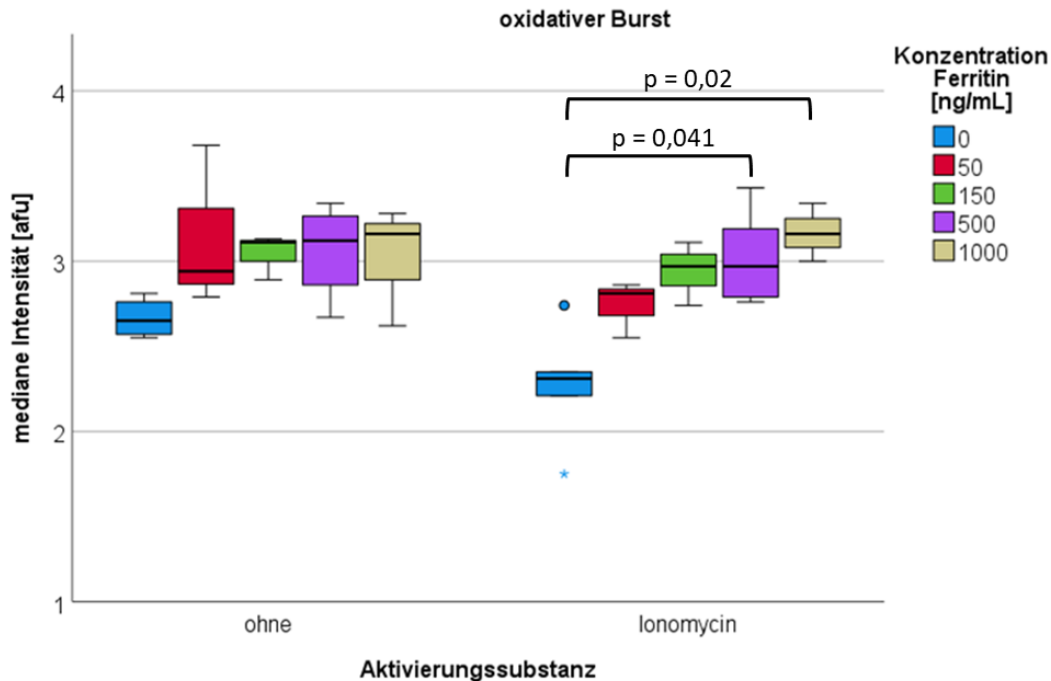


Abbildung 31: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit Ionomycin bzw. ohne anschließende Aktivierung. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 6.

Die mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs ohne Aktivierung liegt zwischen 2,65 afu (0 ng/mL Ferritin) und 3,16 afu (1000 ng/mL Ferritin). Innerhalb dieser Gruppe gibt es keine signifikanten Unterschiede. In der Ionomycin-Gruppe beträgt die mediane Intensität zwischen 2,32 afu (0 ng/mL Ferritin) und 3,16 afu (1000 ng/mL Ferritin). Die Veränderungen zwischen der 0 ng/mL-Gruppe und der 500 ng/mL Gruppe (2,97 afu) bzw. der 1000 ng/mL-Gruppe sind statistisch signifikant.

Abbildung 32 zeigt die mediane Intensität des oxidativen Bursts nach Aktivierung der PMNs mit TNF α /fMLP.

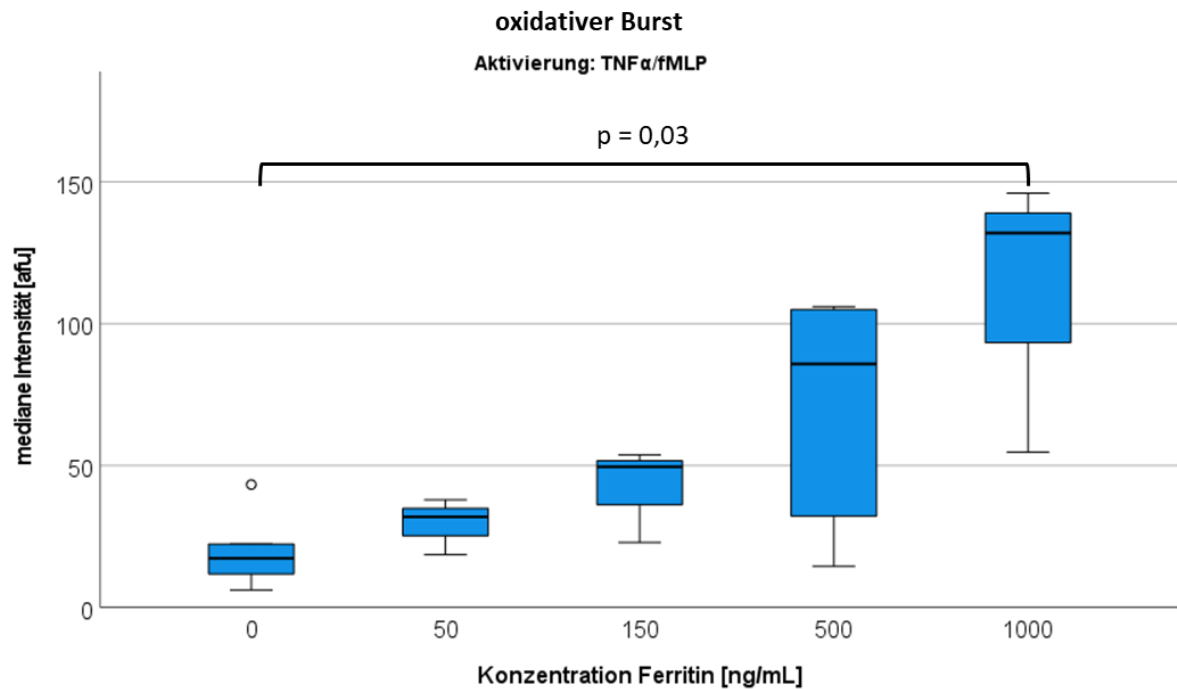


Abbildung 32: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit TNF α /fMLP. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 5.

Es wird ein konzentrationsabhängiger Anstieg des oxidativen Bursts gemessen. Die mediane Intensität der Kontrolle (17 afu) zeigt einen signifikanten Unterschied zu der der höchsten Ferritin-Konzentration (132 afu).

In Abbildung 33 wird die mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Aktivierung mit PMA dargestellt.

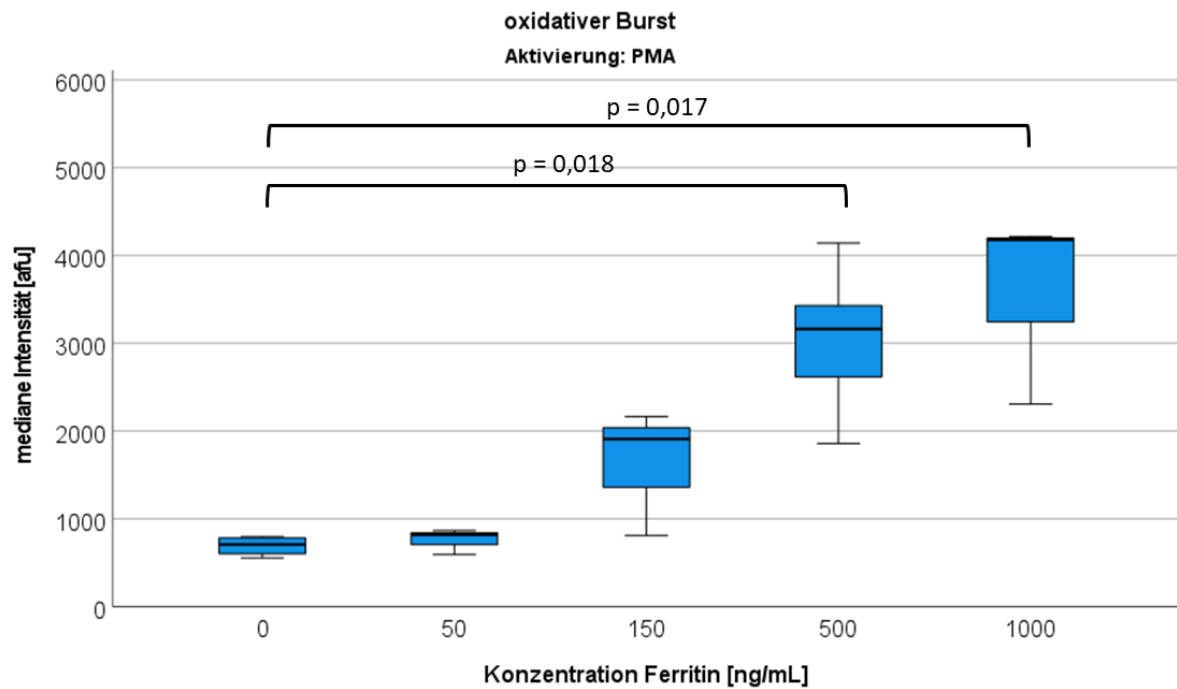


Abbildung 33: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit PMA. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 6.

Man erkennt einen konzentrationsabhängigen Anstieg des oxidativen Bursts. Die Veränderung der medianen Intensität des Kontrollwerts (710 afu) zu den Gruppen mit 500 ng/mL (3165 afu) und 1000 ng/mL Ferritin (4179 afu) ist statistisch signifikant. Anbei werden in Abbildung 34 beispielhaft die zugehörigen Streudiagramme eines Versuchs abgebildet.

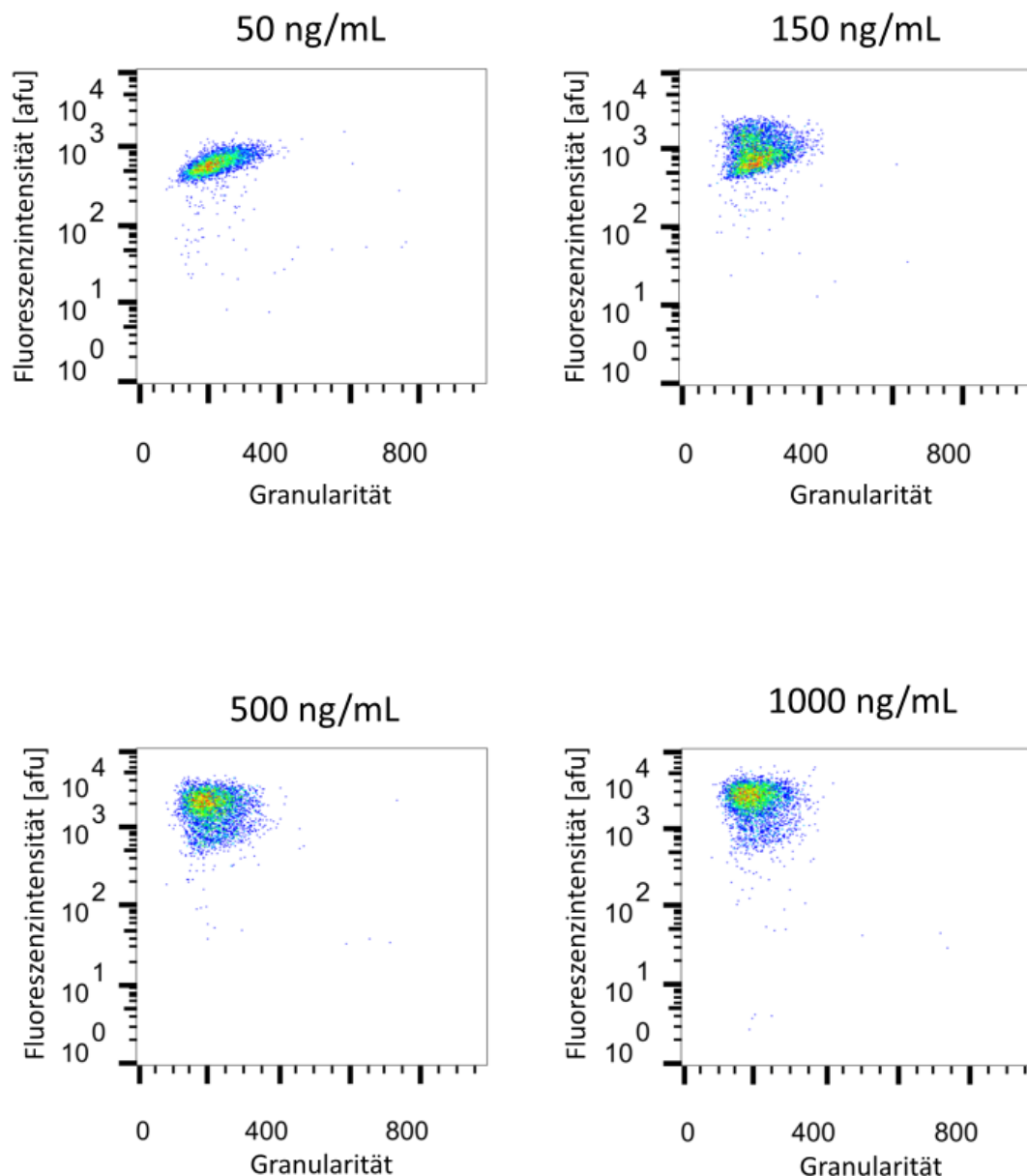


Abbildung 34: Konzentrationsabhängige Veränderungen des oxidativen Bursts der Granulozyten bei Präinkubation mit Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit PMA. Die genauen Mediane der Fluoreszenzintensität von niedriger nach hoher Konzentration von Ferritin sind 594, 813, 1860, 2308 afu.

Mit Ferritin (2) wurden drei Versuche mit den Konzentrationen 500, 1000, 5000 und 10000 ng/mL durchgeführt. In folgenden Abbildungen (Abbildung 35, Abbildung 36) ist die mediane Intensität des oxidativen Bursts nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin ohne anschließende Aktivierung sowie mit anschließender Aktivierung durch TNF α /fMLP dargestellt.

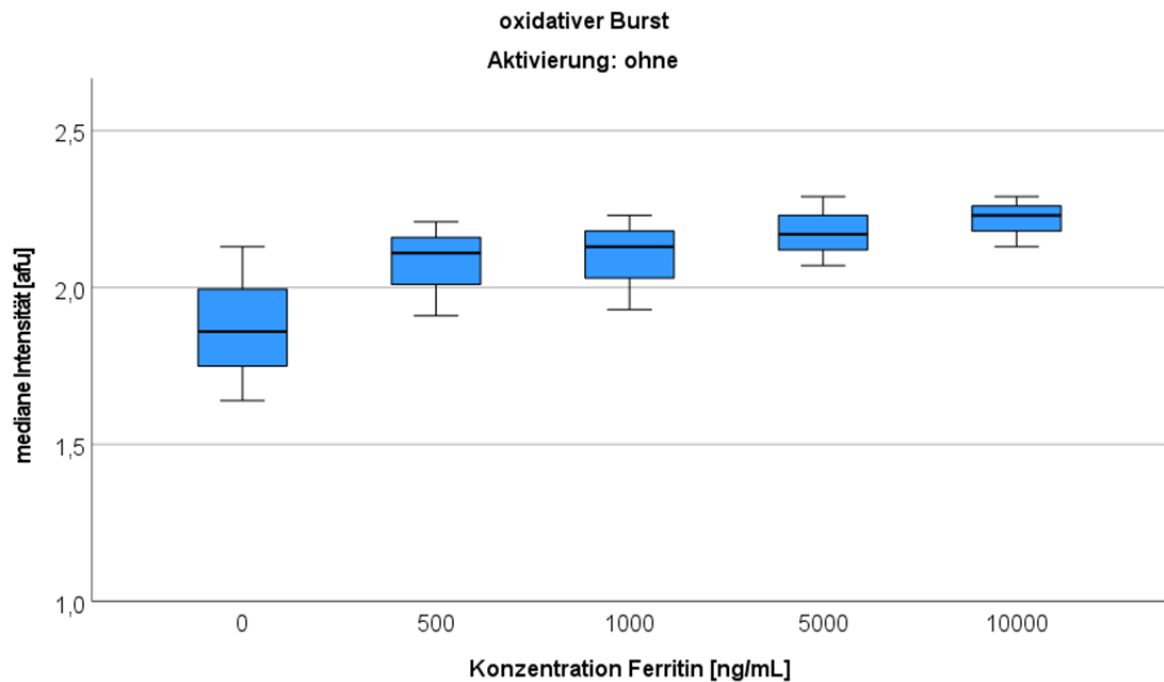


Abbildung 35: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (2) ohne anschließende Aktivierung. N liegt pro Boxplot bei 3.

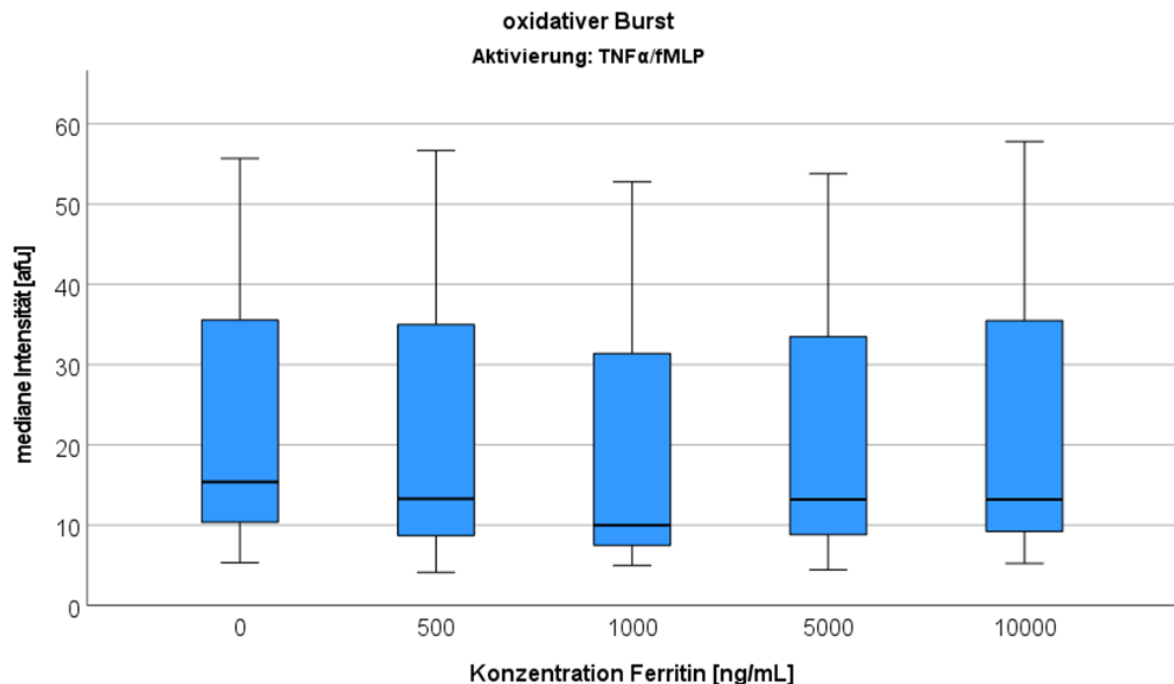


Abbildung 36: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (2) und anschließender Aktivierung mit TNF α /fMLP. N liegt pro Boxplot bei 3.

Die mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs ohne Aktivierungssubstanz liegt zwischen 1,86 afu (0 ng/mL Ferritin) und 2,23 afu (10000 ng/mL Ferritin). Mit TNF α /fMLP liegen die Mediane der einzelnen Gruppen zwischen 10 und 15 afu. Es

gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den medianen Intensitäten der einzelnen Gruppen.

In folgender Abbildung 37 ist die mediane Intensität des oxidativen Bursts nach PMA-Aktivierung graphisch dargestellt.

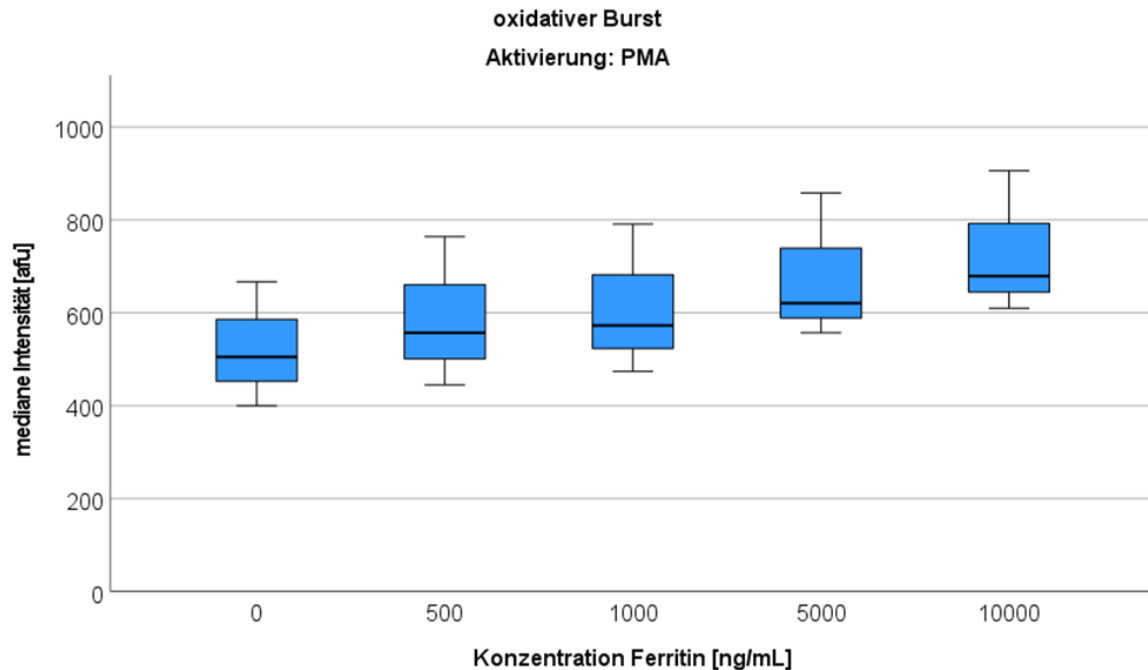


Abbildung 37: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (2) und anschließender Aktivierung mit PMA. N liegt pro Boxplot bei 3.

Von der 0 ng/mL-Gruppe (505 afu) zur 10000 ng/mL-Gruppe (679 afu) gibt es einen konzentrationsabhängigen Anstieg der medianen Intensität des oxidativen Bursts. Dieser ist statistisch nicht signifikant. Trägt man die Werte einzeln nach Versuchen aufgeteilt auf ergibt sich Abbildung 38.

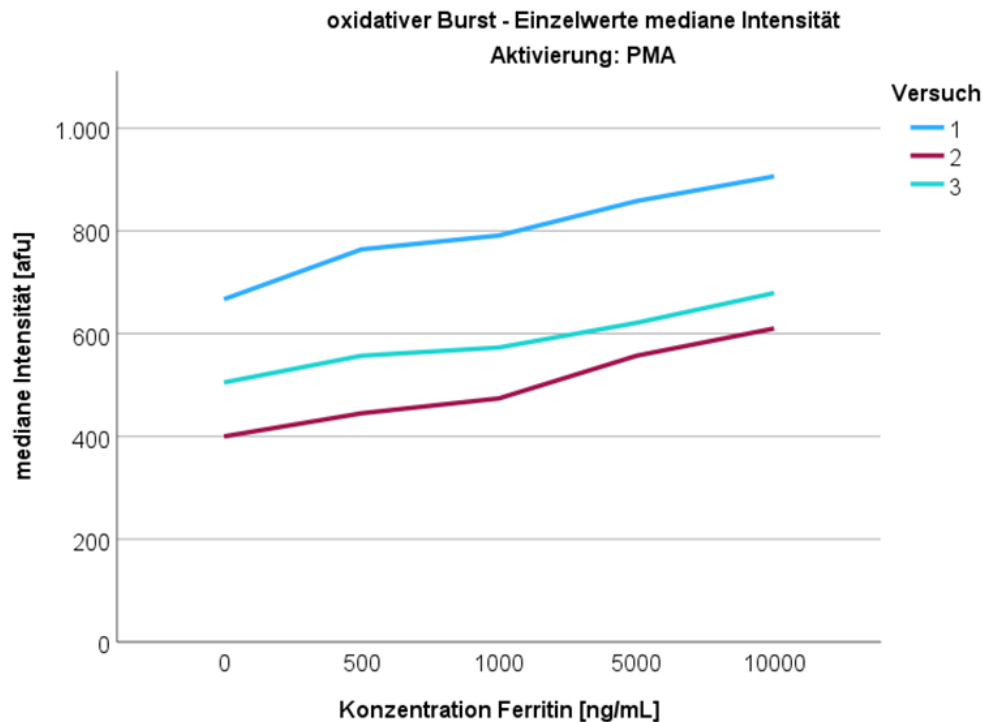


Abbildung 38: Einzelwerte der medianen Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (2) und anschließender Aktivierung mit PMA. Die Werte sind nach Versuchen aufgeteilt.

In Abbildung 38 sieht man einen konzentrationsabhängigen Anstieg der medianen Intensität des oxidativen Bursts in jedem Versuch. Um die absolute Änderung berechnen und vergleichen zu können, wird pro Graph die Fluoreszenz der Kontrolle abgezogen. Werden nun die absoluten Änderungen in einer Grafik veranschaulicht, ergibt sich Abbildung 39.

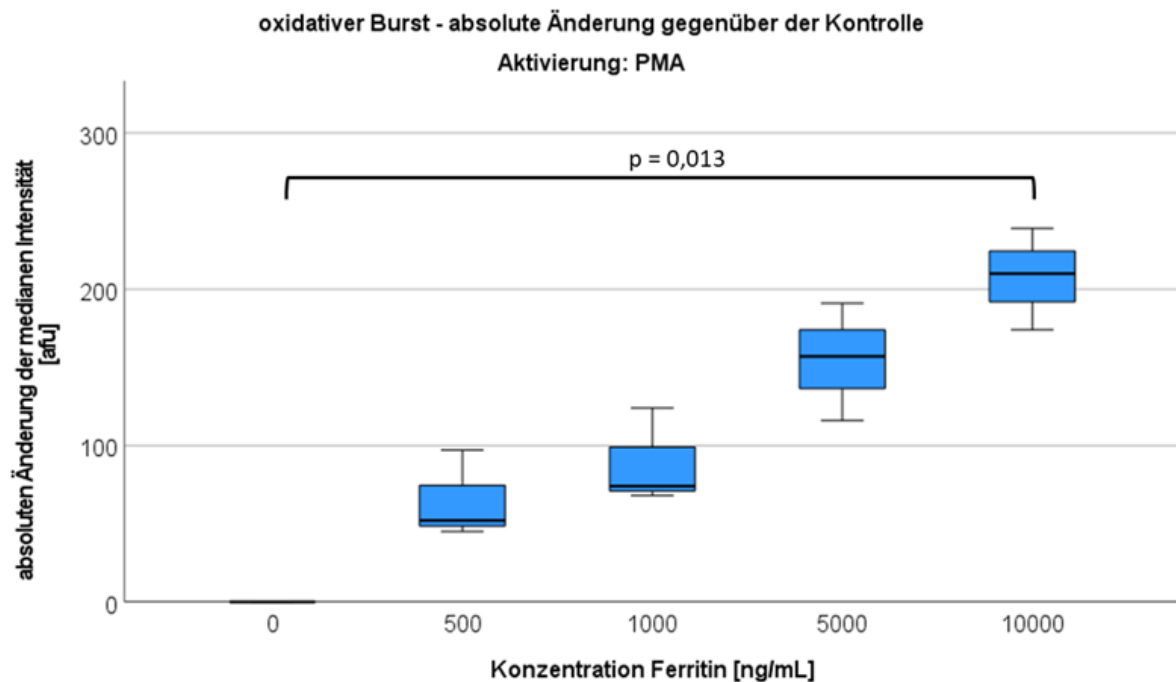


Abbildung 39: Absolute Änderung der medianen Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (2) und anschließender Aktivierung mit PMA. N liegt pro Boxplot bei 3.

Im Vergleich der Kontrolle zur 10000 ng/mL-Gruppe besteht eine absolute Änderung der medianen Intensität von 210 afu. Diese Veränderung ist statistisch signifikant.

3.4.3.2 Antigenexpression

Im Überblick (Tabelle 3) wurde lediglich ein marginaler Effekt durch Ferritin (1) auf die Expression der Oberflächenantigene festgestellt. Im Folgenden wird nochmal genauer auf die einzelnen Antigene eingegangen. Die PMNs wurden mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) (unter 3.4.3.1 beschrieben) präinkubiert und anschließend wieder mit Ionomycin, TNF α /fMLP oder PMA oder ohne Aktivierungssubstanz inkubiert.

Folgende Abbildung 40 und Abbildung 41 zeigen die mediane Intensität der Expression des Oberflächenproteins CD11b nach Präinkubation mit Ferritin ohne anschließende Aktivierung bzw. mit anschließender Aktivierung durch Ionomycin, TNF α /fMLP oder PMA.

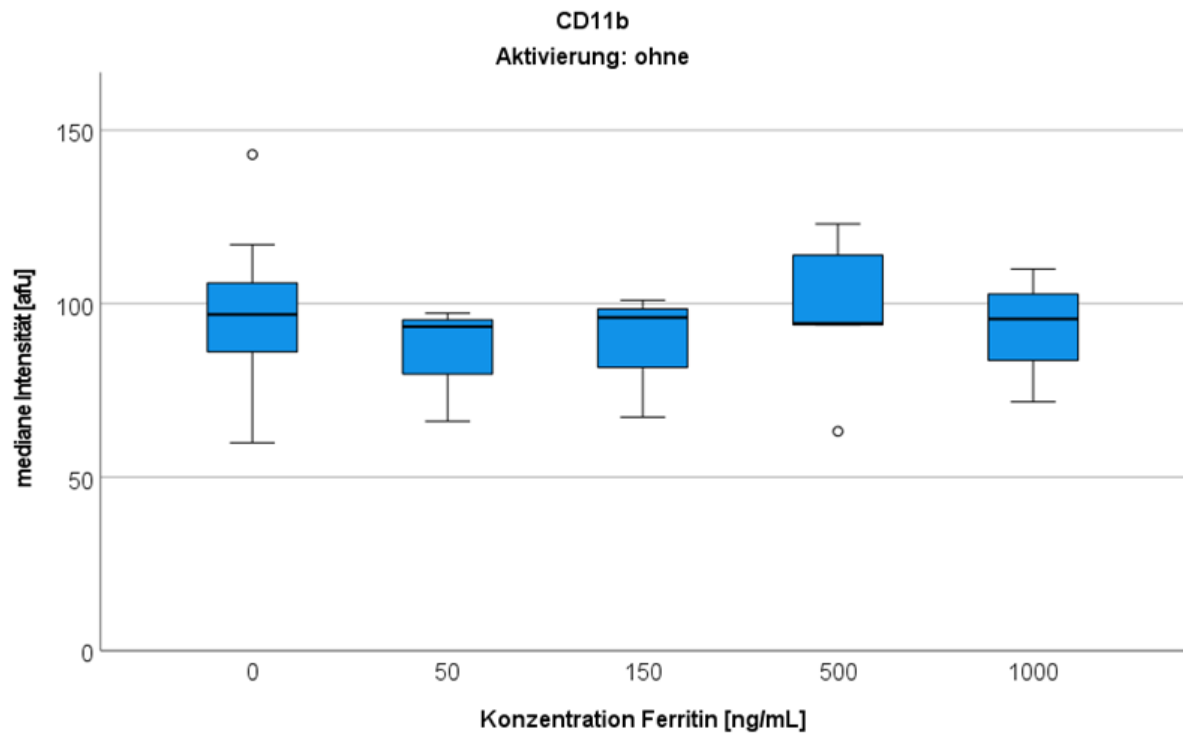


Abbildung 40: Mediane Intensität von CD11b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) ohne anschließende Aktivierung. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 10.

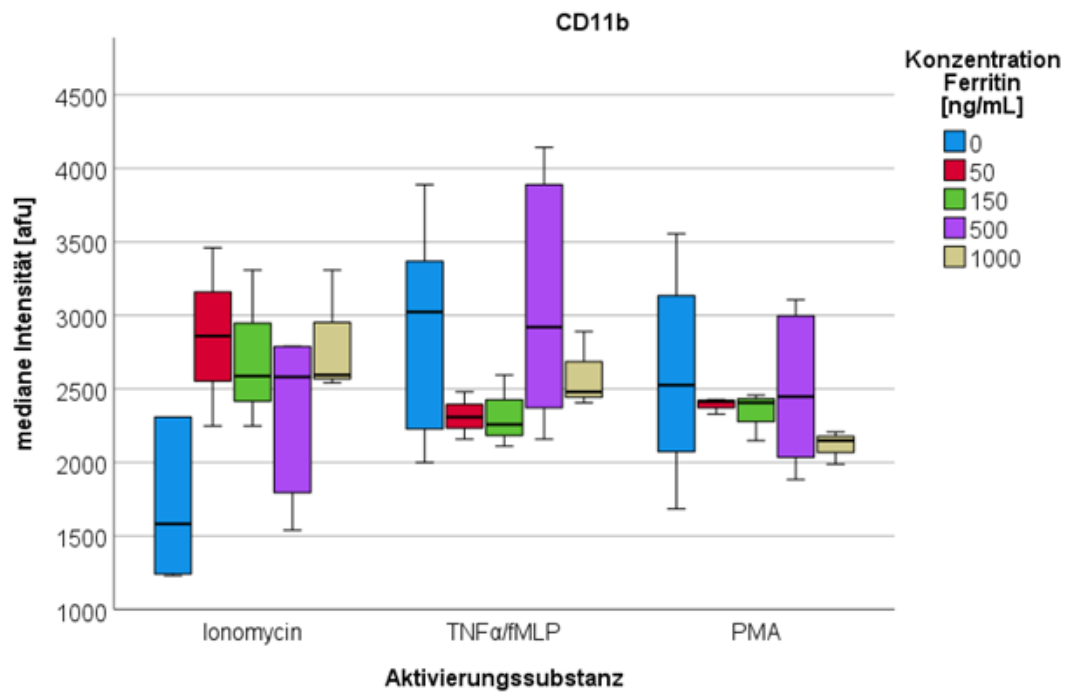


Abbildung 41: Mediane Intensität von CD11b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNFα/fMLP oder PMA. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 6.

Mit den diversen Aktivierungssubstanzen ergeben sich erheblich höhere Werte der medianen Intensität als ohne Anwendung einer Aktivierungssubstanz. Unabhängig von den verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1), mit denen die PMNs präinkubiert worden sind, wurden keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die mediane Intensität von CD11b festgestellt. Verglichen wurde innerhalb jeder Gruppe der Aktivierungssubstanzen.

Als nächstes wird auf die Expression von CD62L eingegangen (Abbildung 42, Abbildung 43).

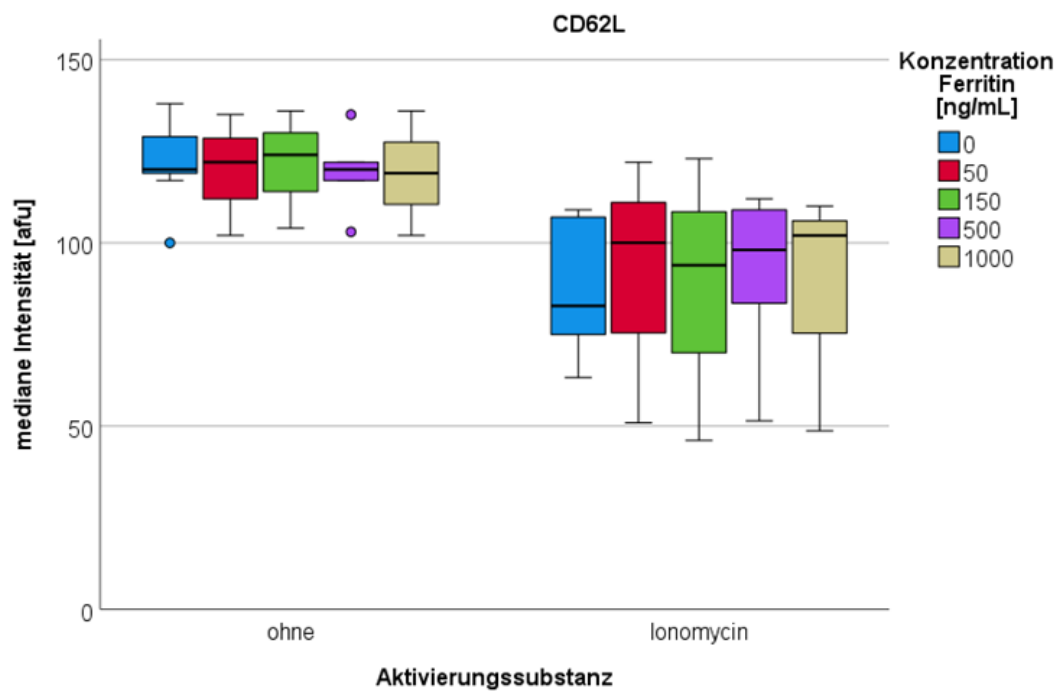


Abbildung 42: Mediane Intensität von CD62L nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) ohne anschließende Aktivierung bzw. mit anschließender Aktivierung mit Ionomycin. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 10.

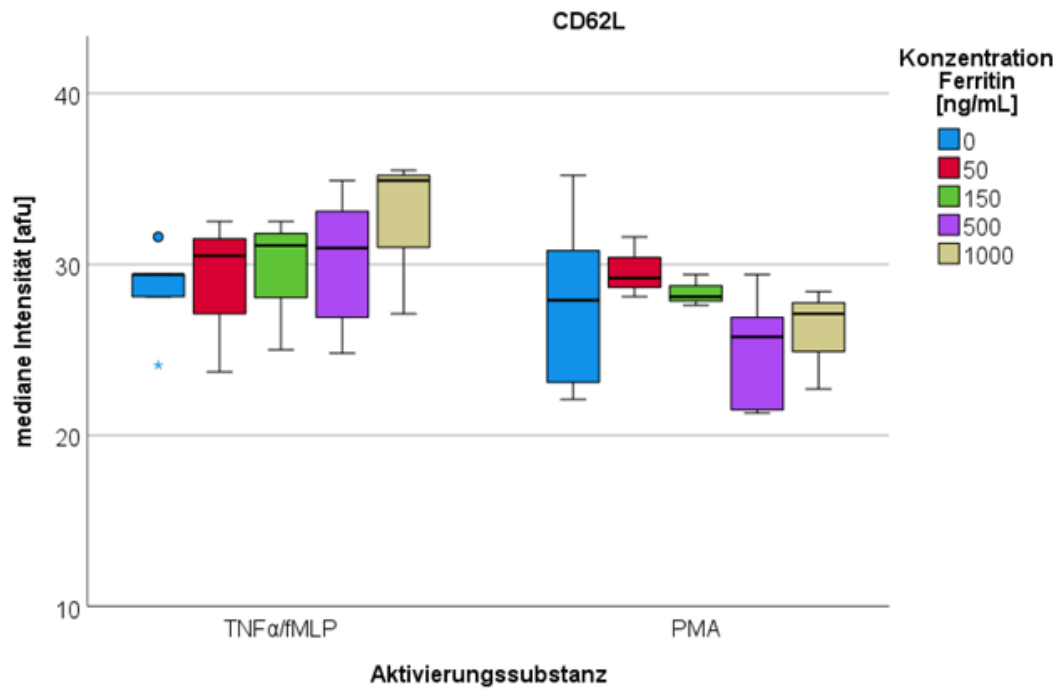


Abbildung 43: Mediane Intensität von CD62L nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit TNFα/fMLP oder PMA. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 6.

Werden die Werte innerhalb einer Gruppe der gleichen Aktivierungssubstanz verglichen, lassen sich keine signifikanten Veränderungen der Expression von CD62L nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) messen.

Als letztes Antigen steht CD66b im Fokus. Die Veränderungen der medianen Intensität werden in Abbildung 44 und Abbildung 45 gezeigt.

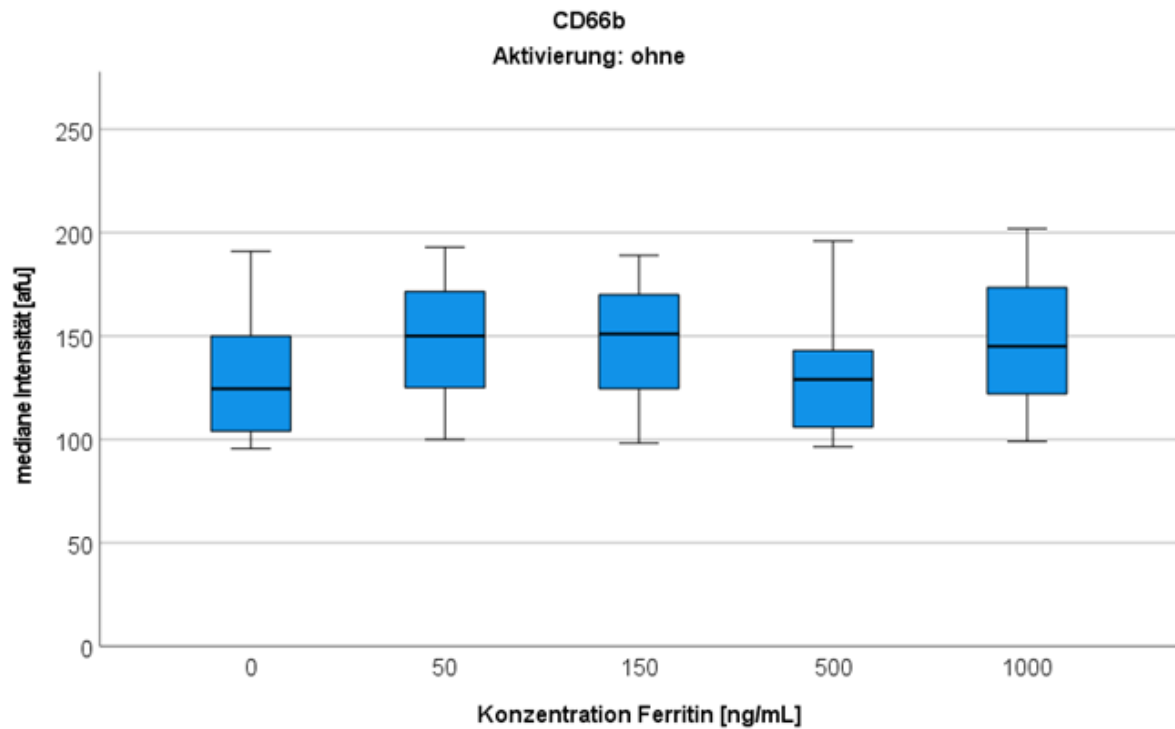


Abbildung 44: Mediane Intensität von CD66b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) ohne anschließende Aktivierung. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 10.

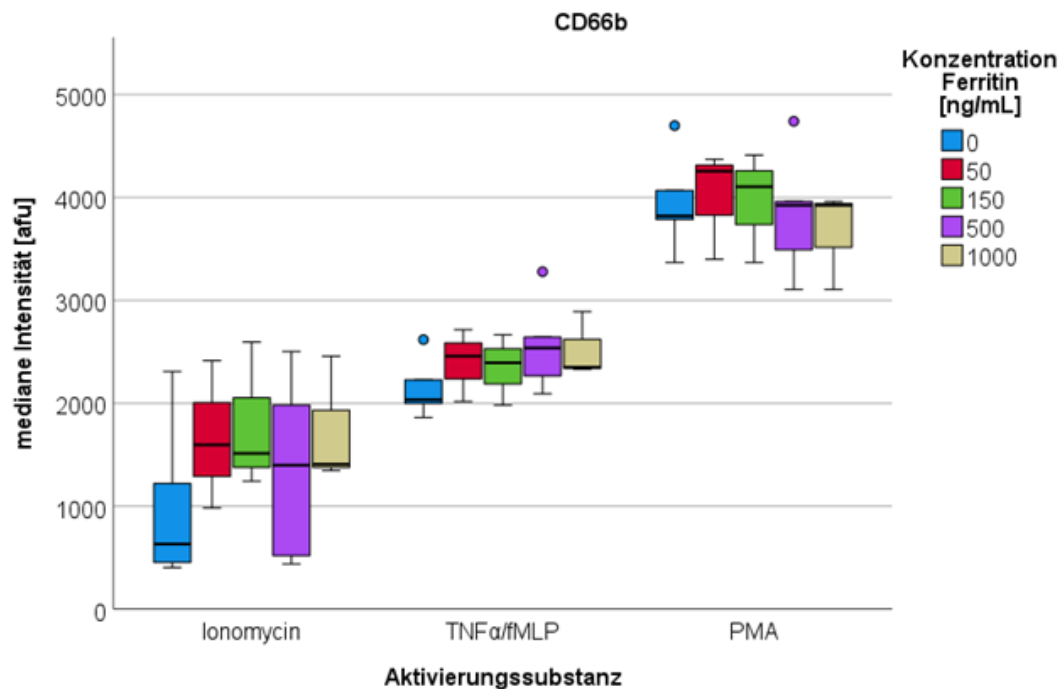


Abbildung 45: Mediane Intensität von CD66b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNFα/fMLP oder PMA. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 6.

Es zeigt sich, dass die mediane Intensität von CD66b innerhalb der Gruppe einer Aktivierungssubstanz unverändert bleibt, unabhängig von der Konzentration an Ferritin (1), mit der die PMNs präinkubiert worden sind.

3.4.4 Ergebnisse zum Einfluss von Fibrinogen auf die Antigenexpression und den oxidativen Burst der PMNs

Mit Fibrinogen wurden Durchflusszytometer-Versuche in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt und der oxidative Burst sowie die Expression von CD11b, CD62L und CD66b erfasst. Die Konzentrationen sind 0 (Kontrolle); 0,5; 1,4; 2,8 und 5 mg/mL Fibrinogen. Die PMNs wurden ebenfalls mit den verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen präinkubiert und anschließend mit Ionomycin, TNF α /fMLP oder PMA entweder aktiviert oder nicht aktiviert.

3.4.4.1 Oxidativer Burst

Die Ergebnisse zum Ausmaß des oxidativen Bursts nach Präinkubation der PMNs mit Fibrinogen werden im nachfolgenden Abschnitt vorgestellt. Abbildung 46 und Abbildung 47 stellen das Ausmaß des oxidativen Bursts ohne Aktivierung der PMNs und mit Aktivierung der PMNs durch Ionomycin und PMA dar.

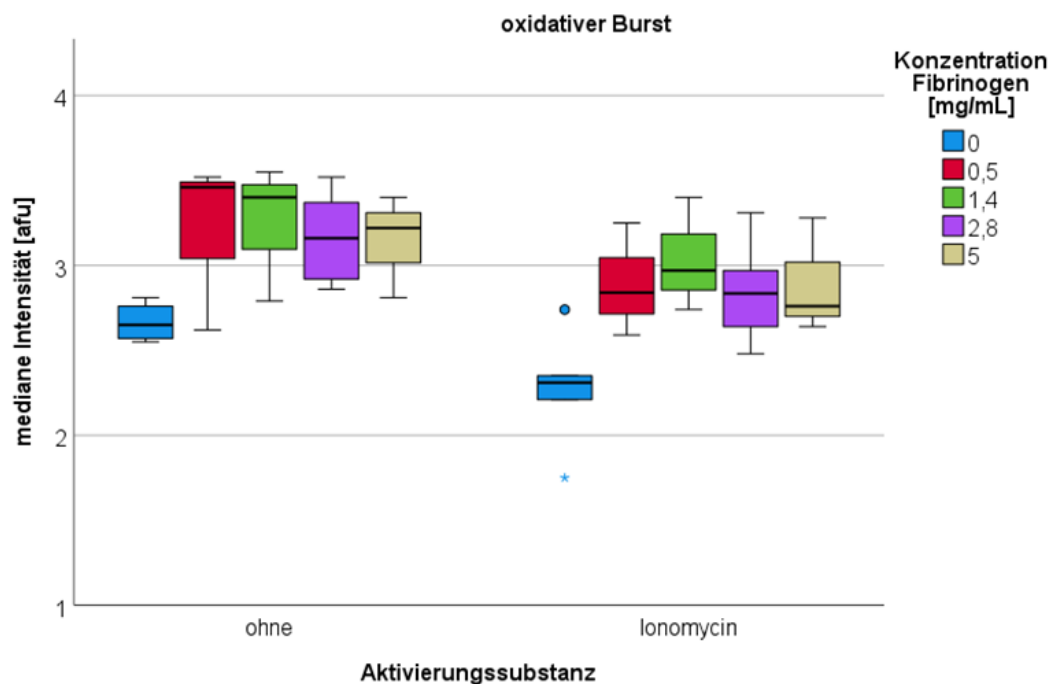


Abbildung 46: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen und anschließender Aktivierung mit Ionomycin bzw. ohne anschließende Aktivierung. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 6.

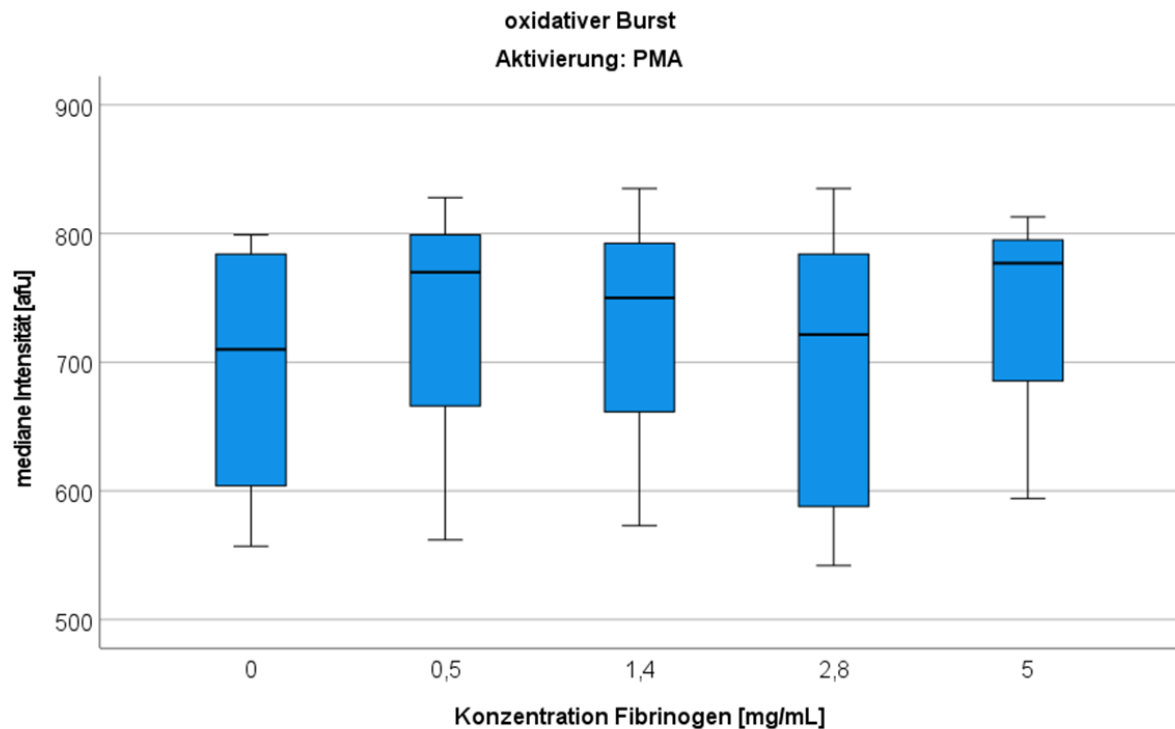


Abbildung 47: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen und anschließender Aktivierung mit PMA. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 6.

Es wird deutlich, dass es mit den Aktivierungssubstanzen Ionomycin und PMA sowie ohne Aktivierungssubstanz unabhängig von der Konzentration von Fibrinogen keine Veränderungen der medianen Intensität des oxidativen Bursts gibt. Wird nach Präinkubation der PMNs mit Fibrinogen anschließend mit $\text{TNF}\alpha$ /fMLP aktiviert und der oxidative Burst detektiert, lassen sich die Ergebnisse in folgende Abbildung 48 darstellen.

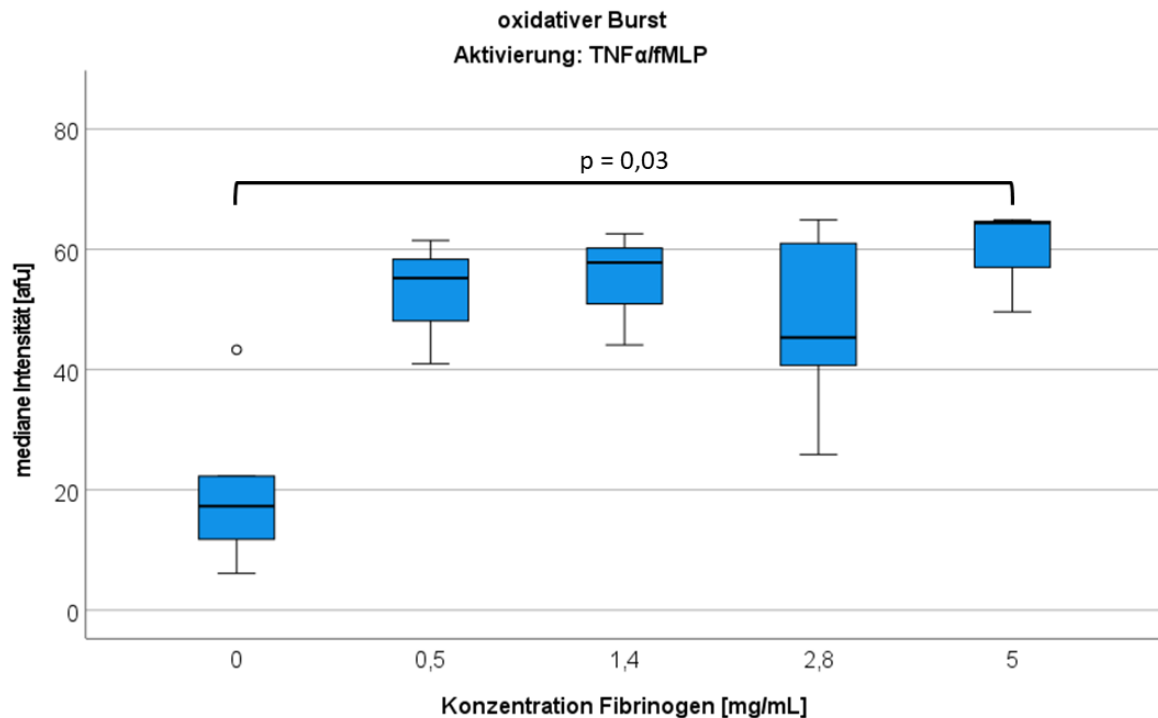


Abbildung 48: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen und anschließender Aktivierung mit TNF α /fMLP. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 6.

Hierbei ist die mediane Intensität des oxidativen Bursts mit jeder Konzentration Fibrinogen höher als der Wert der Kontrolle (17 afu). Die Veränderung der Kontrolle zur 5 mg/mL-Gruppe (64 afu) ist statistisch signifikant.

3.4.4.2 Antigenexpression

Als nächstes wird auf die Veränderungen der Antigenexpression nach Präinkubation der PMNs mit Fibrinogen eingegangen. Begonnen wird mit dem Protein CD11b. Betrachtet man die mediane Intensität von CD11b der PMNs ohne Aktivierung, ergibt sich folgende Abbildung 49.

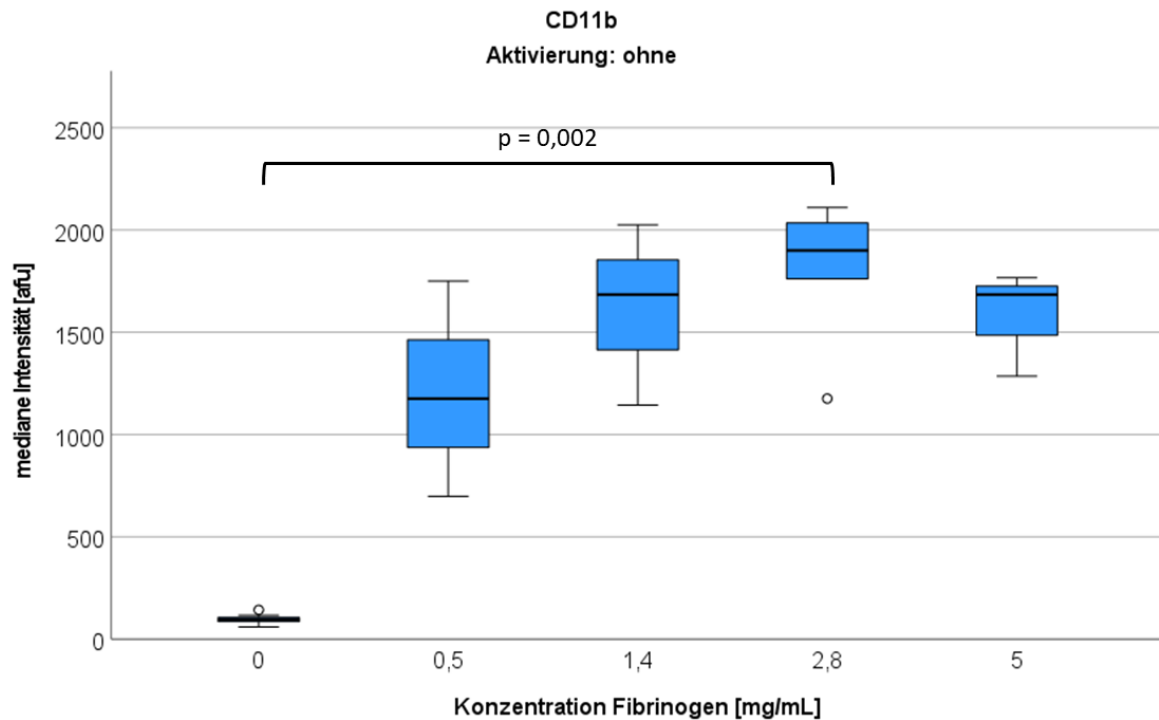


Abbildung 49: Mediane Intensität von CD11b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen ohne anschließende Aktivierung. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 10.

Im Vergleich zum Kontrollwert (97 afu) erhöhen sich die medianen Intensitäten von CD11b nach Präinkubation mit Fibrinogen. Die Veränderung zur 0,5 mg/mL Fibrinogen-Gruppe (1900 afu) ist dabei statistisch signifikant.

In Abbildung 50 wird die mediane Intensität von CD11b nach Aktivierung mit Ionomycin, TNF α /fMLP und PMA graphisch dargestellt.

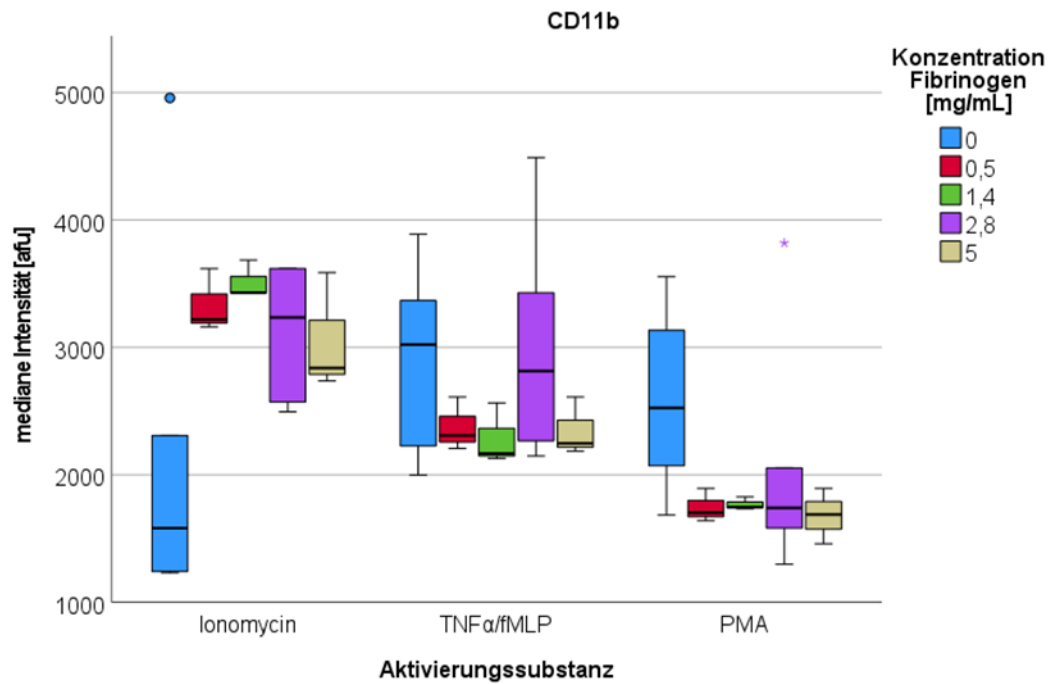


Abbildung 50: Mediane Intensität von CD11b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNFα/fMLP oder PMA. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 6.

Im paarweisen Vergleich der Werte der Fibrinogen-Gruppen und der Kontrolle gibt es, nach Aktivierung mit TNFα/fMLP, PMA oder Ionomycin, keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Als nächstes wird die Expression von CD62L nach Präinkubation der PMNs mit Fibrinogen ohne anschließende Aktivierung betrachtet. Die Ergebnisse hierzu finden sich in Abbildung 51.

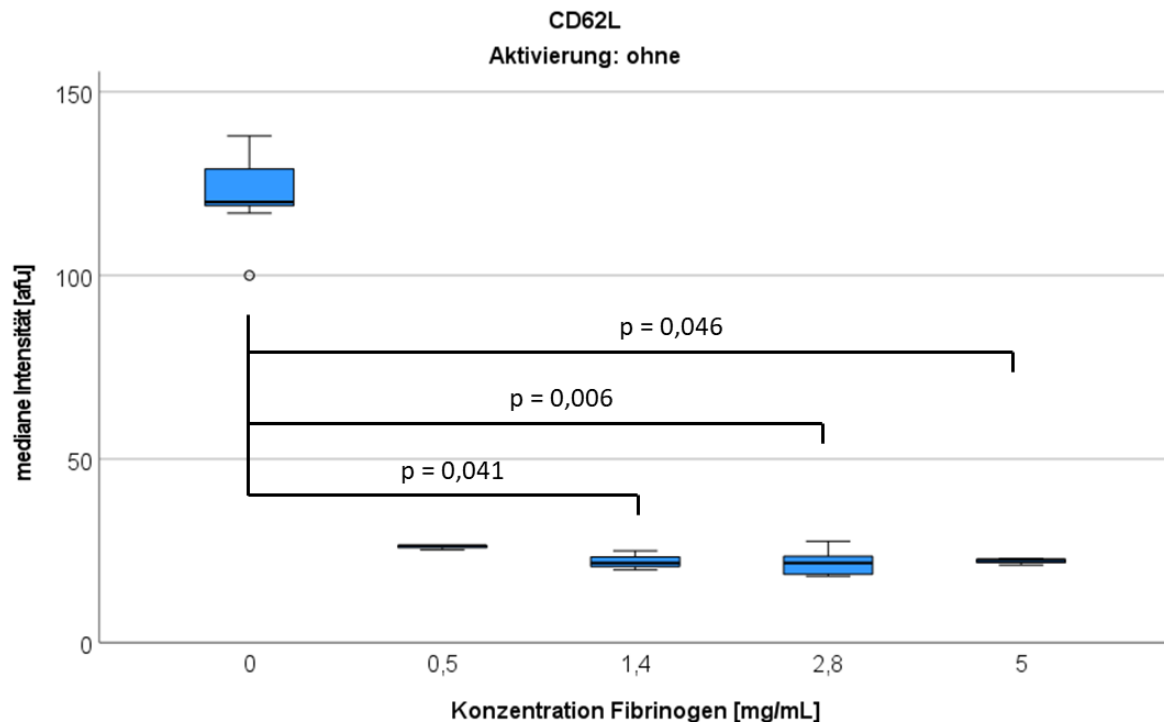


Abbildung 51: Mediane Intensität von CD62L nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen ohne anschließende Aktivierung. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 10.

Wird die mediane Intensität von CD62L jeweils von der Kontrolle (120 afu) zu den Werten der einzelnen Fibrinogen-Gruppen verglichen, zeigt sich zu diversen Fibrinogen-Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied. Der Median der 1,4 mg/mL- und 2,8 mg/mL Fibrinogen-Gruppe beträgt 22 afu, derjenige der 5 mg/mL Fibrinogen-Gruppe 23 afu.

Wird die Expression von CD62L auf der Oberfläche der PMNs betrachtet gibt es nach Aktivierung mit $\text{TNF}\alpha$ /fMLP oder PMA jeweils keine signifikanten Veränderungen der medianen Intensität zwischen der Kontrolle und den Fibrinogen-Gruppen (Abbildung 52).

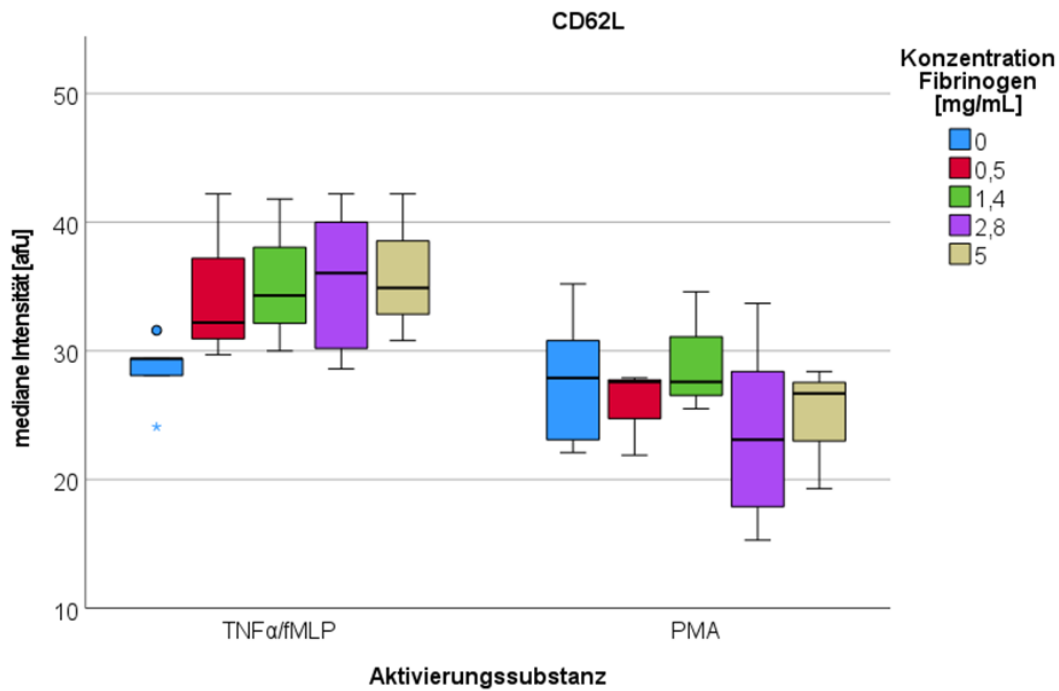


Abbildung 52: Mediane Intensität von CD62L nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen und anschließender Aktivierung mit TNFα/fMLP oder PMA. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 6.

Werden die PMNs nach Fibrinogen-Präinkubation mit Ionomycin aktiviert, resultiert folgende Abbildung 53.

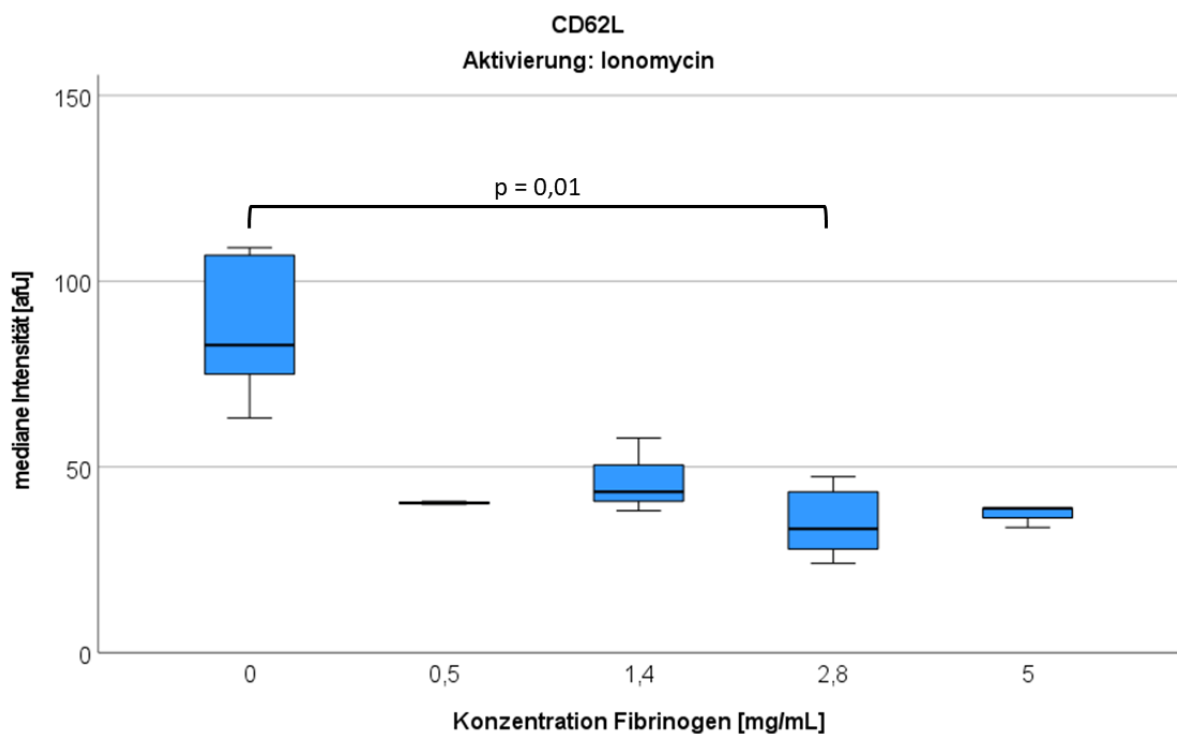


Abbildung 53: Mediane Intensität von CD62L nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen und anschließender Aktivierung mit Ionomycin. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 6.

Mit jeder Konzentration Fibrinogen ist die mediane Intensität von CD62L niedriger als die der Kontrolle (83 afu). Die Veränderung der medianen Intensität im Vergleich der Kontrolle und der 2,8 mg/mL-Gruppe (33 afu) ist statistisch signifikant.

Zuletzt wird die Expression von CD66b nach Präinkubation der PMNs mit Fibrinogen präsentiert. Die Auswertung bringt folgende zwei Abbildungen (Abbildung 54, Abbildung 55) hervor.

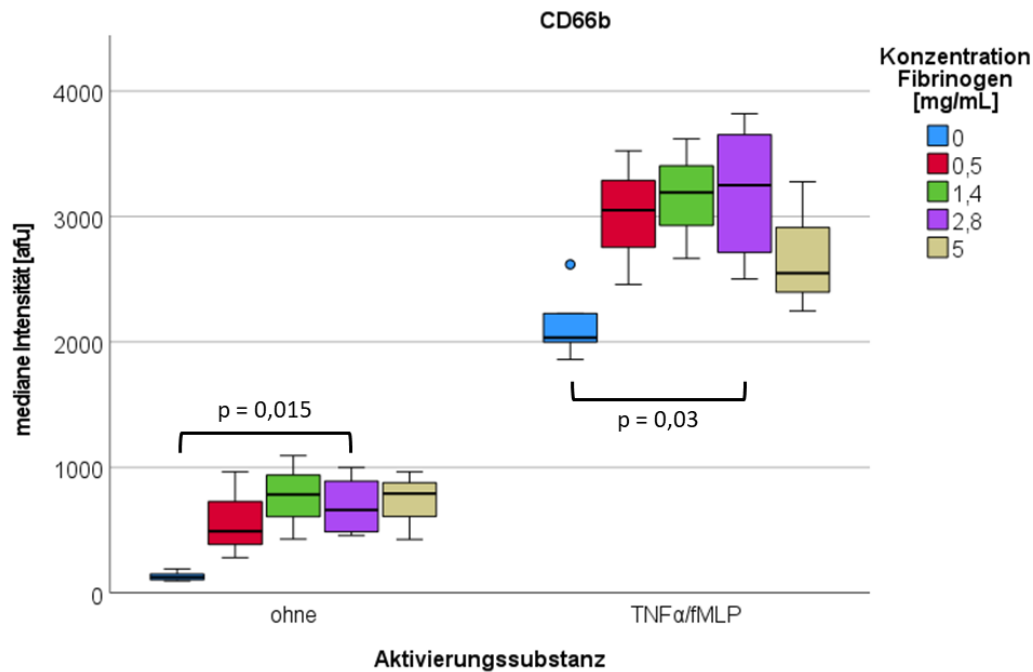


Abbildung 54: Mediane Intensität von CD66b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen ohne anschließende Aktivierung oder mit anschließender Aktivierung durch TNFα/fMLP. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 10.

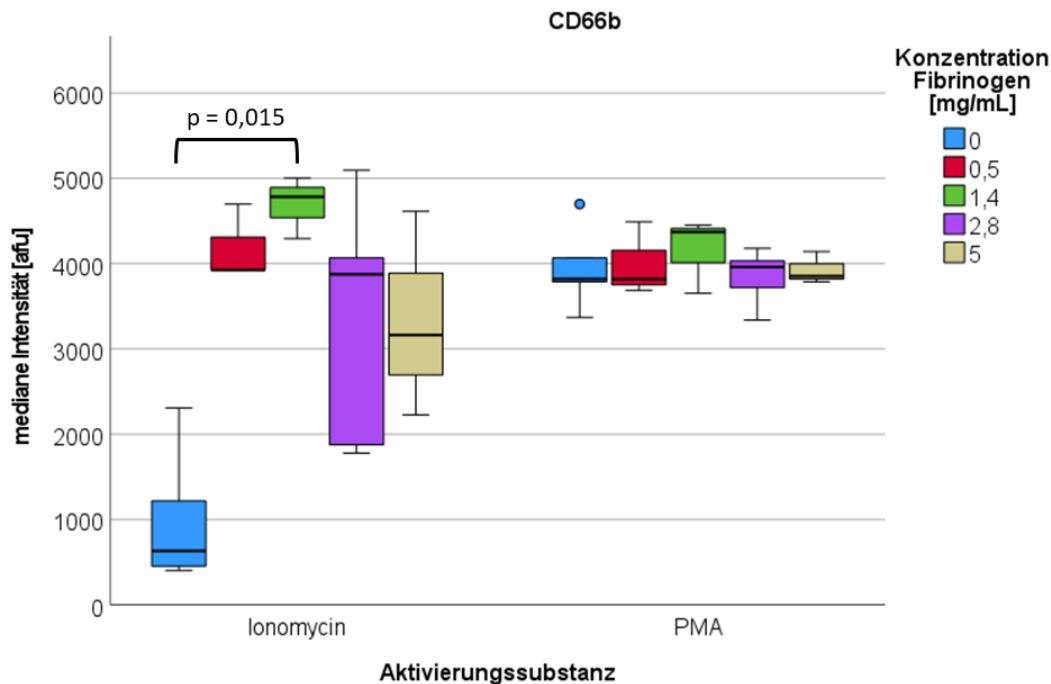


Abbildung 55: Mediane Intensität von CD66b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen mit anschließender Aktivierung durch Ionomycin oder PMA. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 6.

Es zeigt sich, dass die Expression von CD66b ohne Aktivierung der PMNs und mit Aktivierung der PMNs durch TNF α /fMLP oder Ionomycin eine signifikante Veränderung der Kontrolle zu jeweils einer Konzentration Fibrinogen aufweist. Ohne Aktivierungssubstanz ist die mediane Intensität der Kontrolle 125 afu und die der 2,8 mg/mL Fibrinogen-Gruppe 661 afu. Nach Aktivierung der PMNs mit TNF α /fMLP liegt der Median der Kontrolle bei 2035 afu und derjenige der 2,8 mg/mL Fibrinogen-Gruppe bei 3250 afu. Nach Aktivierung mit Ionomycin ist der Median der Kontrolle 632 und derjenige der 1,4 mg/mL Fibrinogen-Gruppe 4783 afu.

3.5 Ergebnisse der „Live-Cell-Imaging“-Versuche

Um die Migration, die ROS-Produktion, die MPO-Freisetzung und das NETose-Verhalten genauer analysieren zu können, wurden „Live-Cell-Imaging“-Versuche durchgeführt. Der Einfluss der APPs CRP und Ferritin auf die Granulozytenfunktionalitäten wurde untersucht. In den Versuchen, die den Einfluss von CRP auf die PMNs untersuchen, wurden Ansätze mit und ohne fMLP in den Reservoirs umgesetzt. In den Ferritin-Versuchen wurde mit Ferritin (1) gearbeitet. Teilweise wurde TNF α in den Kanal zu den PMNs oder in die Reservoirs als zusätzliche Aktivierungssubstanz hinzugefügt.

3.5.1 Ergebnisse zum Einfluss von CRP auf die Migration, ROS-Produktion und -Intensität, die MPO-Freisetzung und das NETose-Verhalten der PMNs

Es wurden acht Versuche mit dem APP CRP durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss von CRP in den Konzentrationen 1 mg/L und 10 mg/L auf die PMNs untersucht. Drei dieser Versuche hatten kein fMLP in einem der Reservoirs. Fünf Versuche wurden mit fMLP in einem der Reservoirs zum Aufbau des chemotaktischen Gradienten durchgeführt.

3.5.1.1 Track Length

Nachstehend wird die Track Length der neutrophilen Granulozyten und der Einfluss verschiedener Konzentrationen CRP ohne Zugabe von fMLP präsentiert (Abbildung 56). Da es ohne fMLP als Chemoattraktant nicht zu dem typischen Bild mit Abnahme der Track Length über die Zeit kommt, wird zuerst die Auswertung der Track Length in halb-Stunden-Abschnitten gezeigt.

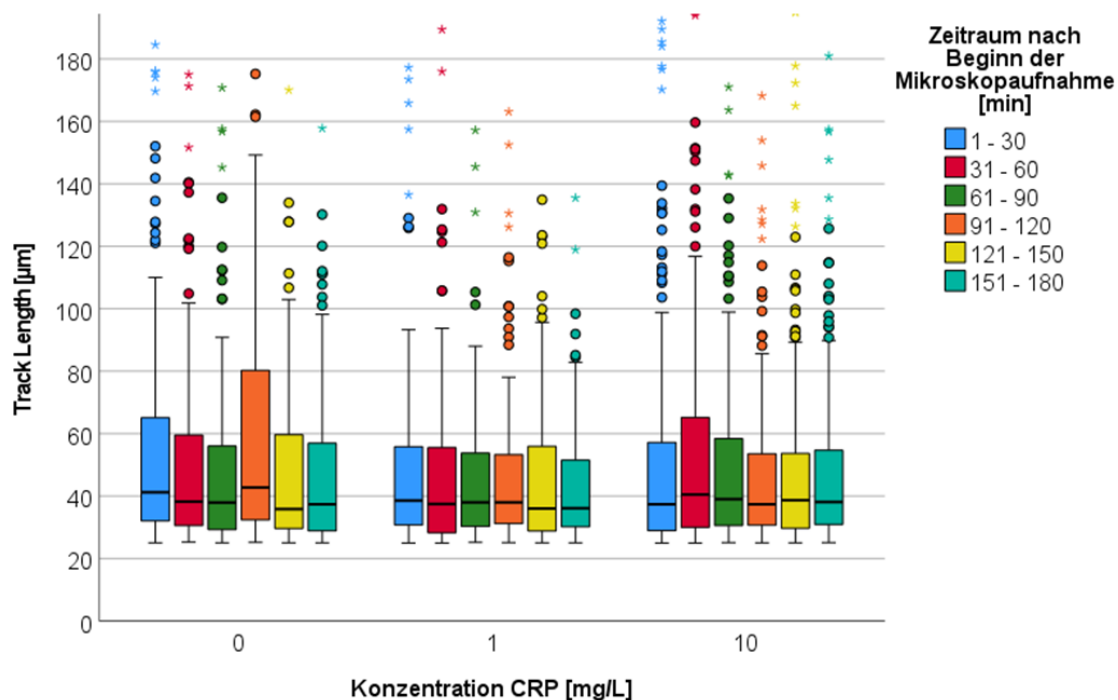


Abbildung 56: Darstellung der Track Length der PMNs unter Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen CRP über 180 min ohne den Lockstoff fMLP.

Die Mediane der Track Length liegen unabhängig von der Versuchsbedingung und des Zeitraums in etwa bei 40 µm. Wird die TDX ausgewertet, sieht man keine gerichtete Migration in X-Richtung. Die Mediane der TDX befinden sich um den 0-Punkt. Wird die Track Length der Versuche mit fMLP in den Reservoirs betrachtet (Abbildung 57), zeigt sich das typische Migrationsbild, wie es unter 3.3.1.1.1 beschrieben wird.

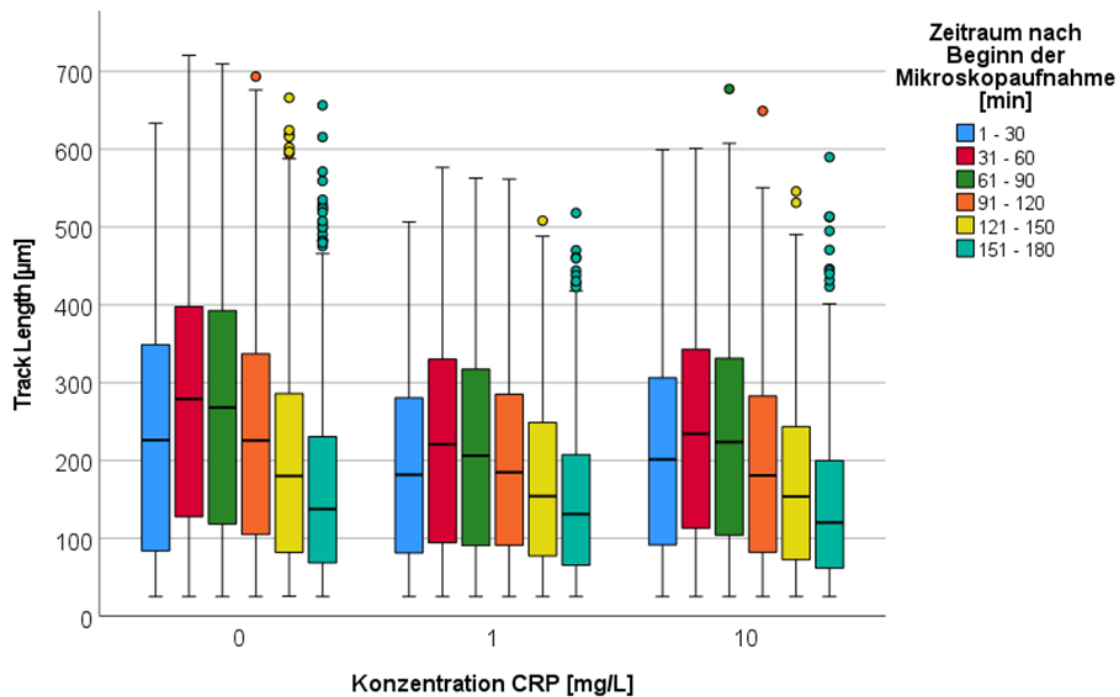


Abbildung 57: Darstellung der Track Length der PMNs unter Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen CRP über 180 min mit Zugabe des Lockstoffs fMLP in eines der Reservoirs.

In der folgenden Abbildung 58 wird die erste Stunde des Beobachtungszeitraums zusammengefasst. Es wird die Track Length der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen CRP mit oder ohne fMLP betrachtet.

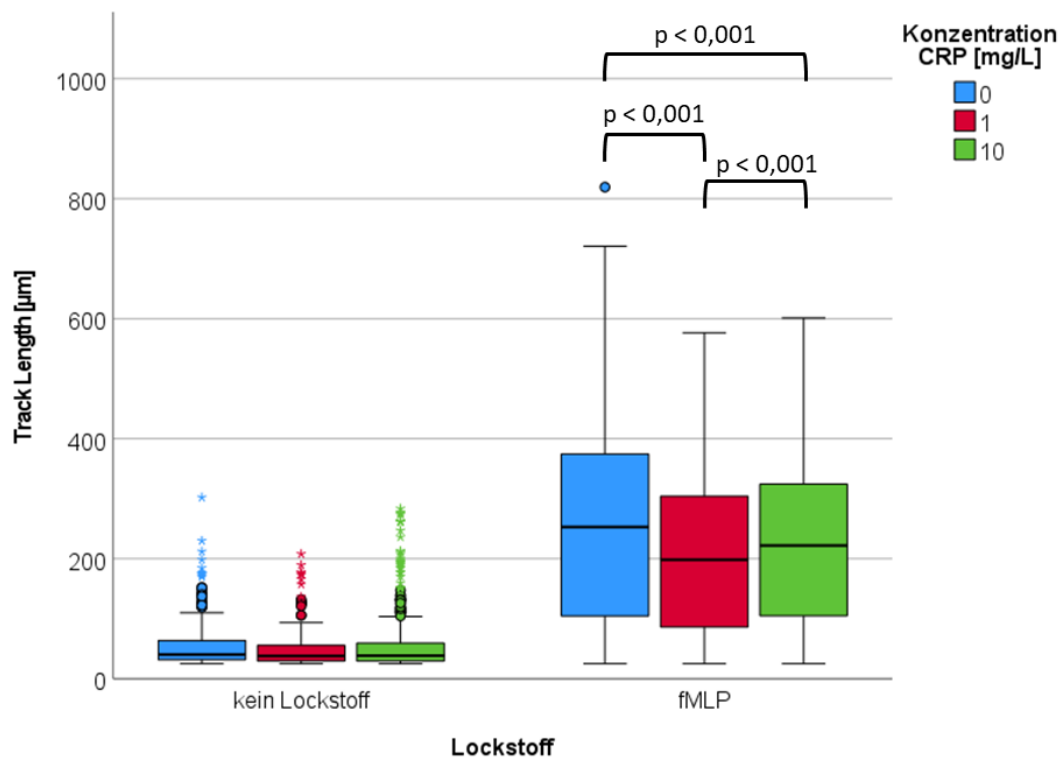


Abbildung 58: Track Length der PMNS unter Einfluss verschiedener Konzentrationen CRP mit und ohne fMLP in den Reservoirs im Beobachtungszeitraum 1 – 60 min. Die Anzahl der beobachteten Zellen liegt pro Boxplot zwischen 313 und 3054.

In der Gruppe „kein Lockstoff“ gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Track Length der Kontrolle und der Track Length nach Zugabe von CRP, unabhängig der Konzentration von CRP. Mit fMLP in einem der Reservoirs liegt die Track Length der Kontrolle im Median bei 253 μm , unter Einfluss von 1 mg/mL CRP bei 198 μm und unter Einfluss von 10 mg/mL CRP bei 222 μm . Im paarweisen Vergleich gibt es signifikante Unterschiede der Track Length zwischen allen drei Bedingungen.

3.5.1.2 NETose und Freisetzung der Myeloperoxidase

In Abbildung 59 werden die Zeitpunkte, an denen die Hälfte der Granulozyten unter Einfluss verschiedener Konzentrationen CRP in die NETose gegangen sind, dargestellt.

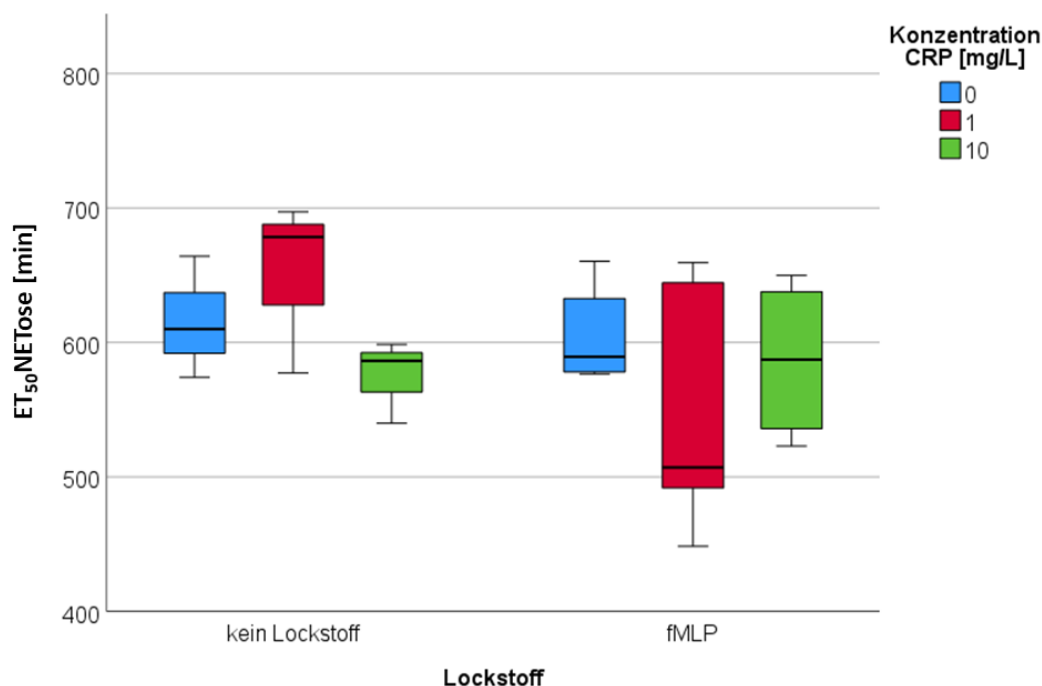


Abbildung 59: Darstellung der $ET_{50}NETose$ -Werte der PMNs unter Einfluss verschiedener Konzentrationen CRP mit und ohne fMLP in den Reservoirs. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 5.

Werden die $ET_{50}NETose$ -Werte innerhalb der Gruppen „kein Lockstoff“ und „fMLP“ verglichen, gibt es keine signifikanten Veränderungen dieser, unabhängig von der Konzentration CRP, mit der die PMNs inkubiert worden sind.

Als nächstes werden die ET_{50} -Werte der MPO-Freisetzung nach Zugabe von 0, 1 oder 10 mg/L CRP zu den PMNs veranschaulicht (Abbildung 60).

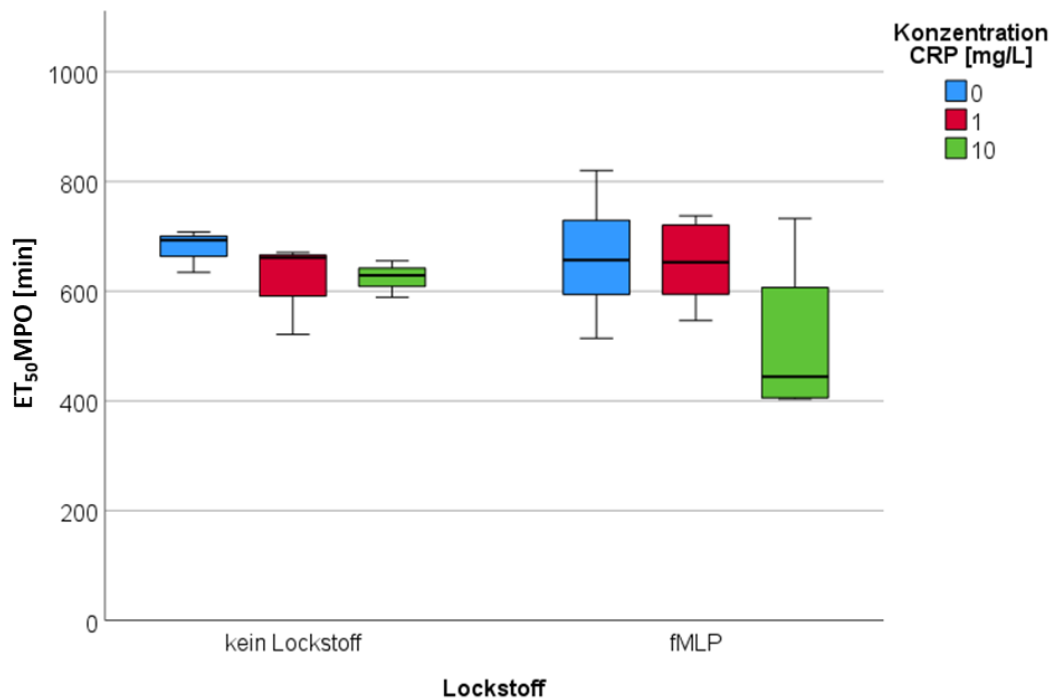


Abbildung 60: Darstellung der $ET_{50}MPO$ -Werte der PMNs unter Einfluss verschiedener Konzentrationen CRP mit und ohne fMLP in den Reservoirs. N liegt pro Boxplot zwischen 3 und 5.

Dabei wird deutlich, dass keine signifikanten Unterschiede der $ET_{50}MPO$ -Werte vorliegen, wenn kein Lockstoff in eines der Reservoirs hinzugefügt wurde. Wurde fMLP hinzugefügt, zeigt sich eine frühere MPO Freisetzung durch die PMNs unter Einfluss von 10 mg/L CRP (444 min) im Vergleich zur Kontrolle (657 min). Diese Veränderung ist statistisch jedoch nicht signifikant.

3.5.1.3 ROS-Produktion und Intensität

Nach Inkubation der PMNs mit 0, 1 und 10 mg/L CRP gibt es hinsichtlich der $T_{max}ROS$ -Werte nur Ergebnisse der Versuche ohne fMLP (Abbildung 61). Die Versuche mit fMLP konnten nicht ausgewertet werden, da die ROS-Kurven zwei Maxima besaßen und somit nicht eindeutig waren.

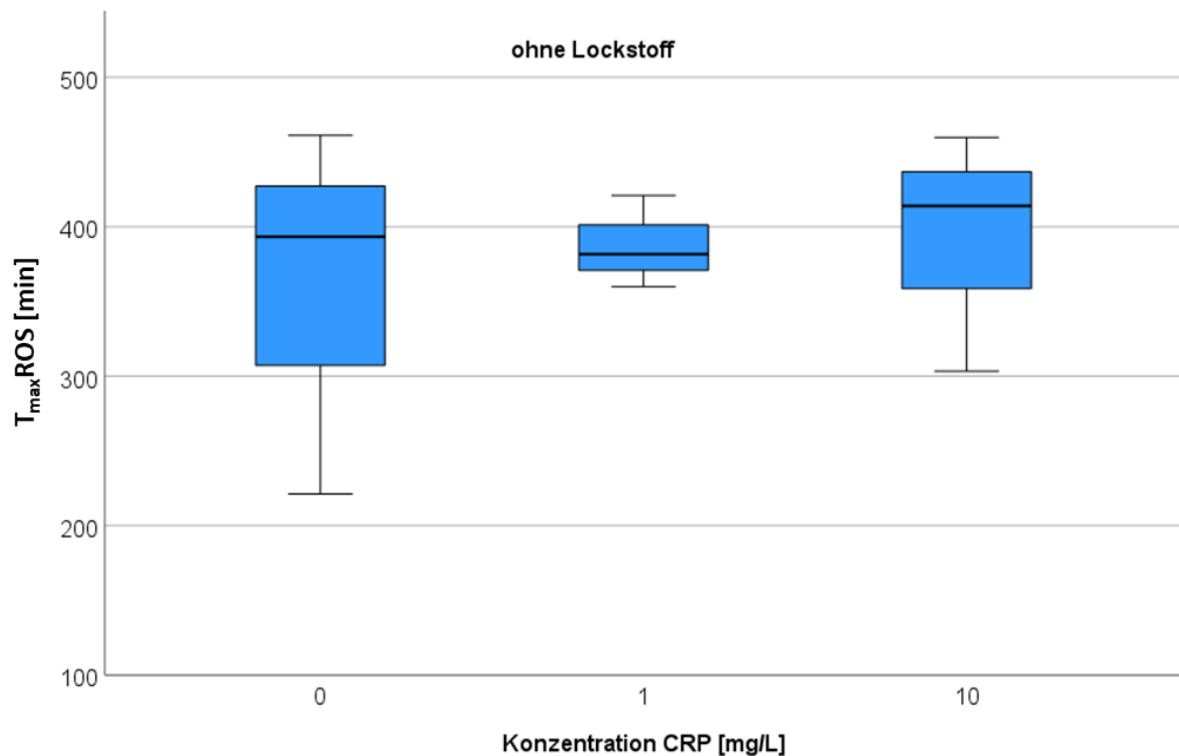


Abbildung 61: $T_{\max} \text{ROS}$ -Werte der PMNs unter Einfluss verschiedener Konzentrationen CRP ohne fMLP in den Reservoirs. N liegt pro Boxplot bei 3.

Betrachtet man die drei Versuche ohne fMLP präsentieren sich die Mediane der $T_{\max} \text{ROS}$ -Werte aller drei Bedingungen bei ca. 400 min. Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede im paarweisen Vergleich.

Abbildung 62 stellt die mediane Intensität der ROS-Produktion durch die PMNs ohne fMLP in den Reservoirs nach Inkubation der PMNs mit unterschiedlichen Konzentrationen CRP dar.

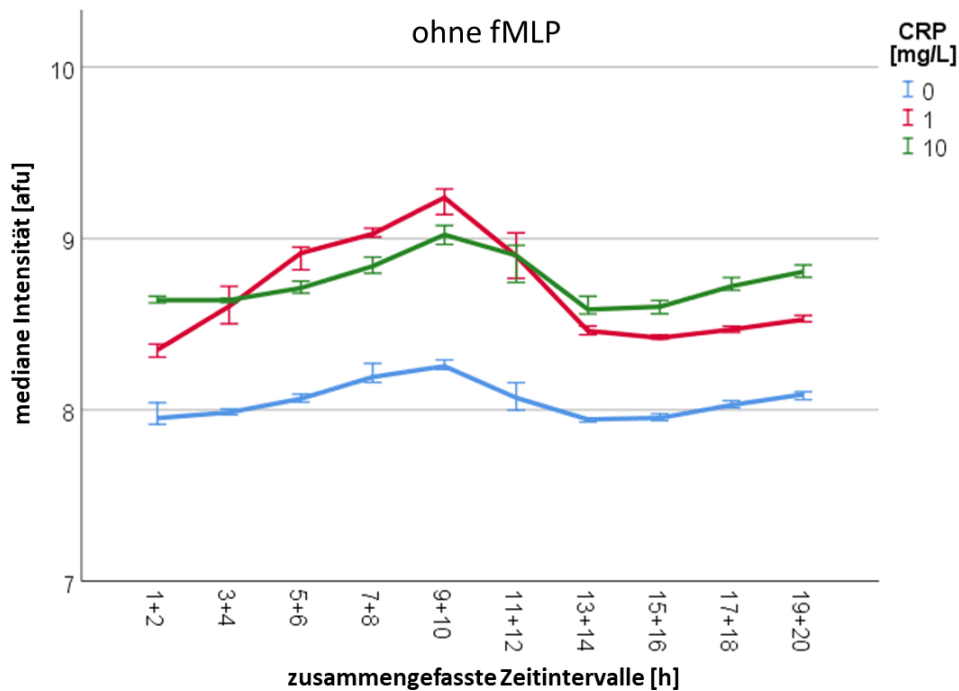


Abbildung 62: Darstellung der medianen Intensität der ROS-Produktion durch PMNs über 20 h unter Einfluss von 0; 1; 10 mg/L CRP ohne fMLP als Chemoattraktant. Fehlerbalken: 95% CI. N liegt pro Gruppe im Zeitintervall 1 + 2 h zwischen 90 und 99 und im Zeitintervall 19 + 20 h zwischen 93 und 96.

Die drei Kurven beschreiben einen ähnlichen Verlauf, mit dem Unterschied, dass die Kurve der Kontrolle (blau) einen niedrigeren Ausgangswert und während der gesamten Zeit eine niedrigere Intensität als die 1 mg/L- und 10 mg/L-Gruppe hat. Zum Zeitpunkt 1 + 2 h ist der Median der Kontrolle 7,95 afu, derjenige der 1 mg/L-Gruppe 8,35 afu und derjenige der 10 mg/L-Gruppe 8,64 afu. Die mediane Intensität der ROS-Produktion der Kontrolle zeigt jeweils einen signifikanten Unterschied zu der der CRP-Gruppen mit $p < 0,001$. Die ROS-Intensität der Gruppen mit CRP liegt während des gesamten Zeitraums über derjenigen der Kontrolle.

Wird der Einfluss von CRP auf die Intensität der ROS-Produktion unter Zugabe von fMLP in eines der Reservoirs betrachtet, ergibt sich folgende Abbildung 63.

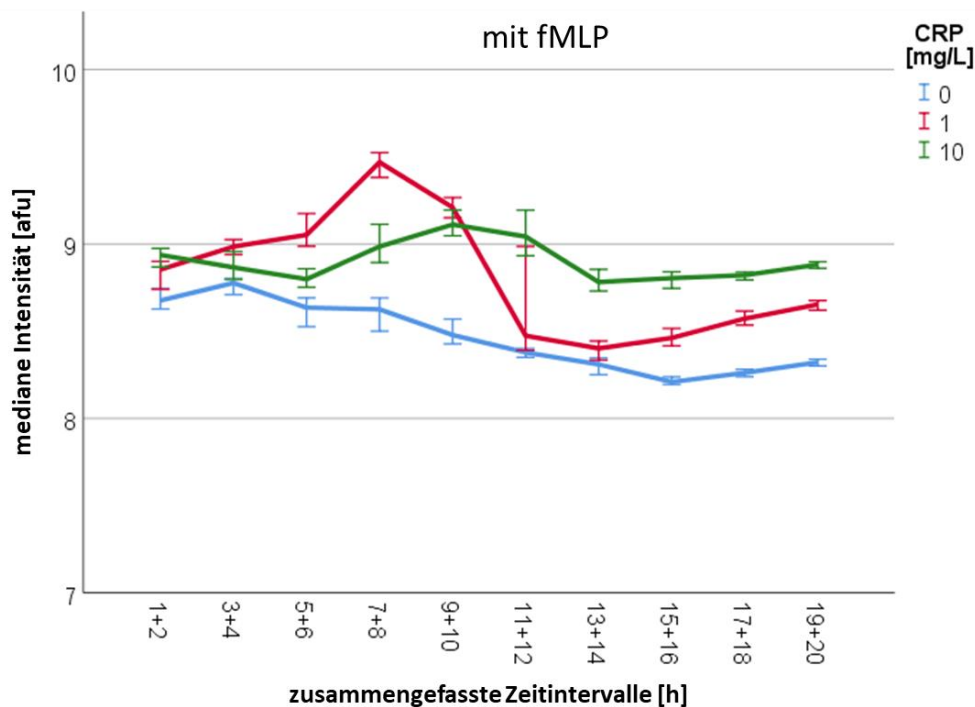


Abbildung 63: Darstellung der medianen Intensität der ROS-Produktion durch PMNs über 20 h unter Einfluss von 0; 1; 10 mg/L CRP mit fMLP als Chemoattraktant. Fehlerbalken: 95% CI. N liegt pro Gruppe im Zeitintervall 1 + 2 h zwischen 160 und 165 und im Zeitintervall 19 + 20 h zwischen 155 und 160.

Im Zeitintervall 1 + 2 h liegen die Mediane der verschiedenen Versuchsbedingungen nah beieinander. Trotzdem ist der Unterschied zwischen der 10 mg/L-Gruppe (8,94) und der Kontrolle (8,68 afu) ($p < 0,001$) und der 10 mg/L und der 1 mg/L-Gruppe (8,85 afu) ($p = 0,002$) signifikant.

3.5.2 Ergebnisse zum Einfluss von Ferritin auf die Migration, ROS-Produktion und -Intensität, die MPO-Freisetzung und das NETose-Verhalten der PMNs

Es wurden insgesamt 14 „Live-Cell-Imaging“-Versuche mit Inkubation der PMNs mit Ferritin durchgeführt. Die Bedingungen der einzelnen Versuche unterschieden sich teilweise hinsichtlich der Zugabe von $\text{TNF}\alpha$. Es wurde immer fMLP als Chemoattraktant in eines der Reservoirs hinzugefügt. Zuerst wurden drei Versuche mit den Konzentrationen 0 ng/mL, 150 ng/mL und 1000 ng/mL Ferritin angesetzt. Daraufhin wurden weitere vier Versuche durchgeführt, die folgende Bedingungen (Tabelle 4) abdecken sollen:

Kontrolle	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
0 ng/mL $\text{TNF}\alpha$ (in Reservoirs)	10 ng/mL $\text{TNF}\alpha$ (in Reservoirs)	0 ng/mL $\text{TNF}\alpha$ (in Reservoirs)	10 ng/mL $\text{TNF}\alpha$ (in Reservoirs)
0 ng/mL Ferritin	0 ng/mL Ferritin	1000 ng/mL Ferritin	1000 ng/mL Ferritin

Tabelle 4: Übersicht Versuchsbedingungen „Live-Cell-Imaging“-Versuche mit Ferritin (0, 1000 ng/mL) und $\text{TNF}\alpha$ ausschließlich in den Reservoirs des ibidi-Slides.

Darüber hinaus wurden sieben weitere Versuche durchgeführt. Die Versuchsbedingungen zu den sieben Versuchen veranschaulicht Tabelle 5.

Kontrolle	Gruppe 1	Gruppe 2
0 ng/mL TNF α (Kanal + Reservoir) 0 ng/mL Ferritin	10 ng/mL TNF α (Kanal + Reservoir) 0 ng/mL Ferritin	10 ng/mL TNF α (Kanal + Reservoir) 1000 ng/mL Ferritin

Tabelle 5: Übersicht Versuchsbedingungen „Live-Cell-Imaging“-Versuche mit Ferritin (0; 1000 ng/mL) und TNF α im Kanal und den Reservoirs des ibidi-Slides.

3.5.2.1 Track Length

Die Daten der Track Length der ersten drei Versuche, welche ohne Einfluss von TNF α erhoben wurden, konnten nicht ausgewertet werden, da zu dem Zeitpunkt der Kondensor des Mikroskops nicht funktionierte und dadurch das Programm IMARIS die Zellen nicht unterscheiden und tracken konnte.

Die Auswertung der Track Length der Versuche, welche TNF α in den Reservoirs hatten, ergibt folgende Abbildung 64. In dieser ist die Track Length der ersten Stunde des Beobachtungszeitraums zur besseren Übersicht zusammengefasst.

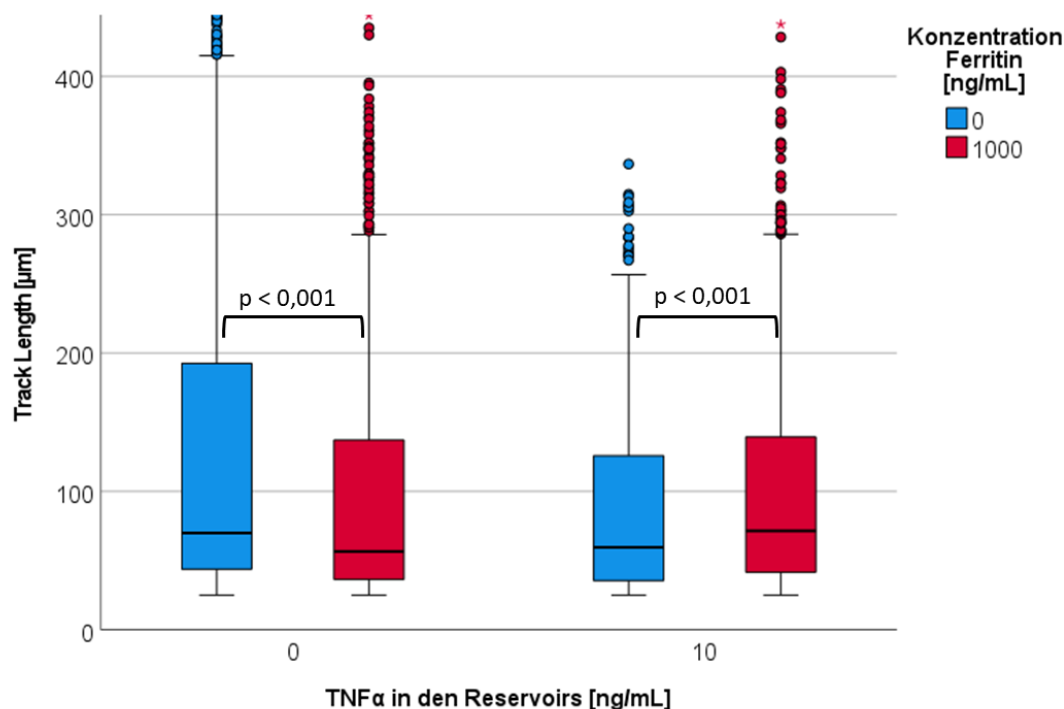


Abbildung 64: Track Length der PMNs unter Einfluss von Ferritin (0, 1000 ng/mL), sowie TNF α (0, 10 ng/mL) in den Reservoirs in der ersten Stunde des Beobachtungszeitraums. Die Anzahl der beobachteten Zellen liegt pro Boxplot zwischen 560 und 1302.

Ist kein TNF α in den Reservoirs, verkürzt sich die Track Length der PMNs mit 1000 ng/mL Ferritin (57 µm) im Vergleich zur Track Length mit 0 ng/mL Ferritin (70 µm). Diese Veränderung ist statistisch signifikant. Mit TNF α in den Reservoirs verlängert

sich hingegen die Track Length (0 ng/mL Ferritin: 60 μm ; 1000 ng/mL Ferritin: 72 μm). Auch diese Veränderung ist statistisch signifikant.

In folgender Abbildung 65 wird die Track Length der sieben Versuche, welche teilweise TNF α in den Kanälen und in den Reservoirs haben, in der ersten Stunde des Beobachtungszeitraums betrachtet.

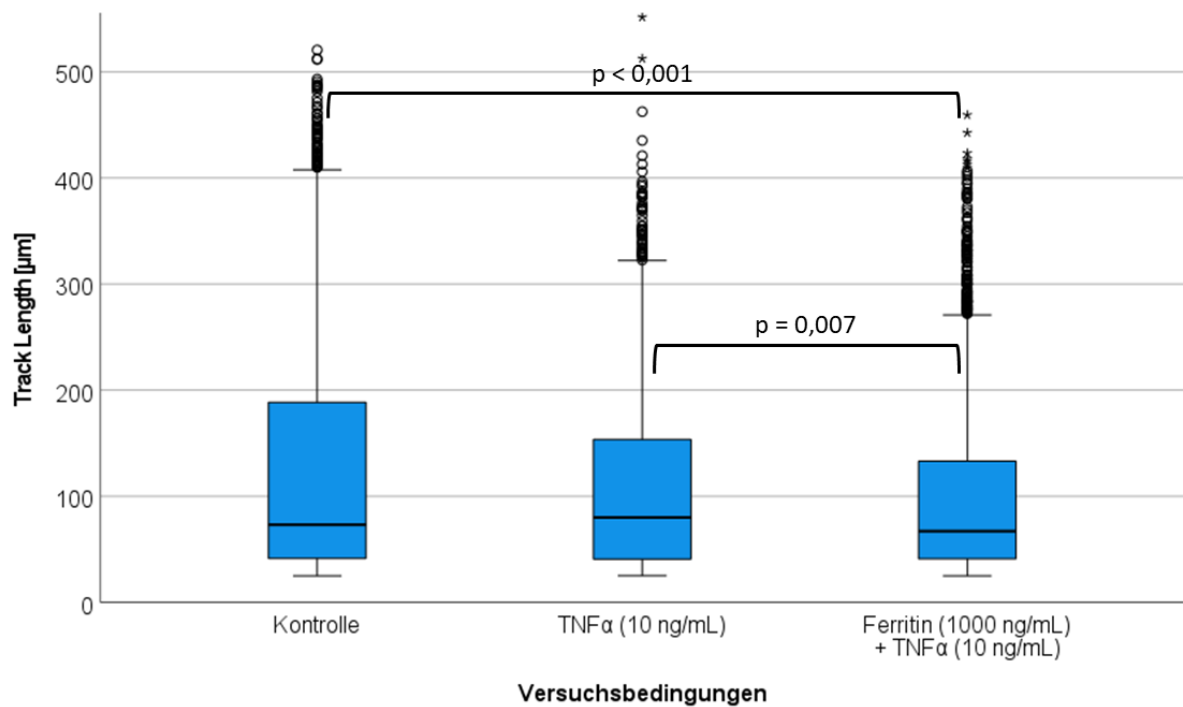


Abbildung 65: Track Length der PMNs unter Einfluss von Ferritin (0, 1000 ng/mL), sowie TNF α (0, 10 ng/mL) in dem Kanal und den Reservoirs in der ersten Stunde des Beobachtungszeitraums. Die Anzahl der beobachteten Zellen liegt pro Boxplot zwischen 1977 und 2277.

Der Median der Kontrolle liegt bei 73 μm , derjenige der Gruppe 1 (TNF α im Kanal und den Reservoirs) bei 80 μm und derjenige der Gruppe 2 (1000 ng/mL Ferritin + TNF α im Kanal und den Reservoirs) bei 67 μm . Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und Gruppe 2 und zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2.

3.5.2.2 NETose und Freisetzung der Myeloperoxidase

Abbildung 66 zeigt die ET₅₀NETose-Werte verschiedener Versuchsbedingungen. Dabei wurden die PMNs wieder mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin inkubiert und TNF α teilweise mit in die Reservoirs oder den Kanal hinzugegeben.

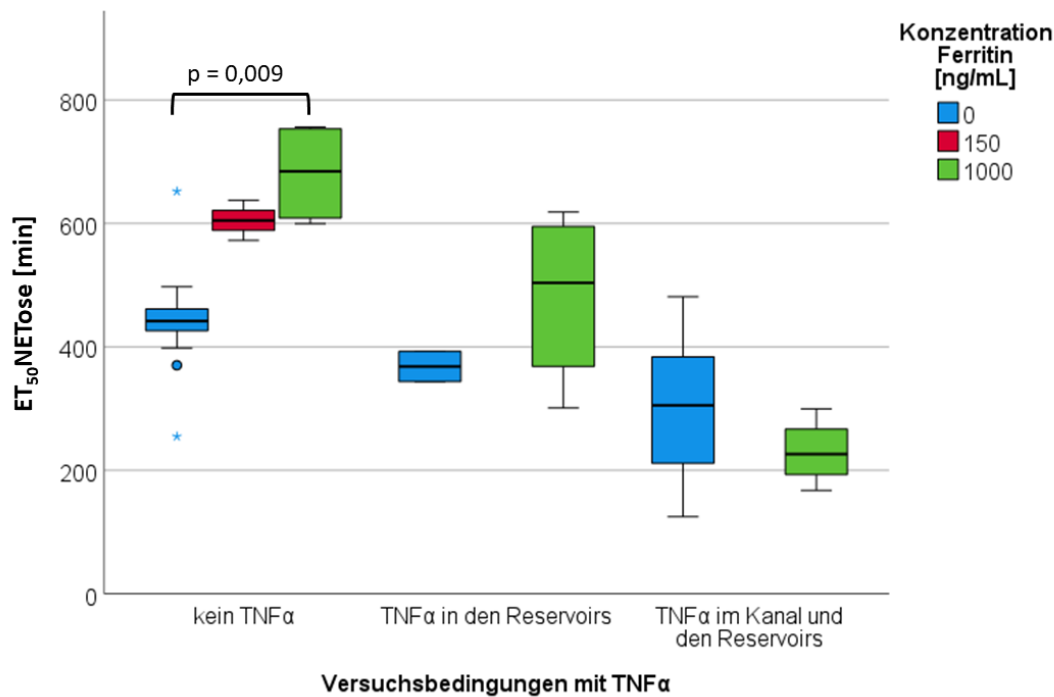


Abbildung 66: ET₅₀-Werte der NETose unter Einfluss von Ferritin (150; 1000 ng/mL) und TNFα (10 ng/mL). N liegt pro Boxplot zwischen 2 und 14.

Zuerst werden die Werte betrachtet, die keinem Einfluss von TNFα unterlagen. Dabei sieht man eine konzentrationsabhängige Zunahme der ET₅₀NETose-Zeitpunkte. Vergleicht man den Median der Kontrolle (442 min) und den Wert der 1000 ng/mL-Probe (685 min), gibt es einen statistisch signifikanten Unterschied. Wurde TNFα verwendet, unabhängig davon, ob es in den Reservoirs oder zusätzlich im Kanal eingesetzt wurde, liegen keine signifikanten Unterschiede der ET₅₀NETose-Werte in Hinsicht auf die Ferritin-Konzentration vor.

Abbildung 67 präsentiert die ET₅₀-Werte der MPO-Freisetzung durch die PMNs unter Einfluss von Ferritin und TNFα.

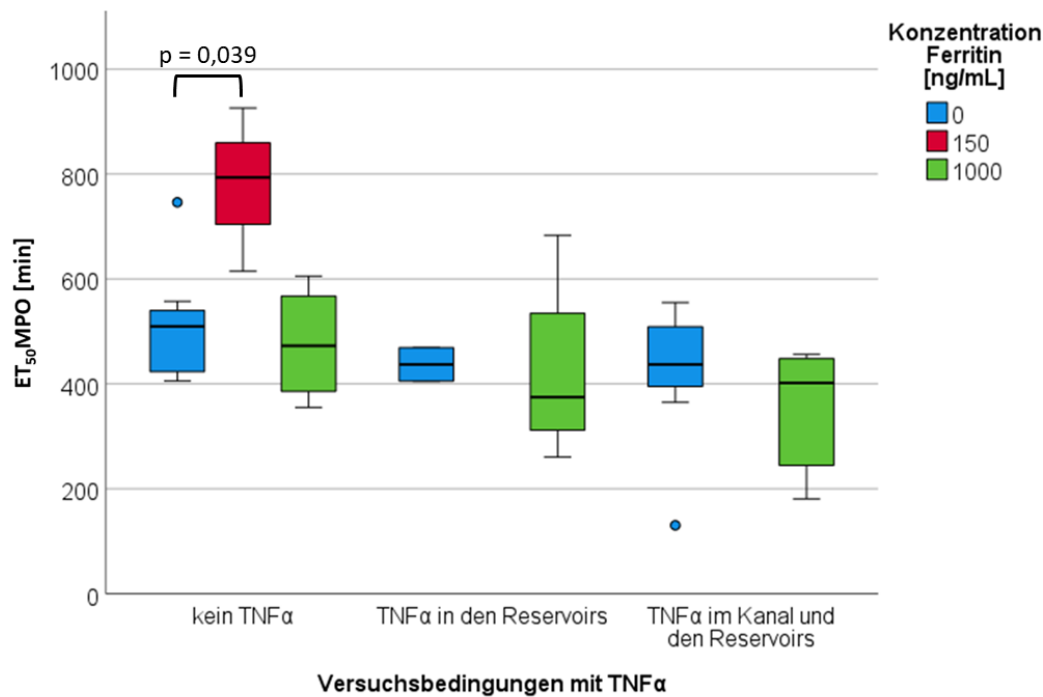


Abbildung 67: ET₅₀-Werte der MPO-Freisetzung unter Einfluss von Ferritin (150; 1000 ng/mL) und TNFα (10 ng/mL). N liegt pro Boxplot zwischen 2 und 14.

Werden die PMNs mit Ferritin, jedoch ohne TNFα inkubiert, ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den ET₅₀MPO-Werten der 0 ng/mL Ferritin-Gruppe (510 min) und denjenigen der 150 ng/mL-Ferritin-Gruppe (793 min). Ansonsten gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede, unabhängig davon, ob TNFα in den Reservoirs oder zusätzlich mit im Kanal eingesetzt wurde.

3.5.2.3 ROS-Produktion und Intensität

Die T_{max}ROS-Werte der ROS-Produktion durch die PMNs können nur unter den Bedingungen der Versuche mit TNFα in den Reservoirs und dem Kanal ausgewertet werden. In den anderen Experimenten hatten die Kurven der ROS-Werte fast ausschließlich zwei Maxima und waren so nicht eindeutig.

Die folgende Abbildung 68 zeigt die T_{max}ROS-Werte nach Inkubation der PMNs mit Ferritin (1000 ng/mL) und Zugabe von TNFα (10 ng/mL) in den Reservoirs und dem Kanal.

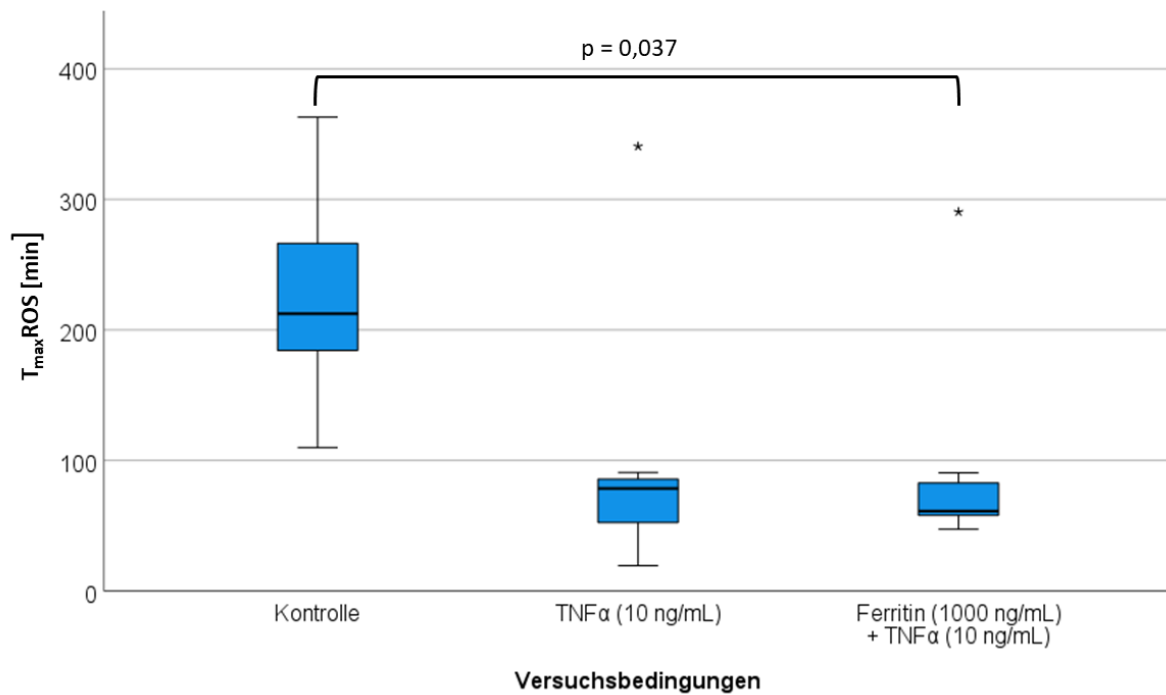


Abbildung 68: $T_{max}ROS$ -Werte unter Einfluss der PMNs von Ferritin (1000 ng/mL) und TNF α (10 ng/mL) im Kanal und den Reservoirs. N liegt pro Boxplot bei 7.

Es wird ein deutlicher Unterschied zwischen dem $T_{max}ROS$ -Wert der Kontrolle zu den Werten der anderen beiden Bedingungen sichtbar. In den Gruppen TNF α und TNF α + Ferritin zeigen sich die Zeitpunkte der maximalen ROS-Produktion früher. Statistisch signifikant ist der Unterschied zwischen den $T_{max}ROS$ -Werten der Kontrolle (212 min) und der Gruppe Ferritin + TNF α (61 min).

Zuletzt wird die mediane Intensität der ROS-Produktion betrachtet. Im Folgenden werden die Versuche mit TNF α im Kanal und den Reservoirs dargestellt (Abbildung 69).

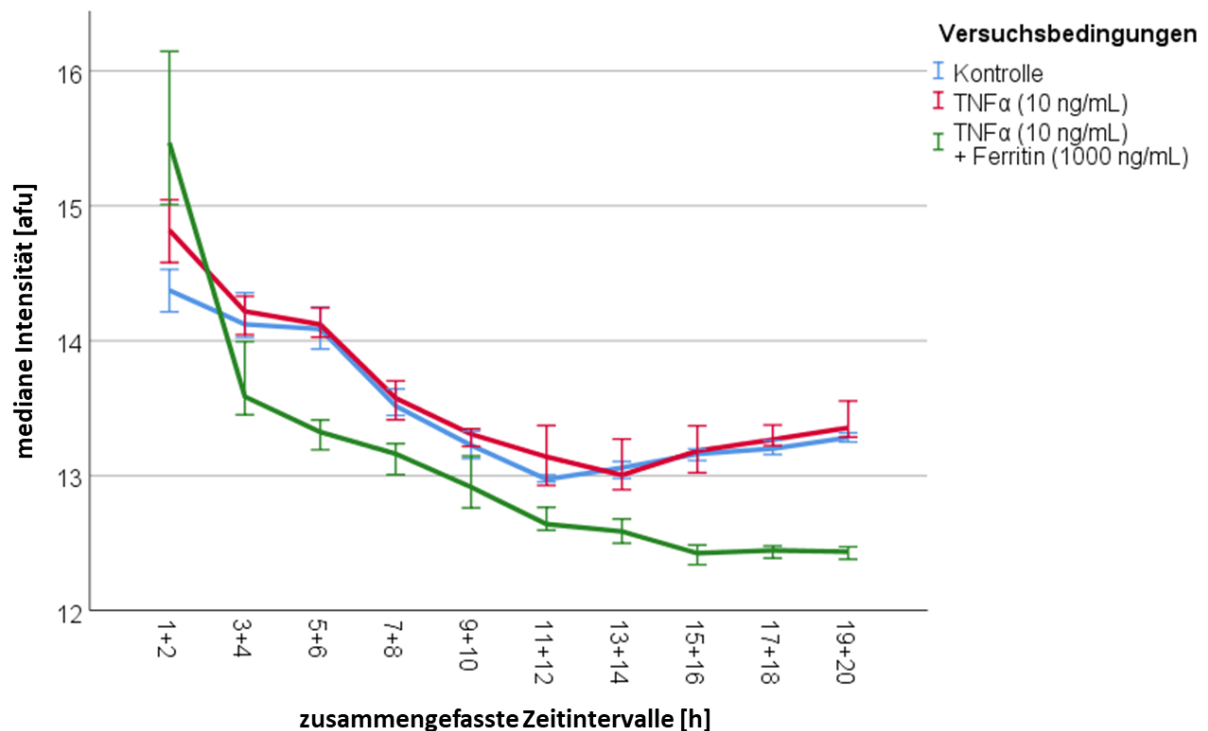


Abbildung 69: Mediane Intensität der ROS-Produktion durch PMNs unter Einfluss von TNFα (10 ng/mL) und Ferritin (1000 ng/mL) über 20 h. Fehlerbalken: 95% CI. N liegt pro Gruppe im Zeitintervall 1 + 2 h zwischen 224 und 225 und im Zeitintervall 19 + 20 h zwischen 223 und 224.

Es lässt sich beobachten, dass in den ersten zwei Stunden die Intensität der ROS-Produktion durch die PMNs in den Proben mit Ferritin am höchsten ist (15,52 afu). Hier gibt es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Werten der Ferritin + TNFα-Gruppe und den jeweiligen Werten der Kontrolle (14,4 afu) und der TNFα-Gruppe (14,8 afu) mit $p < 0,001$. Im weiteren Verlauf nimmt die mediane Intensität in allen drei Graphen ab.

4 Diskussion

Im Folgenden wird zunächst auf die Ergebnisse eingegangen. Anschließend werden diese interpretiert und mit aktueller Literatur verglichen. Dazu werden die einzelnen Substanzen separat aufgeführt. Am Ende der Diskussion wird darüber hinaus auf die Limitierungen der angewandten Methodik eingegangen.

Die Granulozyten wurden bei allen Versuchen durch Dichtegradientenzentrifugation, wie in 2.1 beschrieben, isoliert und anschließend mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Die verschiedenen Funktionalitäten der PMNs wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie oder des „Live-Cell-Imaging“ gemessen und analysiert. Bei den Funktionalitäten handelte es sich um die Expression der Oberflächenproteine CD11b, CD62L und CD66b, die ROS-Produktion einschließlich der Intensität dieser, die MPO- sowie NET-Freisetzung durch die PMNs und die Track Length.

4.1 Beeinflussung der neutrophilen Granulozyten durch FKS

Die Granulozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an FKS (0 %, 1 %, 5 %, 10 %, 60 %) inkubiert und in die Kanäle der Slides gefüllt. Daraufhin wurden durch „Live-Cell-Imaging“ die verschiedenen Verteidigungsmechanismen der PMNs aufgezeichnet. Dies dient der Methodenklärung und Optimierung. Betrachtet man die Ergebnisse aus 3.3.1, zeigt sich, dass die PMNs nach Inkubation mit 0 % FKS meistens am frühesten in die NETose gehen. Die PMNs durchlaufen nach Inkubation mit höheren FKS-Konzentrationen zu einem späteren Zeitpunkt die NETose-Formation. Dies gilt ebenfalls für die MPO-Freisetzung und ROS-Produktion. Ebenso sinkt die Intensität der ROS-Produktion über die Zeit hinweg, wenn die PMNs mit niedrigen FKS-Konzentrationen (0 und 1 %) inkubiert wurden und steigt, wenn sie höheren FKS-Konzentrationen (10 und 60 %) ausgesetzt sind. Dieses Muster lässt sich auch bei der Auswertung der Track Length beobachten, bei der die Granulozyten ohne FKS am wenigsten weit migrieren. Betrachtet man dies gesamthaft, so lässt sich eine Korrelation zwischen den einzelnen Parameter annehmen. Eine spätere ROS-Produktion geht tendenziell sowohl mit einer späteren MPO-Freisetzung und NET-Formation als auch mit einer verlängerten Track Length einher. Das Ziel dieser Vorversuche war es, die optimale Konzentration an FKS herauszufinden, die die Granulozyten und ihre Funktionalität am wenigsten beeinflusst und gewährleistet, dass die PMNs möglichst lange aktiv sind

und somit möglichst lange beobachtet werden können. Anhand der eben beschriebenen Ergebnisse wurde der Schluss gezogen, in allen weiteren Vor- und Hauptversuche mit einem Anteil von 10 % FKS in den Proben zu arbeiten, da die PMNs damit tendenziell für den längsten Zeitraum aktiv waren. Der sonstige Standard bei anderen Versuchen im Anästhesie Labor des Universitätsklinikums Regensburg waren ebenfalls 10 % FKS anteilig am Gesamtvolumen. Die beobachteten Ergebnisse stimmen mit denen aus der Literatur überein, in welcher PMNs unter Serum-freien Bedingungen ebenfalls früher in die NETose gehen als PMNs, welche mit humanem Serum kultiviert wurden [66]. Natürlich unter Berücksichtigung des Umstands, dass humanes Serum und FKS unterschiedliche Wirkungen auf Zellen haben können, wie von Heger et al. bei verschiedenen Gebärmutterhalskrebs-Zelllinien beschrieben [67]. Jedoch konnten Alipour et al. aufzeigen, dass es nach 12 h keinen signifikanten Unterschied zwischen der Apoptoserate von PMNs gibt, die in einem Medium mit 10 % FKS kultiviert worden sind und PMNs, die in einem Medium mit 10 % autologem humanem Plasma in Kultur genommen wurden. Ein Unterschied ergibt sich erst beim zweiten Beobachtungszeitpunkt von 36 h [68]. Der Beobachtungszeitraum der PMNs in dieser Arbeit beträgt 20 h. Der Versuchsaufbau und die Ergebnisse der Literatur lassen sich somit nicht auf die Versuche dieser Arbeit übertragen. Die Tendenz der Ergebnisse lässt sich aber dennoch vergleichen.

4.2 Beeinflussung der neutrophilen Granulozyten durch Ionomycin

Mit dem Ionophor Ionomycin wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Das Ziel dieser Vorversuche war es, mit einer Substanz zu arbeiten, die einen anderen Aktivierungsweg geht als PMA oder TNF α /fMLP. Außerdem sollte diese Substanz in einer Konzentration mit den PMNs inkubiert werden, welche weder in einer maximalen noch minimalen Aktivierung der PMNs resultiert. Dies lässt sich graphisch anhand einer sigmoidalen Kurve erläutern. Stellt man sich die Aktivierung der Granulozyten als eine solche vor, können eventuelle Einflüsse der endogenen Substanzen besser detektiert werden, wenn die PMNs bereits aktiviert sind. Jedoch sollten sie weder minimal noch maximal aktiviert sein, sondern ein mittleres Maß an Aktivierung vorweisen. Abbildung 70 zeigt: sind die Granulozyten nur minimal aktiviert (1), beispielsweise durch Ionomycin, braucht es eine größere Wirkung der endogenen Substanz (von 1 auf 2) auf die Granulozyten, um den Aktivierungsgrad ein wenig zu ändern. Dies gilt auch, wenn die

PMNs schon maximal aktiviert wären. Weisen die PMNs jedoch einen mittleren Aktivierungsgrad auf (3), braucht es nicht viel Wirkung durch endogene Substanzen (von 3 auf 4) um eine größere Veränderung der Aktivierung der PMNs zu erzielen, welche auch leichter erkennbar wäre. Vor diesem Hintergrund wurden zuerst Versuche mittels Durchflusszytometrie durchgeführt, in denen die PMNs mit vier verschiedenen Konzentrationen an Ionomycin (0,005; 0,05; 0,5; 5 μ M) inkubiert worden sind. Die Ionomycin Konzentrationen orientieren sich an der Literatur von Hoppenbrouwers et al. [69]. Anschließend an die Durchflusszytometrie wurden mit den zwei vielversprechendsten Konzentrationen „Live-Cell-Imaging“-Experimente durchgeführt.

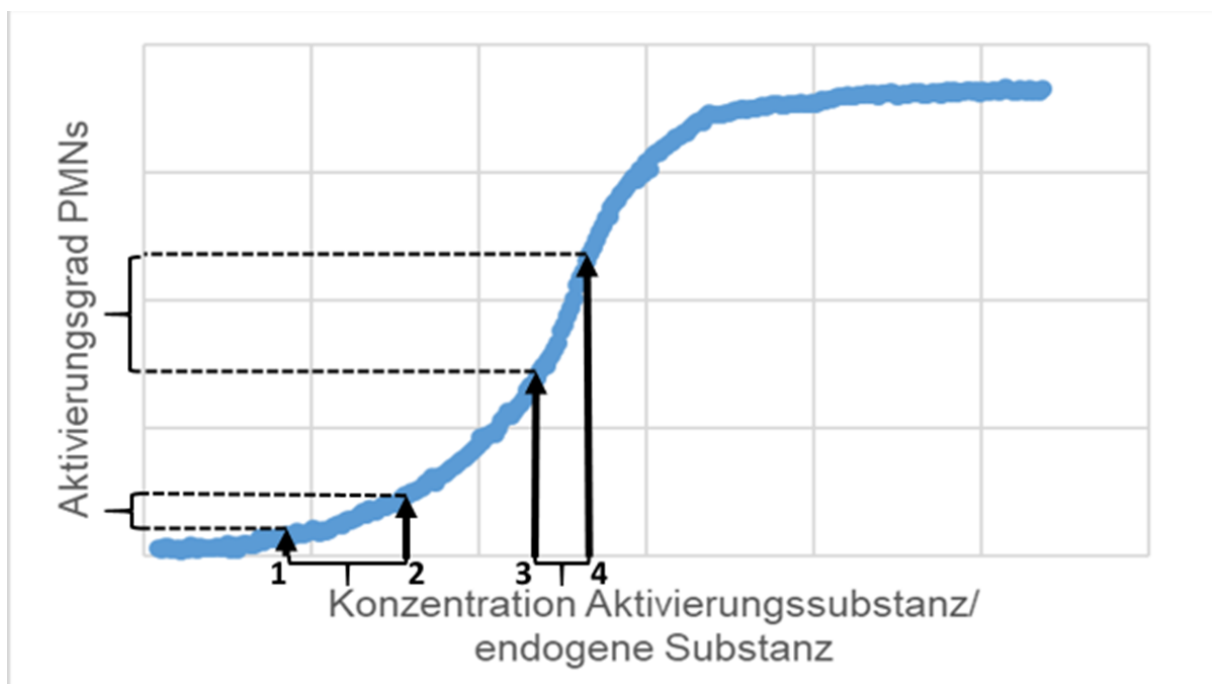


Abbildung 70: Theorie des mittleren Aktivierungsgrades der PMNs.

Die Daten aus der Durchflusszytometrie ergaben, dass Ionomycin keinen Einfluss auf den oxidativen Burst der PMNs hat. Es zeigt sich ebenfalls kein Einfluss auf CD62L. Da sich die mediane Intensität von CD62L jedoch in den Absolutwerten von denen späterer Versuche unterscheidet und deutlich niedriger ist, werden die Ergebnisse als unrealistisch eingestuft. Gründe hierfür können nicht funktionsfähige Antikörper oder eine versäumte Zugabe dieser sein, oder es wurde in der Auswertung der falsche Fluoreszenzkanal verwendet, welcher nicht die Veränderung von CD62L anzeigt. Jedoch hat Ionomycin einen Einfluss auf die Antigenexpression von CD11b und CD66b und führt zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung dieser. Bereits 1992 wurde beschrieben, dass es eine Abnahme von CD11b/CD18 auf der PMN-Oberfläche gibt,

wenn das Ca^{2+} mit EDTA, einem Chelator, „gefangen“ wird. Daraus wurde geschlossen, dass Ca^{2+} obligat für die Expression von CD11b/CD18 ist [70]. Da Ionomycin zu einer Ca^{2+} -Steigerung in der Zelle führt, lässt sich ein ähnlicher Effekt erwarten. Fiorucci et al. haben PMNs für 30 min mit 100 nM Ionomycin inkubiert und daraufhin in der Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurde die Expression von MAC-1 durch Ionomycin stark hochreguliert. Dies war jedoch nur der Fall, wenn das Medium Ca^{2+} enthielt [71]. Werden die Diagramme aus 3.3.2.1.2 genauer betrachtet und beispielsweise in Abbildung 21 eine sigmoidale Kurve gelegt ergibt sich folgende Abbildung 71. Geht man davon aus, dass der Aktivierungsgrad der PMNs mit der Antigenexpression von CD66b korreliert, ist 0,5 μM Ionomycin laut dieser Abbildung 71 eine gute Konzentration, um PMNs auf einen mittleren Aktivierungsgrad zu heben. Voraussetzung ist natürlich, dass die Theorie des mittleren Aktivierungsgrades korrekt ist.

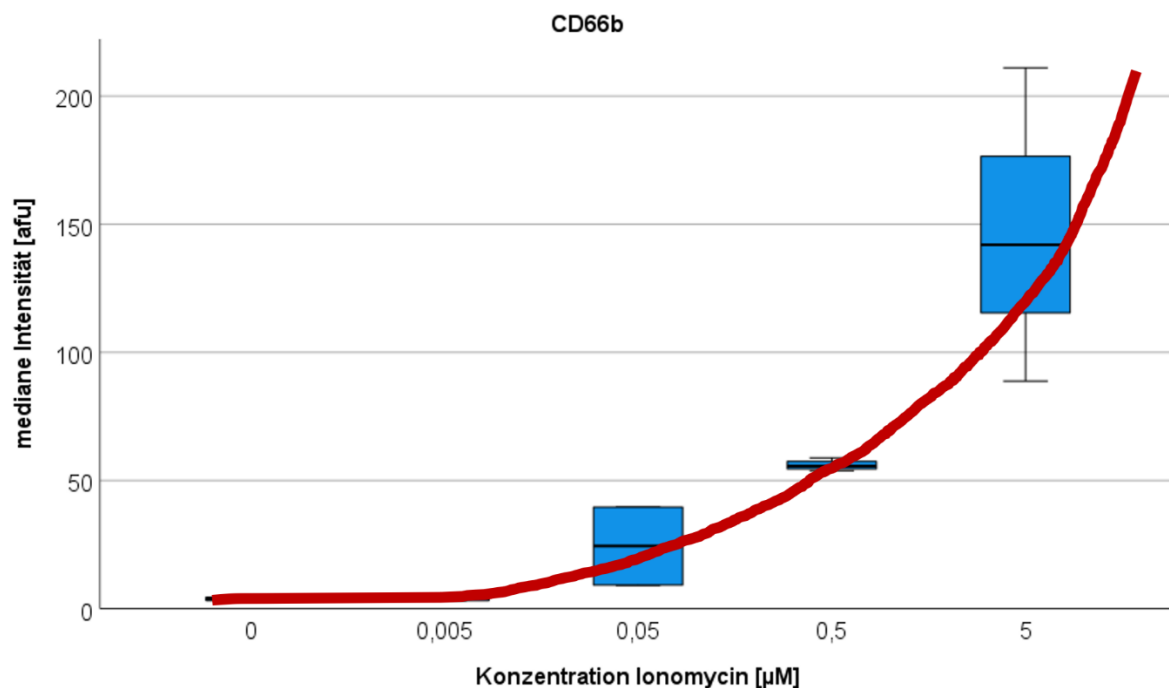


Abbildung 71: Übertragung der Aktivierungskurve der PMNs auf Abbildung 21.

Aufgrund dieser Überlegungen und Ergebnisse wurden „Live-Cell-Imaging“ Versuche mit 0; 0,1; und 0,5 μM Ionomycin durchgeführt, um auch Veränderungen in der NET-Freisetzung und Migration der PMNs detektieren zu können. Dabei war die Track Length der Granulozyten unter Einfluss von Ionomycin kürzer. Die ROS-Intensität lag bei den PMNs nach Inkubation mit Ionomycin unterhalb der Kontrolle. Ein Effekt von Ionomycin auf die ROS-Produktion und die MPO-Freisetzung konnte nicht nachgewiesen werden. Es wurde auch kein Einfluss von Ionomycin auf die Zeitpunkte der NET-Freisetzung beobachtet. Jedoch lässt sich anhand der Mediane eine leichte Tendenz

zur verfrühten NETose der PMNs unter Ionomycin erkennen. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur, denn Hoppenbrouwers et al. haben isolierte Neutrophile mit Ionomycin (3; 5 µg/mL) in Kontakt gebracht und über einen Zeitraum von 3 h beobachtet. Sie beschrieben eine verfrühte Extrusion der DNA, nachdem PMNs durch Ionomycin stimuliert wurden, im Vergleich zu unstimulierten PMNs. Letztendlich wurde Ionomycin als potenter NETose-Trigger bezeichnet [69]. Auch Parker et al. behandelten Granulozyten mit Ionomycin und stellten daraufhin einen Anstieg der DNA-Fluoreszenz im Vergleich zur unbehandelten PMNs fest. Dieser Fluoreszenzanstieg war bereits in den ersten 45 min nach der Behandlung nachweisbar. Sind die PMNs über 90 min mit Ionomycin inkubiert worden, wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der detektierten DNA nachgewiesen. Das bedeutet: 5 µg/mL Ionomycin führten bei den Granulozyten zu einer höheren NETose-Rate als 0,6; 1,3 und 2,5 µg/mL Ionomycin [72].

4.3 Beeinflussung der neutrophilen Granulozyten durch CRP

Um den Effekt des APPs CRP auf die PMNs zu untersuchen, wurden zuerst „Live-Cell-Imaging“-Versuche angesetzt. Die PMNs wurden mit 1 und 10 mg/L CRP inkubiert und anschließend in die Kanäle der Slides gefüllt. Hierbei wurden Versuche sowohl mit als auch ohne dem Chemoattraktant fMLP in den Reservoirs durchgeführt. Diese Konzentrationen und die Besonderheit, Versuche auch ohne fMLP zu machen, entstanden aufgrund verschiedener Aussagen in der Literatur. So haben Ling et al. hauptsächlich eine Verringerung der intra- und extrazellulären ROS-Produktion von PMNs unter Einfluss von humanem Plasma-CRP festgestellt. Dies war jedoch abhängig davon, ob die PMNs stimuliert wurden und wenn ja, welcher Rezeptor (z.B. FcγR oder TLR2/4) stimuliert wurde [73]. Vulesevic et al. haben isolierte Neutrophile mit 1; 5; und 10 mg/L homopentamerem, rekombinantem, humanem (rh)CRP für 60 min inkubiert und anschließend NETs, gekennzeichnet durch Sytox Green, mit konfokaler Mikroskopie aufgenommen. Dabei beschrieben die Autoren eine signifikante Erhöhung (um das 3,5-fache) der NETose nach der Behandlung der PMNs mit 10 mg/L CRP im Vergleich zu den PMNs, welche mit 1 mg/L CRP in Kontakt gebracht wurden. Letztendlich wurde rhCRP (10 mg/L) als genauso wirksamer Auslöser für die NETose wie IL-8 (25 nM) charakterisiert [74], welches schon seit 2004, ein bekannter und effizienter Trigger der NET-Bildung ist [29]. Die Versuche mit rhCRP wurden ohne weitere Aktivierungssubstanz oder Chemoattraktant durchgeführt [74]. Diese Aussagen konnten durch die

„Live-Cell-Imaging“-Versuche dieser Arbeit, unabhängig davon, ob fMLP als Lockstoff/Aktivator beteiligt war, nicht bestätigt, jedoch auch nicht widerlegt, werden. Die NET-Freisetzung fand unter Einfluss von CRP nicht verfrüht statt. Auch die Auswertung der weiteren Parameter zeigte keinerlei Effekt von CRP auf die PMNs. Jedoch lag die mediane Intensität der ROS-Produktion bei den Proben mit CRP (sowohl 1 als auch 10 mg/L) signifikant oberhalb der medianen Intensität der Kontrolle. Da der NETose eine unmittelbare ROS-Produktion vorausgeht, kann die erhöhte ROS-Intensität trotzdem ein Hinweis für die Beeinflussbarkeit der NETose durch CRP sein. Der Aussage von Ling et al. widerspricht die erhöhte ROS Intensität jedoch eher, wobei die Autoren auch selbst von unterschiedlichen Reaktionen der Zellen der einzelnen Spender auf das CRP sprechen [73]. Da die bis jetzt höchste Konzentrationen von 10 mg/L CRP nur einer leicht erhöhten pathologischen Konzentration entspricht, wurden noch weitere Daten mittels Durchflusszytometrie erhoben, die nach Inkubation der Granulozyten mit 50 mg/L CRP entstanden sind. Dies diente der Überprüfung des Einflusses einer höheren pathologischen CRP-Konzentration auf die PMNs. Nach Inkubation mit 50 mg/L CRP, wurden die PMNs teilweise noch mit TNF α /fMLP, PMA oder Ionomycin getriggert. Diese Versuche mittels Durchflusszytometrie ergaben keinerlei Effekt von CRP auf die Antigenexpression oder den oxidativen Burst der Granulozyten. Dies passt zur Literatur, die besagt, dass nur monomeres (mCRP), aber nicht pentameres (nCRP) CRP die Expression von CD11b hoch regelt [75]. Dort wird jedoch auch von einer Abnahme der CD62L-Expression unter Einfluss von mCRP und nCRP gesprochen, wobei die Wirkung von mCRP stärker war [75]. In den CRP-Versuchen wurde mit nCRP gearbeitet, was den fehlenden Effekt erklären könnte.

4.4 Beeinflussung der neutrophilen Granulozyten durch Ferritin

Ferritin wurde als APP für diese Arbeit ausgewählt, da es in der Literatur keinen Nachweis für einen direkten Effekt von Ferritin auf die PMNs gibt, es klinisch jedoch eine Korrelation zwischen erhöhten Granulozytenzahlen, vermehrter MAC-1 Expression, verstärktem oxidativen Stress und erhöhten Ferritin-Werten gibt [76]. Ferritin (1) hat in den Versuchen der Durchflusszytometrie (50; 150; 500; 1000 ng/mL) zu einer starken, konzentrationsabhängigen Steigerung des oxidativen Bursts geführt. Somit ist ein direkter Zusammenhang zwischen dem Level des oxidativen Stresses im Körper und dem Ferritinspiegel durchaus möglich. Auf die Antigenexpression der PMNs hatte Ferritin keinen Einfluss. Da Ferritin (1) nur bis zu einer Konzentration von 1000 ng/mL

konzentriert werden konnte, wurden noch weitere Versuche mittels Durchflusszytometrie und Ferritin eines anderen Herstellers (Ferritin (2)) durchgeführt, welches auf 10000 ng/mL konzentriert werden konnte. Auch hier zeigt sich die Tendenz, dass eine höhere Ferritinkonzentration zu vermehrter ROS-Produktion führt, die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Trägt man diese Werte der Ferritin (2)-Versuche einzeln auf (Abbildung 38) zeigte sich jedoch eine konzentrationsabhängige Steigerung des oxidativen Bursts. Werden die Absolutwerte der Änderung verglichen ist der Unterschied der medianen Intensität der Kontrolle gegenüber derer der höchsten Ferritin (2)-Konzentration signifikant (Abbildung 39). In der Literatur wird angeführt, dass die Isolierung von Ferritin aus natürlichen Quellen in vielen Fällen zur Heterogenität führt [41]. Diese Heterogenität könnte zu den unterschiedlich stark ausgeprägten Effekten der beiden Ferritine auf die PMNs führen. Da es bei Ferritin (1) keine Auswirkungen auf die Antigenexpression der PMNs durch das Ferritin gab, wurden mit Ferritin (2) keine Daten bezüglich der Antigenexpression erhoben. Aufgrund der signifikanten Ergebnisse in der Durchflusszytometrie, wurden mit Ferritin (1) auch „Live-Cell-Imaging“-Versuche durchgeführt. Zuerst wurden die PMNs mit 0, 150 oder 1000 ng/mL Ferritin inkubiert. Es wurde standardmäßig fMLP in einem der Reservoirs hinzugefügt, TNF α war anfangs noch kein Bestandteil der Versuchsreihe. Diese Bedingungen führten zu einer verspäteten NETose der PMNs durch 1000 ng/mL Ferritin. Aufgrund der starken ROS-Produktion der PMNs nach Inkubation mit Ferritin in der Durchflusszytometrie, hätte man eher eine verfrühte NETose erwartet. Daher wurden weitere Versuche gemacht, welche zusätzlich mit TNF α in den Reservoirs und anschließend auch noch mit TNF α in den Reservoirs und dem Kanal durchgeführt wurden, da dies eher den Versuchsbedingungen der Durchflusszytometrie entsprach. Die Werte der Track Length führen bei beiden Versuchsbedingungen zu statistisch signifikanten Unterschieden. Bezüglich der ROS-Produktion, der MPO-Freisetzung und der NETose-Fähigkeit gab es keine Veränderungen, die alleinig dem Ferritin zuzuschreiben waren, sondern wahrscheinlich durch den Effekt von TNF α auf die PMNs entstanden sind. Wird die Intensität der ROS-Produktion mit TNF α in den Reservoirs und dem Kanal betrachtet, ist diese anfangs nach Inkubation der PMNs mit Ferritin am stärksten. Dies würde sich mit den Durchflusszytometer-Ergebnissen decken, da sich hier die zeitliche Komponente der zwei verschiedenen Methoden am ehesten vergleichen lässt. Eventuell entstehen die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Methoden dadurch, dass die Durchflusszytometrie eine Momentaufnahme ist, die recht bald nach der Inkubation

festgehalten wird. Das „Live-Cell-Imaging“ geht dynamisch über einen langen Zeitraum, der von der Durchflusszytometrie nicht erfasst wird.

4.5 Beeinflussung der neutrophilen Granulozyten durch Fibrinogen

Der Effekt von Fibrinogen in verschiedenen Konzentrationen (0,5; 1,4; 2,8; 5 mg/mL) auf die PMNs wurde mittels der Durchflusszytometrie untersucht. Die Konzentration 2,8 mg/mL stammt aus der Literatur, in welcher mit dieser Konzentration an Fibrinogen eine verzögerte NETose nach Aktivierung der PMNs mit Ionomycin nachgewiesen werden konnte [77]. Als Ergebnis der Versuche wurde eine steigernde Wirkung von Fibrinogen auf den oxidativen Burst nach Aktivierung mit TNF α /fMLP, jedoch nicht nach Aktivierung mit PMA oder Ionomycin detektiert. Han et al. haben kürzlich über einen Effekt der PMNs auf das Fibrinogen berichtet, aber nicht umgekehrt. Demnach sei die ROS-Produktion der PMNs für die Oxidation des Fibrinogens und somit des darauffolgenden Abbaus des Fibrinogens mitverantwortlich [78]. Betrachtet man die Daten über die Veränderungen der Antigenexpression, zeigt sich eine signifikante Steigerung der CD11b Expression nach alleiniger Stimulation mit Fibrinogen. Auch CD66b wurde sowohl nach Präinkubation mit Fibrinogen ohne Aktivierungssubstanz als auch nach zusätzlicher Aktivierung mit TNF α /fMLP und Ionomycin vermehrt exprimiert. Diese Veränderung wurde bereits durch Rubel et al. gezeigt. Sie beschrieben, dass die Bindung von Fibrinogen an CD11b die Aktivierung der PMNs durch einen CD11b-abhängigen Mechanismus auslöst, der einen Anstieg des intrazellulären Ca²⁺, eine Hochregulierung von CD11b und die Degranulation zur Folge hat [79]. Diese CD11b-abhängige Bindung hatte außerdem eine vermehrte Expression von CD66b zur Folge, die bei 60 min nach Inkubation mit 2 mg/mL humanem Fibrinogen maximal ist [79]. Die Expression von CD62L wurde nach Präinkubation mit Fibrinogen gehemmt sowohl ohne Aktivierungssubstanz als auch mit anschließender Aktivierung durch Ionomycin. Dieser Effekt wurde in der Literatur zwar nicht beschrieben, aber nachdem die Expression von CD11b sowie CD66b verändert war, und diese Veränderung auch bekannt war, ist es naheliegend, dass die Expression von CD62L ebenfalls CD11b-abhängig durch Fibrinogen beeinflusst wurde.

4.6 Limitierungen

Die Methodik ist in ihrer Darstellung der Wirklichkeit begrenzt. Viele Dinge laufen innerhalb des menschlichen Körpers ganz anders ab als das in vitro den Anschein ma-

chen mag. Granulozyten gelten als sehr empfindliche Zellen, die auch im menschlichen Körper nicht lange überleben (8 h – 5,4 d) [7]. So gibt es Arbeitsgruppen, die die PMNs ohne Zentrifugation isolieren, da dies wohl bereits zur Aktivierung der PMNs führt [80, 81]. Hundhammer, Gruber et al. zeigten beispielsweise, dass eine erhöhte g-Kraft und Dauer der Zentrifugation zu einer geringeren Funktionalität (z.B. Reduktion des Migrationsverhaltens und des oxidativer Burst) der PMNs führt [82]. Andererseits ist die Zentrifugation der Granulozyten ein gängiges Verfahren zur Isolation, das viele Arbeitsgruppen für ihre Arbeit nutzen [66, 68, 69, 72].

Außerdem wurde bei der Auswertung der T_{\max} ROS-Werte vermehrt eine Kurve illustriert, welche zwei Maxima, also somit zwei T_{\max} ROS-Werte vorwies. Trotz visueller Kontrolle des durch IMARIS erzeugten Films, konnte nicht eindeutig gesagt werden, welches der beiden Maxima nun den tatsächlichen T_{\max} ROS Wert darstellt. Diese Daten wurden daher nicht mit in die Ergebnisse aufgenommen.

Eine weitere Limitierung findet sich in der statistischen Analyse der Migrationsdaten und der Auswertung der ROS Intensität. Diese Daten weisen nur geringe Unterschiede der absoluten Zahlen auf, liefern aber häufig signifikante Veränderungen zwischen zwei Gruppen. Diese signifikanten Veränderungen entstehen durch die hohe Fallzahl, haben aber vermutlich klinisch keinerlei Relevanz.

Hinzu kommt, dass die Anzahl der Versuche und Werte, die für die Statistik genommen wurden, teilweise relativ gering ist. Damit muss die Relevanz der signifikanten Unterschiede bei geringer N-Zahl in Frage gestellt werden. Dieser Fehler wird versucht, durch Testen rein mit nicht-parametrischen Tests, verhältnismäßig gering zu halten.

Des Weiteren haben Baker et al. gezeigt, dass es variable Zusammensetzungen von FKS von Charge zu Charge gibt, die teilweise zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen [83]. Bei jedem einzelnen Versuch, der in dieser Arbeit beschrieben ist, wurde FKS als Bestandteil des Nährmediums hinzugefügt. Dieses FKS kommt aus verschiedenen Chargen, was zu einer gewissen Unsicherheit der Ergebnisse beiträgt.

5 Zusammenfassung

PMNs wurden mit verschiedenen Konzentrationen von FKS, Ionomycin, CRP, Fibrinogen und Ferritin inkubiert und anschließend verschiedene Granulozytenfunktionalitäten mittels Durchflusszytometrie oder „Live-Cell-Imaging“ detektiert. Hierbei handelt es sich in der Durchflusszytometrie um den oxidativen Burst und die Expression der Oberflächenantigenen CD11b, CD62L und CD66b. Das „Live-Cell-Imaging“ zeichnete das Migrationsverhalten, die ROS-Produktion und Intensität, die Freisetzung von MPO und die NET-Formation auf. Es wird gezeigt, dass ein FKS-Anteil von 10 % in dem Medium, in welches die PMNs nach der Isolation aufgenommen werden, zu einer längeren Aktivität der PMNs führt. Durch eine längere Aktivität der PMNs können diese besser untersucht werden. Ionomycin hat einen moderaten Einfluss auf die PMNs. Es führt zu einer vermehrten Expression von CD11b und CD66b und zu einer verminderten Expression von CD62L. Diese Arbeit zeigt außerdem, dass die Akute-Phase-Proteine CRP, Ferritin und Fibrinogen einen moderaten Einfluss auf die Granulozytenfunktionalität ausüben. CRP verstärkt die Intensität der ROS-Produktion. Ferritin führt zu einer mäßigen Steigerung der ROS-Produktion, insbesondere nach Aktivierung mit TNF α /fMLP oder PMA. Dies wurde mittels Durchflusszytometrie detektiert. Fibrinogen hat hauptsächlich Auswirkungen auf die Expression der Antigene CD11b, CD62L und CD66b. Diese Effekte auf die PMNs sind alle moderat und zeigen gewisse Tendenzen. Extreme Beeinflussungen konnten nicht festgestellt werden. Um die genaue Bedeutung der APPs in der Immunabwehr im Zusammenhang mit den PMNs zu verstehen, sollten zukünftig weitere Versuche zu diesem Thema durchgeführt werden. Das Verhalten der PMNs ist noch lange nicht verstanden und hält noch viele ungeklärte Fragen bereit. Beispielsweise könnte in den Versuchen FKS durch humanes Serum ersetzt, die Art der Granulozytenisolierung verändert oder die Auswirkung von weiteren APPs auf die PMNs untersucht werden.

6 Anhang

6.1 Ergänzende Tabellen

Beobachteter Parameter	Endogener Modulator (Präinkubation)	Vergleich			
		ohne Aktivierungssubstanz (gegen Kontrolle ohne Präinkubation)	TNF α /fMLP (gegen Kontrolle TNF α /fMLP ohne Präinkubation)	PMA (gegen Kontrolle PMA ohne Präinkubation)	Ionomycin (gegen Kontrolle Ionomycin ohne Präinkubation)
		mediane Fluoreszenzintensität [afu]/relative Änderung ggü Kontrolle [%]/N (Anzahl)			
Burst	Ferritin	3,1/15/4	86/405/5	3165/346/6	3/30/6
	Fibrinogen	3,2/19/5	45/165/6	722/2/6	2,8/22/6
	CRP	2,7/0/2	26/53/3	679/-4/3	2,5/9/3
CD11b	Ferritin	94/-3/5	2921/-3/6	2447/-3/6	2582/63/6
	Fibrinogen	1900/1859/5	2815/-7/6	1741/-31/6	3236/105/6
	CRP	168/73/2	2503/-17/3	2054/-19/3	1275/-19/3
CD62L	Ferritin	120/0/5	31/7/6	26/-7/6	98/18/6
	Fibrinogen	22/-82/5	36/24/6	23/-18/6	33/-60/6
	CRP	113/-6/2	26/-10/3	19/-32/3	106/28/3
CD66b	Ferritin	129/3/5	2537/25/6	3924/3/6	1399/121/6
	Fibrinogen	661/428/5	3249/60/6	3961/4/6	3875/513/6
	CRP	174/39/2	2091/3/3	3491/-9/3	466/-26/3

Tabelle 6: Ergänzende Werte der Überblickstabelle der Durchflusszytometrieversuche. Es wird die mediane Fluoreszenzintensität [afu], die relative Änderung gegenüber der Kontrolle [%] und die Anzahl (N) angegeben. Pro beobachteten Parameter wurde mit jeder endogenen Substanz präinkubiert: Ferritin (500 ng/mL), Fibrinogen (2,8 mg/mL), CRP (50 mg/L). Anschließend Aktivierung mit: ohne Substanz, fMLP (100 nM), PMA (100 nM), Ionomycin (0,5 μ M)). Die statistisch signifikanten Unterschiede sind farbig hervorgehoben.

6.2 Materialliste nach Methoden

Granulozyten-Isolierung	
Cutiplast steril 7,2 x 5 cm	Smith & Nephew GmbH, Hamburg, Deutschland
Leuko Spin Medium, pluriSpin	pluriSelect Life Science – Worldwide, Leipzig, Deutschland
PBMC Spin Medium (Lympho Spin Medium), pluriSpin	pluriSelect Life Science – Worldwide, Leipzig, Deutschland
Pur-Zellin Zellstofftupfer	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Safety-Multifly-Kanüle 0,9 x 19 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 7,5 mL Lithium-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Softasept N	Braun, Melsungen, Deutschland
Venenstauschlauch	Kimetec GmbH, Ditzingen, Deutschland

FACS (Burst/Antikörper)	
Allophycocyanin anti-human CD66b Clone: G10F5 200 µg/mL	BioLegend, San Diego, USA
Dihydrorhodamin 123 1 mM in DMF (10 mg/26,2 mL DMF)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dimethylformamid (DMF)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (D8537-500 mL)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with MgCl ₂ and CaCl ₂ , liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (D8662-500 mL)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
FACSClean Solution	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FACSRinse Solution	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Fluorescein Isothiocyanate anti-human CD62L Clone: DREG-56 200 µg/mL	BioLegend, San Diego, USA
Human TNF	PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland

N-Formyl-Met-Leu-Phe, 1 mM in DMF (1 mg+2,3 mL DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St.Louis, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat 1 mM in DMF (1 mg+1,5 mL DMF)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Phycoerythrin anti-human CD11b Clone: ICRF44 150 µg/mL	BioLegend, San Diego, USA
Propidiumiodid P1304MP 1,5 mM in PBS (100 mg/100 mL PBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Röhre 5 mL PP (FACS-Röhrchen)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
RPMI 1640 without l-glutamine, phenolred, with sodium bicarbonate	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Seminaphtharhodafluor 1mM in DMF (1 mg+1,7 mL DMF)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

„Live-Cell-Imaging“ (Migration/NETose-Formation/ROS-Produktion/MPO-Freisetzung)	
µ-Slide Chemotaxis ibiTreat	Ibidi, Martinsried, Deutschland
4',6'-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
abgerundeten Pipettenspitzen	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Anti-MPO-APC, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Deckgläser (Menzel-Gläser)	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Destilliertes Wasser	Selbst destilliert im Labor der Anästhesiologie, Universitätsklinikum Regensburg
Dihydrorhodamine 123, 1 mM in DMF (10 mg/26,2 mL DMF)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fetales Kälberserum	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Human TNF	PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
ibidi Gas Incubation System for CO ₂	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Ibidi Gas Mixer	Ibidi, Martinsried, Deutschland
ibidi Heating System, Universal Fit, for 1 Chamber	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Ibidi Temperature Controller	Ibidi, Martinsried, Deutschland

LED QUAD Filterwürfel, DAPI/FI Filterwürfel	Chroma Technology Corp., Vermont, USA; Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica Application Suite X Software (Version 3.4.2.18368)	LAS X 3,0,4,16529, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica DFC9000 GT Kamera	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica DMI8 Inversmikroskop	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtquelle CoolLED pE-4000	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Minimum Essential Medium Eagle 10x with Earle's salts, without L-glutamine and sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	VWR International GmbH, Radnor, Pennsylvania, USA
N-Formyl-Met-Leu-Phe, 1 mM in DMF (1 mg+2,3 mL DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St.Louis, USA
Objektiv HC, PL FL L20x/0,40 CORR PH1	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
PureCol Type I Bovine Collagene Solution	Advanced BioMatrix, Carlsbad, USA
RPMI 1640 without L-glutamine, phenolred, with sodium bicarbonate	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Zählkammer Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

Zu untersuchende Substanzen	
recombiant human C-Reactive Protein	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Ferritin, Human Liver (1)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ferritin (2)	Merck Millipore S.A.S., Molsheim Cedex, Frankreich
Fibrinogen, from human plasma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Allgemeine Geräte und Materialien	
8er Aufsatz für Multipette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
accu-jet® pro Pipettierhelfer	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Biofuge stratos	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Cellstar® Tubes, 15 mL, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Heracell 150i	Thermo Scientific, Waltham, USA
Combitips 100 µL - 5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
DM IRB Mikroskop	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Heraeus™, Megafuge 1.0 R Zentrifuge	ThermoFisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Herasafe KS 18 biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II	ThermoFisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
MS2 Minishaker IKA JK	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Multipipette M4	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 10 - 1000 µL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Rollenmischer SRT9D	Stuart, Staffordshire, England
Rotilabo®-Reaktionsgefäße PP, farblos, 1,5 mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vakuumpumpe	VACUUBRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Wasserbad	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland

Software	
CellQuest Pro Software-Version 5.2	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Citavi 5	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
FlowJo Version 10.0.7	FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA
Imaris x64 9.0.2	Bitplane, Zürich, Schweiz
MS EXCEL Version 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

MS WORD Version 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Phoenix 64 Version 8.0.0	Certara, New York, USA
SPSS Statistics (Version 26)	IBM, Armonk, New York, USA

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studienplan der Hauptversuche.....	16
Abbildung 2: Die verschiedenen Phasen im Zentrifugengefäß nach der Dichtegradientenzentrifugation.	19
Abbildung 3: Übersicht der Hauptversuche der Durchflusszytometrie.....	20
Abbildung 4: Aufbau eines IBIDI μ -Slide [65].....	23
Abbildung 5: Veranschaulichung der Migrationsparameter:	25
Abbildung 6: Beispielgraph ROS-Produktion und Ermittlung von T_{\max} ROS.....	26
Abbildung 7: Beispielgraph ET_{50} -Wert NETose oder MPO-Freisetzung.	27
Abbildung 8: Aufbau eines Boxplots.	28
Abbildung 9: Beispiel für die Auswertung von TDX.	30
Abbildung 10: Beispiel für die Auswertung von TDY.	30
Abbildung 11: Verteilung der Track Duration aller Granulozyten eines Versuchs.....	31
Abbildung 12: Track Length der Granulozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen von FKS, aufgeteilt in Halb-Stunden-Zeitintervalle.	33
Abbildung 13: Track Length der Granulozyten mit verschiedenen Konzentrationen FKS.....	34
Abbildung 14: Darstellung der ET_{50} -Werte der NETose bei unterschiedlichen Konzentrationen FKS.....	35
Abbildung 15: Darstellung der ET_{50} -Werte der MPO-Freisetzung bei unterschiedlichen Konzentrationen FKS.....	36
Abbildung 16: T_{\max} ROS-Werte der PMNs bei unterschiedlichen FKS-Konzentrationen.	37
Abbildung 17: Mediane Intensität der ROS-Produktion durch PMNs bei unterschiedlichen Konzentrationen von FKS über 20 h hinweg.....	38
Abbildung 18: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Aktivierung mit verschiedenen Konzentrationen Ionomycin.....	39
Abbildung 19: Mediane Intensität von CD11b nach Aktivierung der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ionomycin.	40
Abbildung 20: Mediane Intensität von CD62L nach Aktivierung der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ionomycin.	41
Abbildung 21: Mediane Intensität von CD66b nach Aktivierung der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ionomycin.	41

Abbildung 22: Track Length der PMNs unter Einfluss verschiedener Konzentrationen Ionomycin.	42
Abbildung 23: Darstellung der ET ₅₀ -Werte der NETose unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Ionomycin.	43
Abbildung 24: Darstellung der ET ₅₀ -Werte der MPO-Freisetzung unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Ionomycin.	44
Abbildung 25: Darstellung der T _{max} ROS-Werte unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Ionomycin.	45
Abbildung 26: Mediane Intensität der ROS-Produktion durch PMNs unter Einfluss verschiedener Konzentrationen Ionomycin über 20 h.	46
Abbildung 27: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit 50 mg/L CRP und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNFα/fMLP oder PMA.	48
Abbildung 28: Mediane Intensität von CD11b der PMNs nach Präinkubation mit 50 mg/L CRP und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNFα/fMLP oder PMA.	49
Abbildung 29: Mediane Intensität von CD62L der PMNs nach Präinkubation mit 50 mg/L CRP und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNFα/fMLP oder PMA.	49
Abbildung 30: Mediane Intensität von CD66b der PMNs nach Präinkubation mit 50 mg/L CRP und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNFα/fMLP oder PMA.	50
Abbildung 31: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit Ionomycin bzw. ohne anschließende Aktivierung.	51
Abbildung 32: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit TNFα/fMLP.	52
Abbildung 33: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit PMA.	53

Abbildung 34: Konzentrationsabhängige Veränderungen des oxidativen Bursts der Granulozyten bei Präinkubation mit Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit PMA.	54
Abbildung 35: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (2) ohne anschließende Aktivierung.....	55
Abbildung 36: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (2) und anschließender Aktivierung mit TNF α /fMLP.	55
Abbildung 37: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (2) und anschließender Aktivierung mit PMA.	56
Abbildung 38: Einzelwerte der medianen Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ferritin (2) und anschließender Aktivierung mit PMA.	57
Abbildung 39: Absolute Änderung der medianen Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (2) und anschließender Aktivierung mit PMA.	58
Abbildung 40: Mediane Intensität von CD11b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) ohne anschließende Aktivierung.	59
Abbildung 41: Mediane Intensität von CD11b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNF α /fMLP oder PMA.	59
Abbildung 42: Mediane Intensität von CD62L nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) ohne anschließende Aktivierung bzw. mit anschließender Aktivierung mit Ionomycin.....	60
Abbildung 43: Mediane Intensität von CD62L nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit TNF α /fMLP oder PMA.	61
Abbildung 44: Mediane Intensität von CD66b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) ohne anschließende Aktivierung.	62
Abbildung 45: Mediane Intensität von CD66b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Ferritin (1) und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNF α /fMLP oder PMA.	62

Abbildung 46: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen und anschließender Aktivierung mit Ionomycin bzw. ohne anschließende Aktivierung.	63
Abbildung 47: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen und anschließender Aktivierung mit PMA.	64
Abbildung 48: Mediane Intensität des oxidativen Bursts der PMNs nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen und anschließender Aktivierung mit TNF α /fMLP.	65
Abbildung 49: Mediane Intensität von CD11b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen ohne anschließende Aktivierung.	66
Abbildung 50: Mediane Intensität von CD11b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen und anschließender Aktivierung mit Ionomycin, TNF α /fMLP oder PMA.	67
Abbildung 51: Mediane Intensität von CD62L nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen ohne anschließende Aktivierung.	68
Abbildung 52: Mediane Intensität von CD62L nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen und anschließender Aktivierung mit TNF α /fMLP oder PMA.	69
Abbildung 53: Mediane Intensität von CD62L nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen und anschließender Aktivierung mit Ionomycin.	69
Abbildung 54: Mediane Intensität von CD66b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen ohne anschließende Aktivierung oder mit anschließender Aktivierung durch TNF α /fMLP.	70
Abbildung 55: Mediane Intensität von CD66b nach Präinkubation der PMNs mit verschiedenen Konzentrationen Fibrinogen mit anschließender Aktivierung durch Ionomycin oder PMA.	71
Abbildung 56: Darstellung der Track Length der PMNs unter Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen CRP über 180 min ohne den Lockstoff fMLP.	72
Abbildung 57: Darstellung der Track Length der PMNs unter Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen CRP über 180 min mit Zugabe des Lockstoffs fMLP in eines der Reservoirs.	73

Abbildung 58: Track Length der PMNS unter Einfluss verschiedener Konzentrationen CRP mit und ohne fMLP in den Reservoirs im Beobachtungszeitraum 1 – 60 min.	73
Abbildung 59: Darstellung der ET ₅₀ NETose-Werte der PMNS unter Einfluss verschiedener Konzentrationen CRP mit und ohne fMLP in den Reservoirs.....	74
Abbildung 60: Darstellung der ET ₅₀ MPO-Werte der PMNS unter Einfluss verschiedener Konzentrationen CRP mit und ohne fMLP in den Reservoirs.....	75
Abbildung 61: T _{max} ROS-Werte der PMNs unter Einfluss verschiedener Konzentrationen CRP ohne fMLP in den Reservoirs.....	76
Abbildung 62: Darstellung der medianen Intensität der ROS-Produktion durch PMNs über 20 h unter Einfluss von 0; 1; 10 mg/L CRP ohne fMLP als Chemoattraktant.	77
Abbildung 63: Darstellung der medianen Intensität der ROS-Produktion durch PMNs über 20 h unter Einfluss von 0; 1; 10 mg/L CRP mit fMLP als Chemoattraktant.	78
Abbildung 64: Track Length der PMNs unter Einfluss von Ferritin (0, 1000 ng/mL), sowie TNF α (0, 10 ng/mL) in den Reservoirs in der ersten Stunde des Beobachtungszeitraums.	79
Abbildung 65: Track Length der PMNs unter Einfluss von Ferritin (0, 1000 ng/mL), sowie TNF α (0, 10 ng/mL) in dem Kanal und den Reservoirs in der ersten Stunde des Beobachtungszeitraums.	80
Abbildung 66: ET ₅₀ -Werte der NETose unter Einfluss von Ferritin (150; 1000 ng/mL) und TNF α (10 ng/mL).	81
Abbildung 67: ET ₅₀ -Werte der MPO-Freisetzung unter Einfluss von Ferritin (150; 1000 ng/mL) und TNF α (10 ng/mL).	82
Abbildung 68: T _{max} ROS-Werte unter Einfluss der PMNs von Ferritin (1000 ng/mL) und TNF α (10 ng/mL) im Kanal und den Reservoirs.	83
Abbildung 69: Mediane Intensität der ROS-Produktion durch PMNs unter Einfluss von TNF α (10 ng/mL) und Ferritin (1000 ng/mL) über 20 h.	84
Abbildung 70: Theorie des mittleren Aktivierungsgrades der PMNs.....	87
Abbildung 71: Übertragung der Aktivierungskurve der PMNs auf Abbildung 21.....	88

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die verschiedenen FKS-Konzentrationen in den Versuchen mit zugehöriger finaler Konzentration im Kanal und den Reservoirs.	24
Tabelle 2: Eigenschaften der Granulozytensponder.	32
Tabelle 3: Überblick der Durchflusszytometer Ergebnisse	47
Tabelle 4: Übersicht Versuchsbedingungen „Live-Cell-Imaging“-Versuche mit Ferritin (0, 1000 ng/mL) und TNF α ausschließlich in den Reservoirs des ibidi-Slides.	78
Tabelle 5: Übersicht Versuchsbedingungen „Live-Cell-Imaging“-Versuche mit Ferritin (0; 1000 ng/mL) und TNF α im Kanal und den Reservoirs des ibidi-Slides.	79
Tabelle 6: Ergänzende Werte der Überblickstabelle der Durchflusszytometrierversuche.	95

6.5 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APC	Allophycocyanin
AFU	„artificial fluorescence units“
APP	Akute-Phase-Protein
APR	Akute-Phase-Reaktion
CI	Konfidenzintervall
CRP	C-reaktives Protein
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DHR	Dihydrorhodamin
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FKS	fetales Kälberserum
fMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Forward Scatter
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	hypochlorige Säure
ICAM1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
ICAM2	interzelluläres Adhäsionsmolekül-2
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
LFA-1	Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen 1
MAC-1	Makrophagen-1-Antigen
mCRP	monomeres C-reaktives Protein
MEM	Minimum Essential Medium
MFI	Median fluorescence intensity
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat

nCRP	natives C-reaktives Protein
NE	neutrophile Elastase
NET	„neutrophil extracellular trap“, neutrophile extrazelluläre Falle
Nox	NADPH-Oxidase
O ₂ ⁻	Superoxidanionen
OH [·]	Hydroxylradikal
PAD4	Peptidylarginin-Deiminase 4
PAMP	pathogenassoziierte molekulare Muster
PBS	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline
PC	Phosphocholin
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium Iodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRR	Mustererkennungsrezeptor
ROS	„reactive oxygen species“, reaktive Sauerstoffspezies
SNARF	Seminaphtharhodafluor
SSC	Side Scatter
TD	Track Duration
TDX	Track Displacement Length X
TDY	Track Displacement Length Y
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR1	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1
TNFR2	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α

Literaturverzeichnis

1. Pape Hans-Christian, Kurtz Armin, Silbernagel Stefan, editor. Physiologie. 7th ed.: Thieme; 2014.
2. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343:37–49. doi:10.1056/NEJM200007063430107.
3. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;340:448–54. doi:10.1056/NEJM199902113400607.
4. Hellebrekers P, Vrisekoop N, Koenderman L. Neutrophil phenotypes in health and disease. *Eur J Clin Invest*. 2018;48 Suppl 2:e12943. doi:10.1111/eci.12943.
5. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010;31:318–24. doi:10.1016/j.it.2010.05.006.
6. Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:692–704. doi:10.1038/nri3908.
7. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:159–75. doi:10.1038/nri3399.
8. Ivetic A, Hoskins Green HL, Hart SJ. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. *Front Immunol*. 2019;10:1068. doi:10.3389/fimmu.2019.01068.
9. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science*. 1989;245:1238–41. doi:10.1126/science.2551036.
10. Filippi M-D. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. *Blood*. 2019;133:2149–58. doi:10.1182/blood-2018-12-844605.
11. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:366–78. doi:10.1038/nrm2889.
12. Muller WA. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol*. 2013;50:7–22. doi:10.1177/0300985812469883.
13. Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, La Fuente MA de, Geha RS, Ochs HD, et al. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity*. 2007;26:784–97. doi:10.1016/j.immuni.2007.04.015.

14. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*. 2011;17:1381–90. doi:10.1038/nm.2514.
15. Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol*. 1997;139:1349–60. doi:10.1083/jcb.139.5.1349.
16. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiological reviews*. 2019;99:1223–48. doi:10.1152/physrev.00012.2018.
17. Prince LR, Whyte MK, Sabroe I, Parker LC. The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11:397–403. doi:10.1016/j.coph.2011.06.007.
18. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003;102:2660–9. doi:10.1182/blood-2003-04-1078.
19. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, Bernuth H von, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*. 2015;11:e1004651. doi:10.1371/journal.ppat.1004651.
20. El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie J-C, Gougerot-Pocidalo M-A, Dang PM-C. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev*. 2016;273:180–93. doi:10.1111/imr.12447.
21. Jaganjac M, Cipak A, Schaur RJ, Zarkovic N. Pathophysiology of neutrophil-mediated extracellular redox reactions. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016;21:839–55. doi:10.2741/4423.
22. Daniels I, Crouch SP, Lindsay MA, Morgan AG, Burden RP, Fletcher J. Primary and secondary granule release by polymorphonuclear leukocytes exposed to peritoneal dialysis effluent. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994;1:227–31. doi:10.1128/cdli.1.2.227-231.1994.
23. Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med*. 1971;134:907–34. doi:10.1084/jem.134.4.907.
24. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood*. 1998;92:3007–17. doi:10.1182/blood.V92.9.3007.
25. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005;77:598–625. doi:10.1189/jlb.1204697.

26. Ndrepepa G. Myeloperoxidase - A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2019;493:36–51. doi:10.1016/j.cca.2019.02.022.
27. Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules* 2019. doi:10.3390/biom9080365.
28. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol*. 1996;59:229–40. doi:10.1002/jlb.59.2.229.
29. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303:1532–5. doi:10.1126/science.1092385.
30. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature reviews. Immunology*. 2018;18:134–47. doi:10.1038/nri.2017.105.
31. Khan MA, Palaniyar N. Transcriptional firing helps to drive NETosis. *Sci Rep*. 2017;7:41749. doi:10.1038/srep41749.
32. 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;176:231–41. doi:10.1083/jcb.200606027.
33. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:48487–90. doi:10.1074/jbc.R400025200.
34. Tillett WS, Francis T. SEROLOGICAL REACTIONS IN PNEUMONIA WITH A NON-PROTEIN SOMATIC FRACTION OF PNEUMOCOCCUS. *J Exp Med*. 1930;52:561–71. doi:10.1084/jem.52.4.561.
35. Yao Z, Zhang Y, Wu H. Regulation of C-reactive protein conformation in inflammation. *Inflamm Res*. 2019;68:815–23. doi:10.1007/s00011-019-01269-1.
36. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*. 1999;7:169–77. doi:10.1016/S0969-2126(99)80023-9.
37. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. *J Exp Med*. 1999;190:585–90. doi:10.1084/jem.190.4.585.

38. Marnell LL, Mold C, Volzer MA, Burlingame RW, Du Clos TW. C-reactive protein binds to Fc gamma RI in transfected COS cells. *J Immunol.* 1995;155:2185–93.
39. Ansar W, Ghosh S. C-reactive protein and the biology of disease. *Immunol Res.* 2013;56:131–42. doi:10.1007/s12026-013-8384-0.
40. Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein. *J Emerg Med.* 1999;17:1019–25. doi:10.1016/s0736-4679(99)00135-3.
41. Chakraborti S, Chakrabarti P. Self-Assembly of Ferritin: Structure, Biological Function and Potential Applications in Nanotechnology. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1174:313–29. doi:10.1007/978-981-13-9791-2_10.
42. Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et biophysica acta.* 2009;1790:589–99. doi:10.1016/j.bbagen.2008.09.004.
43. Arosio P, Elia L, Poli M. Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life.* 2017;69:414–22. doi:10.1002/iub.1621.
44. Giemza-Stokłosa J, Islam MA, Kotyla PJ. Hyperferritinaemia: An Iron Sword of Autoimmunity. *Curr Pharm Des.* 2019;25:2909–18. doi:10.2174/1381612825666190709202804.
45. Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood.* 2002;99:3505–16. doi:10.1182/blood.v99.10.3505.
46. Letendre ED, Holbein BE. Mechanism of impaired iron release by the reticuloendothelial system during the hypoferremic phase of experimental *Neisseria meningitidis* infection in mice. *Infect Immun.* 1984;44:320–5. doi:10.1128/iai.44.2.320-325.1984.
47. Weisel JW. Fibrinogen and Fibrin. In: *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers*; Elsevier; 2005. p. 247–299. doi:10.1016/S0065-3233(05)70008-5.
48. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1894–904. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x.
49. Ugarova TP, Yakubenko VP. Recognition of fibrinogen by leukocyte integrins. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:368–85. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03523.x.
50. Fan ST, Edgington TS. Integrin regulation of leukocyte inflammatory functions. CD11b/CD18 enhancement of the tumor necrosis factor-alpha responses of monocytes. *J Immunol.* 1993;150:2972–80.

51. Perez RL, Ritzenthaler JD, Roman J. Transcriptional regulation of the interleukin-1 β promoter via fibrinogen engagement of the CD18 integrin receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20:1059–66. doi:10.1165/ajrcmb.20.5.3281.
52. Skogen WF, Senior RM, Griffin GL, Wilner GD. Fibrinogen-derived peptide B β 1-42 is a multidomained neutrophil chemoattractant. *Blood*. 1988;71:1475–9.
53. Fish RJ, Neerman-Arbez M. Fibrinogen gene regulation. *Thromb Haemost*. 2012;108:419–26. doi:10.1160/TH12-04-0273.
54. Lowe GDO. Circulating inflammatory markers and risks of cardiovascular and non-cardiovascular disease. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1618–27. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01416.x.
55. van der Valk J. Fetal bovine serum-a cell culture dilemma. *Science*. 2022;375:143–4. doi:10.1126/science.abm1317.
56. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEx*. 2010;27:53–62. doi:10.14573/altex.2010.1.53.
57. Marasco WA, Phan SH, Kruttsch H, Showell HJ, Feltner DE, Nairn R, et al. Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*. 1984;259:5430–9.
58. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. 2013;17:638–50. doi:10.1016/j.intimp.2013.06.034.
59. Liao C-H, Chen J-J, Lin JE, Liu C-H, Tseng C-P, Day Y-J. 5-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7-dimethoxy-4H-chromen-4-one (MSF-2) suppresses fMLP-mediated respiratory burst in human neutrophils by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Cell Physiol*. 2011;226:1519–30. doi:10.1002/jcp.22481.
60. Jenkins AR, Holden NS, Jones AW. Inflammatory responses to acute exercise during pulmonary rehabilitation in patients with COPD. *Eur J Appl Physiol*. 2020;120:2301–9. doi:10.1007/s00421-020-04452-z.
61. Bredthauer A, Kopfmüller M, Gruber M, Pfaehler S-M, Lehle K, Petermichl W, et al. Therapeutic Anticoagulation with Argatroban and Heparins Reduces Granulocyte Migration: Possible Impact on ECLS-Therapy? *Cardiovasc Ther*. 2020;2020:9783630. doi:10.1155/2020/9783630.

62. Doblinger N, Bredthauer A, Mohrez M, Hähnel V, Graf B, Gruber M, Ahrens N. Impact of hydroxyethyl starch and modified fluid gelatin on granulocyte phenotype and function. *Transfusion*. 2019;59:2121–30. doi:10.1111/trf.15279.
63. Kolle G, Metterlein T, Gruber M, Seyfried T, Petermichl W, Pfaehler S-M, et al. Potential Impact of Local Anesthetics Inducing Granulocyte Arrest and Altering Immune Functions on Perioperative Outcome. *J Inflamm Res*. 2021;14:1–12. doi:10.2147/JIR.S275525.
64. Pai D, Gruber M, Pfaehler S-M, Bredthauer A, Lehle K, Trabold B. Polymorphonuclear Cell Chemotaxis and Suicidal NETosis: Simultaneous Observation Using fMLP, PMA, H7, and Live Cell Imaging. *J Immunol Res*. 2020;2020:1415947. doi:10.1155/2020/1415947.
65. Ibidi GmbH. μ -Slide Chemotaxis. <https://ibidi.com/channel-slides/9--slide-chemotaxis-ibitreat.html>. Accessed 2 May 2022.
66. Kamoshida G, Kikuchi-Ueda T, Nishida S, Tansho-Nagakawa S, Kikuchi H, Ubagai T, Ono Y. Spontaneous formation of neutrophil extracellular traps in serum-free culture conditions. *FEBS Open Bio*. 2017;7:877–86. doi:10.1002/2211-5463.12222.
67. Heger JI, Froehlich K, Pastuschek J, Schmidt A, Baer C, Mrowka R, et al. Human serum alters cell culture behavior and improves spheroid formation in comparison to fetal bovine serum. *Exp Cell Res*. 2018;365:57–65. doi:10.1016/j.yexcr.2018.02.017.
68. Alipour R, Fatemi A, Alsahebfosul F, Andalib A, Pourazar A. Autologous plasma versus fetal calf serum as a supplement for the culture of neutrophils. *BMC Res Notes*. 2020;13:39. doi:10.1186/s13104-020-4902-z.
69. Hoppenbrouwers T, Autar ASA, Sultan AR, Abraham TE, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, et al. In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PLoS One*. 2017;12:e0176472. doi:10.1371/journal.pone.0176472.
70. Leino L, Sorvajärvi K. CD11b is a calcium-dependent epitope in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187:195–200. doi:10.1016/s0006-291x(05)81478-0.
71. Fiorucci S, Santucci L, Gerli R, Brunori PM, Federici B, Ugolini B, et al. NSAIDs upregulate beta 2-integrin expression on human neutrophils through a calcium-

- dependent pathway. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997;11:619–30.
doi:10.1046/j.1365-2036.1997.00190.x.
72. Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol* 2012.
doi:10.1189/jlb.1211601.
 73. Ling MR, Chapple ILC, Creese AJ, Matthews JB. Effects of C-reactive protein on the neutrophil respiratory burst in vitro. *Innate Immun.* 2014;20:339–49.
doi:10.1177/1753425913493199.
 74. Vulesevic B, Lavoie SS, Neagoe P-E, Dumas E, Räkel A, White M, Sirois MG. CRP Induces NETosis in Heart Failure Patients with or without Diabetes. *Immunohorizons.* 2019;3:378–88. doi:10.4049/immunohorizons.1900026.
 75. Zouki C, Haas B, Chan JS, Potempa LA, Filep JG. Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with promotion of neutrophil-endothelial cell adhesion. *J Immunol.* 2001;167:5355–61. doi:10.4049/jimmunol.167.9.5355.
 76. Yoon JW, Pahl MV, Vaziri ND. Spontaneous leukocyte activation and oxygen-free radical generation in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2007;71:167–72.
doi:10.1038/sj.ki.5002019.
 77. Locke M, Francis RJ, Tsaousi E, Longstaff C. Fibrinogen protects neutrophils from the cytotoxic effects of histones and delays neutrophil extracellular trap formation induced by ionomycin. *Sci Rep.* 2020;10:11694. doi:10.1038/s41598-020-68584-0.
 78. Han CY, Pichon TJ, Wang X, Ringgold KM, St John AE, Stern SA, White NJ. Leukocyte activation primes fibrinogen for proteolysis by mitochondrial oxidative stress. *Redox Biol.* 2022;51:102263. doi:10.1016/j.redox.2022.102263.
 79. Rubel C, Fernández GC, Dran G, Bompadre MB, Isturiz MA, Palermo MS. Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis. *J Immunol.* 2001;166:2002–10. doi:10.4049/jimmunol.166.3.2002.
 80. Fröhlich D, Wittmann S, Rothe G, Schmitz G, Taeger K. Thiopental impairs neutrophil oxidative response by inhibition of intracellular signalling. *Eur J Anaesthesiol.* 2002;19:474–82. doi:10.1017/s0265021502000789.
 81. Rimboeck J, Gruber M, Wittmann S. Is the In Vitro Observed NETosis the Favored Physiological Death of Neutrophils or Mainly Induced by an Isolation Bias? *Int J Mol Sci* 2023. doi:10.3390/ijms24087368.

82. Hundhammer T, Gruber M, Wittmann S. Paralytic Impact of Centrifugation on Human Neutrophils. *Biomedicines* 2022. doi:10.3390/biomedicines10112896.
83. Baker M. Reproducibility: Respect your cells! *Nature*. 2016;537:433–5. doi:10.1038/537433a.

