

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med T. Pohlemann)

**Etablierung eines statischen in vitro-Modells zur Untersuchung
der Auswirkungen von Hypoxie und Hypoxie/Reoxygenierung
auf die Adhäsionsrate von neutrophilen Granulozyten an
mikrovaskuläre Endothelzellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von: Katrin Schmitz

geb. am 19.10.1979 in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	S. 1-1 - S. 1-4
1.1 In deutscher Sprache	S. 1-1 - S. 1-2
1.2 In englischer Sprache	S. 1-3 - S. 1-4
2. Einleitung	S. 2-1 - S. 2-17
2.1 Klinische Relevanz der Hypoxie	S. 2-1 - S. 2-3
2.2 Entzündungsreaktion	S. 2-4 - S. 2-13
2.2.1 Oberflächenmoleküle	S. 2-4 - S. 2-9
2.2.1.1 Selektine	S. 2-4 - S. 2-5
2.2.1.2 Liganden	S. 2-5 - S. 2-6
2.2.1.3 Endotheliale Ig-ähnliche Proteine	S. 2-6
2.2.1.4 Leukozyten-Integrine	S. 2-7
2.2.1.5 Oberflächenmarker von Granulozyten	S. 2-8 - S. 2-9
2.2.2 Adhäsionskaskade	S. 2-9 - S. 2-11
2.2.3 Regulation der Adhäsionsmoleküle	S. 2-11 - S. 2-13
2.3 Zellbiologische Relevanz der Hypoxie	S. 2-14 - S. 2-16
2.3 Fragestellung	S. 2-17
3. Material und Methoden	S. 3-1 – S. 3-20
3.1 Methoden	S. 3-1 – S. 3-13
3.1.1 Granulozytenisolierung	S. 3-1 – S. 3-4
3.1.2 FACS-Analyse	S. 3-4 – S. 3-5
3.1.3 Zellkultur	S. 3-6 – S. 3-8
3.1.4 Interaktionsversuche	S. 3-8 – S. 3-12
3.1.4.1 Hypoxie	S. 3-8 – S. 3-9
3.1.4.2 Stimulation	S. 3-10
3.1.4.3 Interaktion	S. 3-10 – S. 3-12
3.1.5 Immunzytochemische Färbung	S. 3-12 – S. 3-13
3.1.6 Statistische Analyse	S. 3-13
3.2 Material	S. 3-14 – S. 3-18
3.2.1 Granulozytenisolierung	S. 3-14
3.2.2 FACS-Analyse	S. 3-15
3.2.3 Zellkultur	S. 3-16
3.2.4 Interaktionsversuche	S. 3-17
3.2.5 Immunzytochemische Färbung	S. 3-18

3.3 Lösungen	S. 3-19 – S. 3-20
3.3.1 Granulozytenisolierung	S. 3-19 – S. 3-20
3.3.2 FACS-Analyse	S. 3-20
4. Ergebnisse	S. 4-1 – S. 4-22
4.1 FACS-Analyse	S. 4-1 – S. 4-8
4.1.1 Vergleich der Isolationsmethoden	S. 4-1 – S. 4-4
4.1.2 Wahl des Antikoagulans	S. 4-4 – S. 4-6
4.1.3 Charakterisierung der Zellen im Isolat	S. 4-7 – S. 4-8
4.1.4 CD15- und CD16-Expression nach Stimulation	S. 4-8
4.2 Interaktionsversuche	S. 4-9 – S. 4-22
4.2.1 Versuchsreihe V1-6	S. 4-10 – S. 4-14
4.2.1.1 Granulozytenadhärenz	S. 4-10
4.2.1.2 Granulozytenadhärenz an Endothelzellen und Matrix	S. 4-11
4.2.1.3 Anteil der Endothelzellen, die eine Bindung eingehen	S. 4-11 – S. 4-12
4.2.1.4 Adhärenente Granulozyten pro Endothelzelle	S. 4-12 – S. 4-13
4.2.1.5 VWF-Expression	S. 4-13 – S. 4-14
4.2.2 Versuchsreihe V7-9	S. 4-15 – S. 4-18
4.2.2.1 Granulozytenadhärenz	S. 4-15 – S. 4-16
4.2.2.2 Granulozytenadhärenz an Endothelzellen und Matrix	S. 4-16
4.2.2.3 Anteil der Endothelzellen, die eine Bindung eingehen	S. 4-17
4.2.2.4 Adhärenente Granulozyten pro Endothelzelle	S. 4-17 – S. 4-18
4.2.2.5 VWF-Expression	S. 4-18
4.2.3 Versuchsreihe V10-12	S. 4-19 – S. 4-22
4.2.3.1 Granulozytenadhärenz	S. 4-19 – S. 4-20
4.2.3.2 Granulozytenadhärenz an Endothelzellen und Matrix	S. 4-20
4.2.3.3 Anteil der Endothelzellen, die eine Bindung eingehen	S. 4-21
4.2.3.4 Adhärenente Granulozyten pro Endothelzelle	S. 4-21 – S. 4-22
4.2.3.5 VWF-Expression	S. 4-22

5. Diskussion	S. 5-1 – S. 5-21
5.1 methodisch	S. 5-1 – S. 5-10
5.1.1 Isolationstechniken	S. 5-1 – S. 5-5
5.1.2 CD66b als Aktivationsmarker	S. 5-5 – S. 5-6
5.1.3 Verwendeter Zelltyp HDMEC	S. 5-6 – S. 5-7
5.1.4 Interaktionsmodelle	S. 5-7 – S. 5-8
5.1.5 fMLP als Stimulans	S. 5-8 – S. 5-9
5.1.6 Vorteile des verwendeten Modells	S. 5-9 – S. 5-10
5.2 thematisch	S. 5-11 – S. 5-18
5.2.1 Einfluss von Hypoxie auf die Adhäsion	S. 5-11 – S. 5-13
5.2.2 Einfluss von Reoxygenierung auf die Adhäsion	S. 5-13 – S. 5-14
5.2.3 Reaktionsfähigkeit der Neutrophilen	S. 5-15
5.2.4 Matrixadhäsion	S. 5-15 – S. 5-18
5.3 Ausblick	S. 5-19 – S. 5-21
6. Anhang (Statistische Auswertung)	S. 6-1 – S. 6-10
6.1 Versuchsreihe V1-6	S. 6-2 – S. 6-4
6.1.1 Granulozytenadhärenz	S. 6-2
6.1.2 Granulozytenadhärenz an Endothelzellen und Matrix	S. 6-2
6.1.3 Anteil der Endothelzellen, die eine Bindung eingehen	S. 6-3
6.1.4 Adhärenz Granulozyten pro Endothelzelle	S. 6-3
6.1.5 VWF-Expression	S. 6-4
6.2 Versuchsreihe V7-9	S. 6-5 – S. 6-7
6.2.1 Granulozytenadhärenz	S. 6-5
6.2.2 Granulozytenadhärenz an Endothelzellen und Matrix	S. 6-5
6.2.3 Anteil der Endothelzellen, die eine Bindung eingehen	S. 6-6
6.2.4 Adhärenz Granulozyten pro Endothelzelle	S. 6-6
6.2.5 VWF-Expression	S. 6-7
6.3 Versuchsreihe V10-12	S. 6-8 – S. 6-10
6.3.1 Granulozytenadhärenz	S. 6-8
6.3.2 Granulozytenadhärenz an Endothelzellen und Matrix	S. 6-8
6.3.3 Anteil der Endothelzellen, die eine Bindung eingehen	S. 6-9
6.3.4 Adhärenz Granulozyten pro Endothelzelle	S. 6-9
6.3.5 VWF-Expression	S. 6-10

7. Literaturverzeichnis	S. 7-1 – S. 7-10
8. Publikationen / Dank	
8.1 Publikationen	S. 8-1 – S. 8-2
8.2 Dank	S. 8-3 – S. 8-4
9. Lebenslauf	S. 9-1 – S. 9-2

Abkürzungen

ACD	Acid-Citrat-Dextrose
AFM	Rasterkraft-Mikroskop, <i>engl.: atomic force microscope</i>
AK	Antikörper
aPMN	alte PMN
ARDS	Schocklunge, <i>engl.: acute respiratory distress syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bez.	Bezeichnung
BSA	Rinderserumalbumin, <i>engl.: bovine serum albumin</i>
CCE	<i>engl.: counterflow centrifugal elutriation</i>
CD	<i>engl.: cluster of differentiation</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CS	<i>engl.: Chamber Slide</i>
Cy	Cyanin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzelle, <i>engl. endothelial cell</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, <i>engl.: ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FACS	Durchflusszytometrie, <i>engl.: fluorescence activated cell sorter</i>
FH	Ficoll-Hypaque
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
fMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
fPMN	frische PMN
FSC	<i>engl. forward scatter</i>
G	Gauge
GAR	<i>engl. goat anti-rabbit</i>
G-CSF	Granulozyten koloniestimulierender Faktor, <i>engl.: granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	Granulozyten und Monozyten koloniestimulierender Faktor, <i>engl.: granulocyte monocyte colony stimulating factor</i>
GF	Gesichtsfeld

Abkürzungen

GlyCAM-1	Glykosylierungsabhängiges Zelladhäsionsmolekül-1, <i>engl.: glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1</i>
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
GTP	G uanin t riphosphat
H	H ypoxie
H aPMN	h ypoxisches Endothel (5,5 h) + alte PMN
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen, <i>engl.: human dermal microvascular endothelial cells</i>
H fPMN	h ypoxisches Endothel (5,5 h) + frische PMN
HR	H ypoxie mit anschließender R eoxygenierung
HR _{3,5}	2,5 h H ypoxie + 1 h R eoxygenierung
HR _{4,5}	2,5 h H ypoxie + 2 h R eoxygenierung
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül, <i>engl.: intercellular adhesion molecules</i>
Ig	I mmunglobulin
IL	I nterleukin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HETES	<i>engl.: hydroxy-eicosatetraenoic acids</i>
HOCl	Hypochlorsäure
KCl	K alium c hlorid
K _{2,5}	K ontrollzeitpunkt nach 2,5 h
K _{2,5} aPMN	K ontrollzeitpunkt (2,5 h) + alte PMN
K _{2,5} fPMN	K ontrollzeitpunkt (2,5 h) + frische PMN
K _{4,5}	K ontrollzeitpunkt nach 4,5 h
K _{5,5} aPMN	K ontrollzeitpunkt (5,5 h) + alte PMN
K _{5,5} fPMN	K ontrollzeitpunkt (5,5 h) + frische PMN
LFA-1	L eukozyten F unktions-assoziertes A ntigen- 1
LTB ₄	L eukotrien B 4
MAdCAM-1	Mucosa-assoziertes Adhäsionsmolekül-1, <i>engl.: mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i>
MC	Mononukleare Zellen, <i>engl. mononuclear cells</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität, <i>engl. mean fluorescence intensity</i>

Abkürzungen

MODS	<i>engl.: multiple organ dysfunction syndrome</i>
MOV	M ultiorganversagen
NaCl	N atriumchlorid
N ₂	Stickstoff
p	p -Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit)
PAF	p lättchenaktivierenden F aktor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, <i>engl.: phosphate buffered saline</i>
PE	P hycoerythrin
PECAM-1	Thrombozyten-endotheliale Adhäsionsmolekül-1, <i>engl.: platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PMN	Polymorphkernige Zellen, <i>engl.: polymorphonuclear cells</i>
PP	P olypropylen
PSGL-1	P -Selektin G lykoprotein- L igand- 1
RBC	rote Blutzellen, <i>engl.: red blood cells</i>
rpm	Umdrehung pro Minute, <i>engl.: rotation per minute</i>
RT	R aumtemperatur
SIRS	S ystematisches inflammatorisches R espons- S yndrom
SLex	S ialyl- L ewis X
SSC	<i>engl.: sideward scatter</i>
Tab.	T abelle
TNF	T umornekrosefaktor
V	V ersuch
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1, <i>engl.: vascular cell adhesion molecule-1</i>
vWF	von W illebrand F aktor

Alle übrigen verwendeten Einheiten entsprechen dem Système International d'Unités (SI).

1. Zusammenfassung

1.1 In deutscher Sprache

Etablierung eines statischen in vitro-Modells zur Untersuchung der Auswirkungen von Hypoxie und Hypoxie/Reoxygenierung auf die Adhäsionsrate von neutrophilen Granulozyten an mikrovaskuläre Endothelzellen

Die verminderte Sauerstoffversorgung (Hypoxie) eines Gewebes kann durch die Interaktion von Granulozyten und Endothelzellen zur Schädigung des Gewebes und zur Funktionseinschränkung des Organs führen. Die Entzündungsreaktion kann sich allerdings auch im Körper ausbreiten (engl.: systemic inflammatory response syndrome = SIRS) und letztendlich das Multiorganversagen zur Folge haben, welches mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden ist.

Wir haben ein statisches in vitro-Interaktionsmodell entwickelt, welches der Untersuchung des Einflusses von Hypoxie und Reoxygenierung auf die Adhäsionsrate von neutrophilen Granulozyten (engl.: polymorphonuclear cells = PMN) an humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) dienen soll. Dazu wurden HDMEC gradueller Hypoxie (2,5 h) und unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten (1 h bzw. 2 h) ausgesetzt. Nach Interaktion mit zuvor isolierten PMN wurde durch Phasenkontrastmikroskopie die Anzahl der an Endothelzellen und Matrix adhären PMN bestimmt. Des Weiteren untersuchten wir die Auswirkung des PMN-Stimulans fMLP auf die Adhäsionsrate. Als Aktivationsmarker für die Endothelzellen diente die Expression des von Willebrand Faktors (vWF), während der Oberflächenmarker CD66b das Aktivationsniveaus der PMN angeben sollte. Dabei wurden FACS-Messungen sowie die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Es galt des Weiteren zu klären, ob eventuelle

1. Zusammenfassung

Effekte von Hypoxie und Reoxygenierung eher durch PMN oder durch Endothelzellen vermittelt werden.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Adhäsionsrate von PMN an Endothelzellen durch Hypoxie signifikant gesteigert werden konnte. Nach anschließender Reoxygenierung adhärten bedeutend weniger PMN. Dabei ist zu beachten, dass insgesamt weniger Endothelzellen Granulozyten banden und auch die Bindungskapazität der einzelnen Endothelzelle vermindert war. Die Untersuchung der Reaktionsfähigkeit der PMN während des Versuchsablaufs zeigte, dass die PMN auch nach längerer Ruhephase noch voll reaktionsfähig waren. FMLP führte in unserem Versuchsaufbau zu keiner bedeutenden Steigerung der Adhäsionsrate. Bezüglich der von uns verwendeten Aktivationsmarker zeigte sich, dass die Expression von vWF nach Hypoxie leicht anstieg, ein Trend, der sich nach der Reoxygenierung weiter fortsetzte. Der Oberflächenmarker CD66b wies zwar nach Aktivierung der PMN bei der FACS-Analyse eine verstärkte Expression auf, die allerdings stark variierte. Eine fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der Signale der CD66b-positiven PMN war ebenfalls nicht möglich.

Es ist uns gelungen, ein in vitro-Modell zu entwickeln, das bezüglich verwendeter Zelltypen, Stimulanzen sowie Hypoxie-, Reoxygenierungs- und Interaktionszeiten leicht modifizierbar ist, wobei die Effekte von Hypoxie und Reoxygenierung getrennt beobachtet werden können. Immunzytochemische Färbungen an den fertigen Präparaten sind problemlos möglich. Unsere Untersuchungen zeigen, dass Hypoxie zu einer Steigerung der Adhäsion von PMN an mikrovaskulären Endothelzellen führt. Die verminderte Adhäsion nach Reoxygenierung in unserem Versuchsaufbau weist auf eine Schädigung der Endothelzellen hin, wobei der Zellschaden von der Reoxygenierungszeit abhängig zu sein scheint. Die an der Matrix adhären PMN zeigen ebenfalls nach Hypoxie eine höhere Adhäsionsrate, während diese nach Reoxygenierung sank. Diese Effekte scheinen entweder durch den Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung selbst auf die Matrixproteine oder durch exozytierte Mediatoren vermittelt zu werden.

1.2 In englischer Sprache

Establishment of a static in vitro model to examine the effects of hypoxia and hypoxia/reoxygenation on the adhesion rate of neutrophile granulocytes to microvascular endothelial cells

Reduced oxygen supply (hypoxia) in tissue can lead to the damage of the tissue and to an impaired function of the organ, which is mediated by the interaction of granulocytes and endothelial cells. The inflammation can subsequently spread throughout the human body and ultimately lead to multi organ failure, which is associated with a high mortality rate.

We have developed a static in vitro interaction model in order to examine the influence of hypoxia and reoxygenation on the adhesion rate of polymorphonuclear cells (PMN) to human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC). HDMEC cultures were exposed to gradual hypoxia (2,5 h) and different reoxygenation periods (1 h and 2 h respectively). After an interaction period with previously isolated PMN the number of PMN adhering to the endothelial cells as well as to the cell matrix was determined by phase contrast microscopy. On top of that, we examined the influence of the PMN stimulant fMLP on the adhesion rate. As an activation marker for endothelial cells we chose von Willebrand Factor (vWF), whereas the surface marker CD66b was supposed to indicate the level of activation of PMN. FACS analysis as well as fluorescence microscopy were used. In addition, another goal was to clarify, whether possible effects of hypoxia and reoxygenation were initiated rather by PMN or by endothelial cells.

Our study showed, that hypoxia significantly increased the adhesion rate of PMN to endothelial cells. After reoxygenation the adhesion rate was noticeably decreased. It must be noted, that the ability as well as the capacity of the endothelial cells to bind PMN was reduced. Furthermore our study showed, that PMN remained fully functional throughout the experiments. In our experimental setup fMLP did not lead to an increased adhesion rate. As far as our activation markers are concerned, the expression of vWF

was slightly increased after hypoxia. This trend continued during reoxygenation. The surface marker CD66b showed an increased expression during FACS analysis after PMN activation. But the expression varied greatly. The quantification of the CD66b positive cells' signals using fluorescence microscopy was not possible.

We've succeeded in developing an in vitro model, which can be easily modified as far as the different types of cells used in the experiments, the stimulants as well as the times of hypoxia, reoxygenation und interaction are concerned. The effects of hypoxia and reoxygenation can be evaluated separately. Immunocytochemical staining can be applied to the fixed slides. Our studies have shown, that hypoxia leads to an increased adhesion rate of PMN to microvascular endothelial cells. The decreased adhesion after reoxygenation indicates damage done to the endothelial cells, which seems to be time-dependent. PMN adherent to the cell matrix also show an increased adhesion after hypoxia and a decreased adhesion after reoxygenation. These effects seem to either be mediated by hypoxia and reoxygenation themselves or by mediators released via exocytosis.

2. Einleitung

2.1 Klinische Relevanz der Hypoxie

Unter Ischämie versteht man die Verminderung oder die vollständige Unterbrechung der Durchblutung eines Gewebes. Auf Zellebene führt dies zu einer verminderten Sauerstoffversorgung, einem Zustand, der als Hypoxie bezeichnet wird. Ischämie und Ischämie mit nachfolgender Reperfusion eines Gewebes spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese mesenterialer, renaler und periphervaskulärer Erkrankungen sowie bei Myokardinfarkt, Insult und Transplantation.

Als extremes Ausmaß der Ischämie ist die systematische Ausbreitung einer Entzündungsreaktion im ganzen Körper anzusehen (SIRS), welche unterschiedliche Organe in Mitleidenschaft zieht und deren Funktion einschränkt (MODS). Letztendlich kann dieser Zustand im Multiorganversagen münden (MOV).

Das Multiorganversagen (MOV) wurde zum ersten Mal in den 70er Jahren als Syndrom erkannt, das als Folge von Schock oder Sepsis auftritt. Es handelt es sich dabei um das gleichzeitige oder rasche, sequentielle Versagen verschiedener vitaler Organsysteme. Unter dem sogenannten Multi-Organ-Dysfunktionssyndrom (MODS) versteht man die schwere Funktionseinschränkung dieser Organsysteme. Trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten ist die Prognose des MOV heutzutage immer noch schlecht. Folgende Mechanismen werden als ursächlich für das MOV angesehen (92):

Neben Pathogenen sind auch Ischämie und Gewebsdebris in der Lage, das unspezifische Immunsystem zu aktivieren, wobei v.a. Makrophagen eine zentrale Rolle spielen. Daraus resultiert die Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine und die sekundäre Aktivierung weiterer Kaskadensysteme (z.B. Gerinnung, Komplement- und Kallikrein-Kinin-System). Es werden allerdings auch antiinflammatorische Substanzen generiert, die nosokomialen Infektionen den Weg ebnen und letztendlich zur Ausbildung einer Sepsis führen können.

2. Einleitung

Ein weiterer bedeutender Faktor bei der Ausbildung des MOV stellt die eingeschränkte Sauerstoffversorgung peripherer Organe dar. Ursächlich hierfür kann neben pulmonalen Ursachen z.B. eine eingeschränkte Pumpfunktion des Herzens sein oder ein durch vasoaktive Mediatoren ausgelöster inadäquater Tonus der Gefäße von Mikro- und Makrozirkulation. Des Weiteren wird beim MOV auch häufig eine myokardiale Dysfunktion beobachtet, die wohl durch freigesetzte Mediatoren ausgelöst wird, welche ebenso wie der hypoxische Zellschaden selbst, einen negativen Einfluss auf die periphere Sauerstoffausschöpfung ausübt.

Des Weiteren wird angenommen, dass die Minderperfusion des Darms zu Zottennekrosen und nachfolgend zur Störung der Barrierefunktion der Darmmukosa führt. Daraus resultiert wahrscheinlich die Translokation von Bakterien bzw. deren Produkte oder Bestandteile in die Blutbahn oder das Lymphgefäßsystem.

Sowohl Nekrose, als auch Apoptose spielen beim MOV eine bedeutende Rolle. Während ungünstige Stoffwechselbedingungen zur Nekrose von Zellen führen, handelt es sich bei der Apoptose um den genetisch programmierten Zelltod. Der Apoptosemechanismus kann entweder rezeptorabhängig (z.B. für TNF) oder rezeptorunabhängig über Veränderungen des Redoxzustandes der Zelle ausgelöst werden (27, 71).

Klinisch kann sich das MOV an verschiedenen Organsystemen manifestieren (92). Bezüglich des Herz-Kreislaufsystems nimmt der periphere Widerstand stark ab. Es kann sich sogar eine Kardiomyopathie entwickeln. Auf hepatischer Ebene zeigen sich Zeichen der Organinsuffizienz wie z.B. eine Hyperbilirubinämie, Veränderungen der Plasmaproteine, eine verminderte Synthese von Gerinnungsfaktoren und ein Anstieg der Transaminasen, was bis zur hepatischen Enzephalopathie mit begleitendem Hirnödem führen kann. Wie bereits zuvor beschrieben kann es außerdem zum Verlust der Barrierefunktion des Darms kommen. Des Weiteren zeigt sich oft eine Immunparalyse auf unspezifischer sowie spezifischer Ebene, welche durch ein Überwiegen antiinflammatorischer Mediatoren ausgelöst wird. Proinflammatorische Mediatoren hingegen vermitteln oft eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), wobei meist die prokoagulatorische Komponente überwiegt. Häufig kommt es auch zum akuten Nierenversagen durch inadäquate Perfusion. Außerdem führt die generalisierte Entzündungsreaktion im Körper (SIRS) zur pulmonalen

2. Einleitung

Endothelschädigung. Anschließend tritt eine lokale Entzündungsreaktion auf, welche meist letztendlich zum ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) führt.

Als Protagonisten und unmittelbare Vermittler entzündlicher Zellschädigungen werden die neutrophilen Granulozyten angesehen. Neutrophile Granulozyten werden auch als polymorphkernige Zellen (PMN) bezeichnet und stellen mit 50-80% den größten Anteil der Leukozyten dar. Unaktivierte Granulozyten enthalten Transkripte aus mindestens 3000 Genen, was die Komplexität dieser Blutzellen unterstreicht (51). Als wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr phagozytieren sie Mikroorganismen oder Antigen-Antikörper-Komplexe und setzen eine Vielzahl von Enzymen sowie zahlreiche andere Substanzen frei, um Pathogene zu zerstören. Allerdings kann der Angriff der Neutrophilen im Rahmen einer Entzündungsreaktion auch gegen körpereigene Zellen gerichtet sein.

2.2 Entzündungsreaktion

Treten im menschlichen Körper eine Gewebeschädigung oder eine Ischämie auf, werden neutrophile Granulozyten als erste Zellfraktion zum Ort des Geschehens rekrutiert. Bevor sie aber zur Stelle der Entzündung vordringen und dort ihre physiologische Funktion erfüllen können, müssen sie zunächst mit den Endothelzellen in Kontakt treten und an diese binden. Diese Interaktion wird durch verschiedene Oberflächenmoleküle ermöglicht, die man in Selektine und ihre Liganden, endotheliale Ig-ähnliche Proteine sowie Leukozyten-Integrine einteilen kann. Diese Oberflächenmoleküle werden im Folgenden näher erläutert. Anschließend wird die Rolle von CD15, CD16 und CD66b als Oberflächenmarker von Granulozyten beschrieben.

2.2.1 Oberflächenmoleküle

2.2.1.1 Selektine

Die Selektine teilen einige strukturelle Gemeinsamkeiten und werden deshalb zu einer Familie zusammengefasst. P-Selektin (CD62P) und E-Selektin (CD62E) sind auf der Zelloberfläche von Endothelzellen zu finden, während es sich bei L-Selektin (CD62L) um ein rein leukozytenständiges Antigen handelt (14).

P-Selektin wird nach der Synthese in zytoplasmatischen Granula, den sogenannten Weibel-Pallade-Körperchen, gespeichert. Nach geeigneter Aktivierung einer Endothelzelle mit Substanzen wie Thrombin, Histamin oder Komplementfaktoren findet eine Fusion der Speichergranula mit der Zellmembran statt, woraus das Ausschleusen von P-Selektin an die Zelloberfläche resultiert (73). Neben P-Selektin wird auch der von Willebrand Faktor in den Weibel-Pallade-Körperchen gespeichert. Beim von Willebrand Faktor (vWF) handelt es sich um ein Glykoprotein, das zwei wichtige Aufgaben im

2. Einleitung

Rahmen der Hämostase erfüllt: zum einen vermittelt der vWF bei Gefäßläsionen die Adhäsion von Thrombozyten an subendotheliales Bindegewebe sowie die Adhäsion von Thrombozyten aneinander, und zum anderen stellt er den Träger von Faktor VIII im Plasma dar, wodurch dessen Halbwertszeit deutlich verlängert wird. Das Gen des vWFs wird lediglich von Megakaryozyten und Endothelzellen exprimiert (95).

Die Oberflächenexpression von P-Selektin ist schnell und transient. Der Peak tritt nach 10 min auf, und die Expression ist nach 20 bis 30 min wieder auf dem Ausgangsniveau, was zumindest teilweise auf Internalisierung beruht (38). Die Expression von P-Selektin kann auch länger anhalten, z.B. 4 h nach Stimulation mit Sauerstoffradikalen (85). Es wurde auch eine lösliche Form von P-Selektin beschrieben, wobei unklar ist, ob es sich dabei um von der Zelloberfläche abgestoßenes P-Selektin oder um eine sekretorische Form handelt. Somit ist es denkbar, dass löslichem P-Selektin eine immunmodulatorische Funktion zugeschrieben werden könnte (25).

E-Selektin zeigt eine relativ kurze Halbwertszeit an der Zelloberfläche, die wohl zumindest teilweise auf der Internalisierung des Proteins beruht (108). Die maximale Expression von E-Selektin liegt bei etwa 4 h und geht innerhalb von 24 h auf das Ausgangsniveau zurück, während im Blutstrom lösliches E-Selektin auch nach 24 h noch nachweisbar ist (14, 44).

L-Selektin wird nach Aktivierung der Neutrophilen höchstwahrscheinlich von der Zelloberfläche abgestoßen (sog. *shedding*), was durch proteolytische Spaltung nahe der Membranbindungsstelle geschieht. Es wurde beschrieben, dass lösliches L-Selektin in der Lage ist, die Adhäsion von Leukozyten an stimulierten Endothelzellen zu hemmen (99).

2.2.1.2 Liganden

Alle drei Selektine vermögen, an Sialyl-Lewis X (sLex) (CD15s) zu binden (29). Dabei handelt es sich um einen Kohlehydratliganden, der in großem Maße auf der Oberfläche von Neutrophilen und Monozyten exprimiert wird, aber auch auf natürlichen Killerzellen zu finden ist (77). Mehrere Strukturen auf der Oberfläche von Leukozyten sind mit sLex versehen und binden an E-Selektin, L-Selektin, CD66 und β 2-Integrine (54, 57, 88). P-

Selektin bindet ebenfalls an das neutrophilenständige L-Selektin (88). Der P-Selektin Glykoprotein-Ligand (PSGL-1) stellt eine weitere Bindungsstelle für P-Selektin dar (98), an die auch E-Selektin binden kann, da an PSGL-1 ebenfalls sLex zu finden ist (14).

Weitere bekannte Liganden für L-Selektin stellen das glykosylierungsabhängige Zelladhäsionsmolekül-1 (GlyCAM-1) sowie CD34 dar (103).

2.2.1.3 Endotheliale Ig-ähnliche Proteine

Fünf Mitglieder dieser Gen-Superfamilie der Ig-ähnlichen Proteine, die von Endothelzellen exprimiert werden, sind an der Adhäsion von Leukozyten beteiligt: ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), VCAM-1 (CD106), PECAM-1 (CD31) und MAdCAM-1. Die Affinität der Leukozyten für diese Bindungsstelle ist durch eine Abnahme des Grades der Glykosylierung steigerbar (23).

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) besitzt eine Bindungsstelle für CD11a/CD18 (LFA-1) (105) und eine für CD11b/CD18 (Mac-1) (23). Dabei handelt es sich um Integrine, die auf der Oberfläche von Leukozyten zu finden sind. ICAM-2 ist im Gegensatz zu ICAM-1 lediglich in der Lage, CD11a/CD18 zu binden (104).

Bei VCAM-1 handelt es sich um das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1. Die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 zeigt nach Induktion mit TNF- α einen Höhepunkt bei ca. 6 bzw. 12 h, und beide Proteine sind auch nach 72 h noch nachweisbar (14).

Das Thrombozyten-endotheliale Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1) ist konstitutiv auf der Oberfläche von Endothelzellen zu finden und wird auch von 95% der Granulozyten exprimiert. PECAM-1 ist im Gegensatz zu anderen Adhäsionsmolekülen an den interzellulären Kontaktstellen lokalisiert (100) und spielt wohl besonders bei der Transmigration der Granulozyten durch das Endothel eine Rolle.

MAdCAM-1 hat eine einzigartige Funktion, indem es in der Lage ist, sowohl $\alpha 4\beta 7$ -Integrine, als auch L-Selektin zu binden (8, 11).

2.2.1.4 Leukozyten-Integrine

Bei den Integrinen handelt es sich um Transmembranproteine an der Zelloberfläche, die eine Bindung an das Zytoskelett aufweisen und extrazelluläre Signale übertragen. Jedes Integrin besitzt sowohl α -, als auch β -Ketten (41). Fünf Mitglieder der Integrin-Familie sind an der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen beteiligt: die β 2-Integrine (CD11a/CD18, CD11b/CD18 und CD11c/CD18), das β 1-Integrin VLA-4 α (α 4 β 1, CD49d/CD29) und α 4 β 7.

Die β 2-Integrine kommen nur auf Leukozyten vor. Neutrophile Granulozyten exprimieren alle drei Untergruppen (1), wobei CD11c/CD18 bei der Adhäsion eine geringere Rolle spielt als CD11a/CD18 und CD11b/CD18. Die Oberflächenexpression der Integrine ist durch eine Vielzahl von Agonisten steigerbar. Dazu gehören u.a. fMLP, GM-CSF, C5a und TNF- α (14). Außerdem kann die Adhäsion von Neutrophilen via CD11b/CD18 durch die Bindung von Komplementfaktoren an der Oberfläche der Endothelzellen schnell induziert werden (72). Unter den Liganden für β -Integrine finden sich auch lösliche Proteine wie Fibrinogen und Komplementfaktoren (1), wodurch das Adhäsionsausmaß moduliert werden kann. So konnte gezeigt werden, dass Fibrinogen die Leukozytenadhärenz erhöht, indem es sowohl an CD11b/CD18 auf der Leukozytenseite, als auch an ICAM-1 auf Endothelzellen bindet (62).

Bei VLA-4 α (sehr spätes Antigen) handelt es sich um ein Protein, von dem man lange Zeit annahm, dass es innerhalb der Population der Granulozyten nur auf Eosinophilen und Basophilen exprimiert wird. Dennoch wird unter bestimmten Bedingungen auch von einer Beteiligung bei der Interaktion von Neutrophilen mit Endothelzellen berichtet. Ein bedeutender Ligand für VLA-4 α stellt VCAM-1 dar (91).

α 4 β 7 vermag MAdCAM-1 sowie nach Aktivierung VCAM-1 zu binden (14).

2.2.1.5 Oberflächenmarker von Granulozyten

Bei CD66b handelt es sich um einen Oberflächenmarker, der nur auf eosinophilen und neutrophilen Granulozyten zu finden ist. Er wird nach Aktivierung der Granulozyten verstärkt exprimiert.

Der Oberflächenmarker, der früher CD67 hieß und heute als CD66b bezeichnet wird, ist auch unter dem Namen nicht-spezifisches kreuzreagierendes Antigen 95 (NCA-95) bekannt. Dabei handelt es sich um ein Mitglied der menschlichen carcinoembryonalen Antigen (CEA)-Familie (106). Codiert wird CD66b vom CGM6-Gen, das ausschließlich von Eosinophilen und Neutrophilen exprimiert wird (26). Bei Neutrophilen wird CD66b v.a. in sekundären Granula innerhalb des Zytoplasmas gefunden und in geringeren Mengen auf der Plasmamembran (24). Werden Granulozyten aktiviert, findet rasch eine verstärkte Expression von CD66b statt, was wahrscheinlich auf die Freisetzung aus den intrazellulären Granula zurückzuführen ist (61). Die Aktivierung von Granulozyten kann auch durch die Querverbindung von CD66b-Oberflächenmolekülen, das sog. *cross-linking*, erreicht werden, wodurch z.B. die Produktion von Sauerstoffradikalen induziert wird (70). CD66b spielt wohl auch eine Rolle bei der Aktivierung und Migration von Neutrophilen, indem es die Adhäsionsaktivität von CD11b/18 reguliert (59). Untersuchungen mit G-CSF zeigen, dass die Expression von CD66b nach 30 min maximal und bis zu 4 h lang noch erhöht ist (21).

CD15 und CD16 sind wie CD66b Oberflächenmarker von Granulozyten. CD15 wird ebenfalls von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten exprimiert. CD16 hingegen ist auf der Oberfläche von neutrophilen und basophilen Granulozyten, nicht aber auf eosinophilen Granulozyten zu finden.

CD15s ist in der Lage, E-, L- und P-Selektin zu binden (siehe 2.2.1.2). Außerdem führt die Querverbindung von CD15 zur Bildung von Sauerstoffradikalen sowie zu einer verstärkten Expression von CD11b und CD66b (69).

Bei FcγRIIIb (CD16) handelt es sich um einen Rezeptor für die Fc-Region von IgG. Durch die Bindung an CD16 sind Immunkomplexe in der Lage, neutrophile Granulozyten zu aktivieren und somit Phagozytose, Degranulation sowie die Bildung von Sauerstoffradikalen zu veranlassen (113). Die homotypische oder heterotypische

Querverbindung von Fc γ -Rezeptoren führt ebenfalls zur Aktivierung (70). Nach Aktivierung zeigen Neutrophile durch Mobilisation aus intrazellulären Speichern eine verstärkte Oberflächenexpression von CD16. Allerdings wird CD16 auch durch proteolytische Spaltung von der Oberfläche abgestoßen. Folglich zeigt CD16 nach Stimulation *in vivo* sowie *in vitro* abhängig von den Reaktionsbedingungen ein heterogenes Expressionsmuster (107).

2.2.2 Adhäsionskaskade

Der erste Schritt der Adhäsionskaskade (Abb. 1) besteht in der lokalen Produktion von Mediatoren, was die initiale Aktivierung der Endothelzellen, die an das verletzte oder entzündete Gewebe angrenzen, zur Folge hat (114). Neutrophile Granulozyten befinden sich normalerweise im Blutstrom und haben keine Möglichkeit der aktiven Fortbewegung. Deshalb ist der initiale Kontakt mit der Wand des Blutgefäßes, d.h. den aktivierten Endothelzellen, größtenteils ein zufälliges Ereignis, das durch lokale Veränderungen der Flusseigenschaften des Blutes beeinflusst wird. Nach diesem initialen Kontakt, auch als *capture* oder *tethering* bezeichnet, wird das sogenannte „Rollen“ der Neutrophilen entlang der Endothelzellen beobachtet. Das Rollen (Primäradhäsion) tritt nur unter Flussbedingungen auf und beruht darauf, dass Schubkräfte auf den Granulozyt einwirken, der dabei ist, eine Bindung an die Endothelzelle aufzubauen (6). Diese Primäradhäsion wird v.a. durch Selektine vermittelt, wobei L-Selektin die Bindung von Neutrophilen an Endothelzellen initiiert (99). Die Bindung von neutrophilen Granulozyten an E-Selektin ist stärker als die an P-Selektin (63). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Bindung an E-Selektin wohl die Initiierung der festen Sekundäradhäsion darstellt, was auch durch die verschiedenen zeitlichen Expressionsmaxima unterstrichen wird (siehe 2.2.1.1). Des Weiteren kann nach der Bindung von Neutrophilen an E-Selektin eine erhöhte Expression von CD11b/CD18 (68) sowie eine Aktivierung der Bindung von β 2-Integrinen an ICAM-1 festgestellt werden (101).

Der nächste Schritt der Adhäsionskaskade besteht neben der fortgeführten Aktivierung der Endothelzelle in der Aktivierung der Granulozyten durch Zytokine, Chemokine und

2. Einleitung

Chemoattraktanzien, die lokal produziert werden. Diese Mediatoren können entweder auf spezielle Adhäsionsproteine, Subpopulationen von Leukozyten oder unspezifisch wirken (siehe 2.2.3). Außerdem sind die Endothelzellen selbst in der Lage, die Aktivierung der Neutrophilen weiter zu erhöhen, indem sie entweder Gradienten löslicher Chemokine wie z.B. für IL-8 generieren oder durch die Oberflächenexpression von Mediatoren wie PAF (56). Ereignisse, die zu diesem Zeitpunkt der Leukozytenaktivierung stattfinden, stärken die Primäradhäsion und führen zur festen Sekundäradhäsion. Bei der Sekundäradhäsion ist v.a. die Bindung von Integrinen an endotheliale Ig-ähnliche Proteine von Bedeutung (44).

Der letzte Schritt der Adhäsionskaskade besteht in der fakultativen Transmigration der adhärennten Neutrophilen durch die Kontaktstellen aneinander grenzender Endothelzellen hindurch zunächst in die subendotheliale Matrix und letztendlich an den Ort der Gewebeschädigung oder Entzündung. Dazu bewegen sich die neutrophilen Granulozyten langsam über die Endothelzelloberfläche, bis sie auf eine Kontaktstelle stoßen und diese durchdringen. Das Bewegen der Granulozyten wird zum einen durch zyklische Ausbildung und Lösung von Integrin-Bindungen und zum anderen durch zytoskelettale Veränderungen vermittelt (40). Die Migration durch das subendotheliale Gewebe beinhaltet auch eine begrenzte Verdauung der vaskulären Basalmembran und von Matrixkomponenten. Dies geschieht wohl durch Serinproteinasen wie Cathepsin G, Elastase und Proteinase 3, die an der Oberfläche der wandernden Zelle exprimiert werden (83). Die Migration wird letztendlich durch eine Vielzahl chemotaktisch aktiver Substanzen gesteuert, die lokal produziert werden. Extravasierende Neutrophile vermögen selbst z.B. IL-8 zu produzieren (7), wodurch sie eine sekundäre Welle des Recruitments begünstigen können. An dem Vorgang der Transmigration sind v.a. PECAM-1 auf Seiten von Leukozyt und Endothelzelle (76) sowie Integrine der Leukozyten und Ig-ähnliche Proteine der Endothelzellen beteiligt (32). Nach vollzogener Phagozytose an der Stelle der Gewebsschädigung wird bei den Neutrophilen durch Veränderungen der Genexpression wahrscheinlich ein Apoptoseprogramm in die Wege geleitet (51). Sie sterben durch programmierten Zelltod und werden durch Makrophagen beseitigt (37).

2. Einleitung

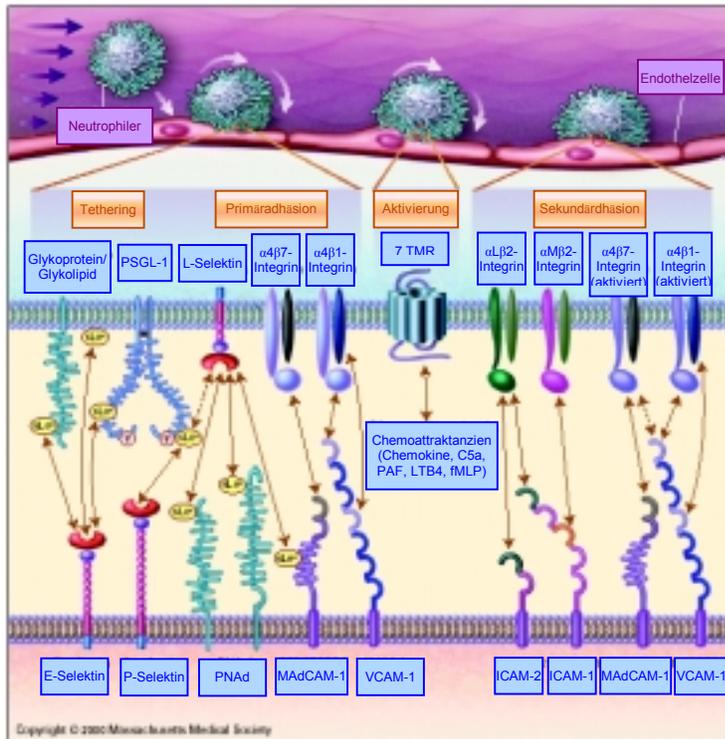


Abb. 1: Adhäsionskaskade mit beteiligten Oberflächenmolekülen (entnommen aus N Engl J Med 343: 1020-1034 (2000), modifiziert)

2.2.3 Regulation der Adhäsionsmoleküle

Die Regulation der endothelialen und leukozytären Adhäsionsmoleküle umfasst sowohl quantitative Veränderungen der Oberflächenexpression, als auch qualitative Veränderungen der Affinität. Auf endothelialer Seite herrschen quantitative Veränderungen vor, obwohl auch qualitative Veränderungen beschrieben wurden (23). Eine Triade von Agentien wie IL-1, TNF- α und Thrombin stimulieren die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin, was scheinbar zum größten Teil aus einer verstärkten transkriptionalen Regulation resultiert (12). Es gibt allerdings auch Agenzien, die nur die Expression einzelner Oberflächenantigene erhöhen, während andere davon unbeeinflusst bleiben. Als Beispiel wäre Interferon γ anzuführen, das lediglich die

2. Einleitung

Expression von ICAM-1 erhöht (14). Einige Zytokine wiederum hemmen die Expression von Oberflächenmarkern, so z.B. reduziert die Kombination von IL-1 und IL-4 selektiv die Primäradhäsion (44). Auch das von Endothelzellen produzierte Stickstoffmonoxid (NO) ist in der Lage, die Adhäsionsrate von Neutrophilen zu drosseln (55).

Auf leukozytärer Seite scheinen bei der Regulation der Adhäsionsmoleküle im Gegensatz zu den Endothelzellen weniger die quantitativen Veränderungen, als vielmehr die qualitativen Modifikationen im Vordergrund zu stehen. Die Aktivierung eines Phagozyten bewirkt die schnelle Translokation von CD11b/CD18 und CD11c/CD18 aus intrazellulären Speichern in die Plasmamembran (14). Die meisten Stimuli, die eine verstärkte Expression von CD11b/CD18 bei Neutrophilen induzieren, führen auch zu einem schnellen, begleitenden Abfall des L-Selektins an der Leukozytenoberfläche (45). Diese Vorgänge vollziehen sich innerhalb von wenigen Minuten. Zusätzlich zu diesen schnell ausgeführten Anpassungen auf Seiten der Integrinrezeptoren können sich quantitative Veränderungen auch noch nach Stunden bis Tagen vollziehen, was auf längerer Stimulation beruht (102).

Qualitative Veränderungen der Rezeptoraffinität spielen, wie bereits erwähnt, eine zentrale Rolle bei der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen. Die Integrin-Rezeptoren sind normalerweise auf zirkulierenden Leukozyten in einem inaktiven Zustand oder von geringer Bindungsavidität, so dass sie nicht oder nur in geringem Maße an die korrespondierenden Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen binden. Tritt eine adäquate Aktivierung des Leukozyten auf, wird der Rezeptor durch Konformationsänderung in einen aktiven Zustand überführt, der seine Liganden auf den Endothelzellen rasch bindet. Dies beruht entweder auf einer erhöhten Affinität des Rezeptors selbst oder z.B. auf einer Änderung des Zytoskeletts (34). Diese Überführung des Integrin-Rezeptor in einen Zustand vermehrter Bindungsavidität kann durch eine Vielzahl von Mechanismen moduliert werden, so z.B. durch die Bindung von Chemoattraktanzien wie den chemotaktischen Faktor N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP).

fMLP ist ein Produkt ins Gewebe eingewanderter Bakterien. Der korrespondierende Rezeptor besteht aus sieben Transmembrandomänen. Nachdem die Bindung von fMLP stattgefunden hat, schließt sich eine Reaktionskaskade an, die letztendlich zur Aktivierung der Neutrophilen führt (33). Anschließend findet die schnelle

2. Einleitung

Phosphorylierung von Proteinen statt. Phosphorylierungen sind von essentieller Bedeutung bei der Regulierung zahlreicher Zellfunktionen. Auf molekularer Ebene sind Veränderungen bereits nach 5-10 s festzustellen und dauern mindestens 10 min an (19). Außerdem spielt Calcium bei der fMLP-induzierten Aktivierung eine zentrale Rolle: zum einen findet eine Mobilisierung aus intrazellulären Speichern statt, und zum anderen wird ein Influx von extrazellulärem Calcium induziert (19, 20). Zur Familie der G-Protein-gebundenen Rezeptoren gehören neben der fMLP-Bindungsstelle z.B. auch Rezeptoren für IL-8 oder PAF, was vermuten lässt, dass verschiedene Aktivierungssignale auf der Zelloberfläche in gemeinsame Wege der Aktivierung von Leukozyten münden (33).

Für die Funktion der Leukozyten ist es allerdings von ebenso großer Bedeutung, die Integrine auch wieder in einen Zustand geringer Avidität zu überführen, da so die Migration ins Gewebe verhindert wird (58). Eine antiinflammatorische Wirkung besitzen z.B. IL-10 und IL-13, die zum einen proinflammatorische Mediatoren supprimieren und zum anderen die Expression von Adhäsionsmoleküle senken. Sie entfalten ihre Wirkung, indem sie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB behindern (65).

2.3 Zellbiologische Relevanz der Hypoxie

Ischämie stellt einen Zustand in vivo dar, bei dem die Durchblutung eines Gewebes vermindert oder ganz aufgehoben ist. Die Sauerstoffkonzentration im betroffenen Zellverband ist folglich stark vermindert. Dieser Zustand wird als Hypoxie bezeichnet. Das Recruitment von Neutrophilen in ein ischämisches oder reperfundiertes Gewebe ist hauptsächlich abhängig von chemotaktischen Faktoren, die an der verletzten Stelle freigesetzt werden (5). Zu diesen endogenen Substanzen, die als Chemoattraktanzien fungieren, und deren Freisetzung aus ischämischen Organen nachgewiesen wurde, gehören z.B. Komplementfaktoren wie C5a (49), der Thrombozyten-aktivierende Faktor PAF (50), mehrere Lipoxygenaseprodukte wie Leukotrien B₄ oder HETES, die vor allem von bereits entzündeten Zellen produziert werden (31), einige Cyclooxygenaseprodukte (47) und Chemokine wie Interleukin-8 (60). Allerdings scheint der Zeitpunkt der Sekretion dieser verschiedenen Aktivatoren abhängig von der Hypoxiedauer zu sein. So kann z.B. das Prostanoid PGF₂α als Mediator des frühen Recruitment Neutrophiler an ischämischen Organen angesehen werden (Hypoxiedauer 2 h), während Chemokine wie IL-8 erst nach 6 h Hypoxie eine verstärkte Synthese zeigen (5, 46).

Innerhalb von Minuten nach Einsetzen der Reperfusion produzieren die Endothelzellen außerdem weniger Stickstoffmonoxid (NO), was in Zusammenhang stehen soll mit der Produktion von Superoxidradikalen durch Neutrophile. Bei NO handelt es sich nicht nur um einen potenten Vasodilatator, sondern auch um eine Substanz, die in der Lage ist, über eine verstärkte Expression von Oberflächenmolekülen auf Endothelzellen die Adhäsionsrate von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen zu modulieren. So ist innerhalb von 20 min bereits eine verstärkte Adhärenzrate von Neutrophilen zu verzeichnen (64). Des weiteren handelt es sich bei NO auch um einen Radikalfänger für Superoxidanionen (48).

Durch Änderung der Sauerstoffkonzentration während der Ischämie kann die Interaktion von Granulozyten mit Endothelzellen moduliert werden. Endothelzellen, die hypoxischen Bedingungen ausgesetzt wurden, befinden sich in einem aktivierten Zustand und synthetisieren große Mengen von Prostaglandinen und PAF (74). Die Bindungsaffinität

2. Einleitung

der Neutrophilen erhöht sich (90), was zumindest teilweise von der durch Hypoxie induzierten PAF-Synthese abhängig ist. Auf molekularer Ebene ist die Expressionsdauer der Adhäsionsmoleküle verlängert. So ist die Expression von P-Selektin z.B. nach 90 min Hypoxie maximal und auch nach 4 h noch erhöht. Nach Reoxygenierung ist sogar noch eine drastische Steigerung der Expression von P-Selektin feststellbar mit einem Peak nach 60 min Reoxygenierung (17). Untersuchungen bezüglich des Adhäsionsverhaltens von Neutrophilen an Endothelzellen, die nach Hypoxie reoxygeniert wurden, weisen auf eine frühe und eine späte Phase verstärkter Adhäsion hin. ICAM-1 und P-Selektin vermitteln den ersten Peak nach 30 min Reoxygenierung, während P-Selektin und E-Selektin beim zweiten Peak nach 240 min von großer Bedeutung sind. ICAM-1 befindet sich auch beim zweiten Peak noch in erhöhter Konzentration auf der Oberfläche (42). Ursache dieser biphasisch verstärkten Adhäsion scheint ein Verlust der Redoxbalance, d.h. des Verhältnisses von oxidiertem Gluthation (GSSG) zu Gluthation (GSH) zu sein. Die frühe Phase korreliert invers mit dem GSH-Level, während die späte Phase positiv mit dem Verhältnis GSSG/GSH korreliert (52). Ischämie/Reperfusion leert also anscheinend den Gewebepool an GSH und führt folglich zu einem Anstieg von GSSG. Dadurch werden die Zellen in höherem Maße oxidiert, was den Redox-Status verändert und so wohl eine Vielzahl von metabolischen Prozessen wie z.B. ganze Enzymsysteme beeinflusst (53). Der erhöhte Quotient GSSG/GSH scheint eine transkriptionsabhängige Erhöhung von Adhäsionsmolekülen zu bewirken (52).

Neutrophile, die an hypoxischem Endothel gebunden sind, werden aktiviert und sezernieren LTB₄ und Superoxidanionen (3). Bei freien Sauerstoffradikalen handelt es sich um Moleküle mit einer ungepaarten Anzahl von Elektronen in der äußeren Schale. Diese Moleküle reagieren sehr stark mit stabilen Molekülen, denen sie Elektronen entziehen. Dabei bringen sie oft weitere freie Radikale hervor. An Zellmembranen bewirken sie eine erhöhte Permeabilität und letztendlich den Zelltod. Die drei Haupttypen der Sauerstoffradikale sind Superoxid (O₂⁻), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und das Hydroxyl-Radikal (OH⁻). Die Gewebeschädigung, die durch aktivierte Granulozyten induziert wird, kann zum Teil auf freie Sauerstoffradikale zurückgeführt werden. H₂O₂ wird durch die Myeloperoxidase der Neutrophilen zu HoCl umgewandelt. Dabei handelt es sich um das toxischste Oxidans, das während der neutrophilen Entzündung generiert

2. Einleitung

wird. Diese Substanz bewirkt durch zwei verschiedene Mechanismen eine Gewebeschädigung. HoCl kann zum einen mit Gewebezellen reagieren und diese bis zur Nekrose schädigen. Zum anderen inaktiviert HoCl Alpha-1-Antitrypsin, wobei es sich um den spezifischen Inhibitor der Elastase der neutrophilen Granulozyten handelt. Dadurch wird die unkontrollierte proteolytische Aktivität der Elastase selbst begünstigt (18). Ein weiterer Mechanismus der durch Neutrophile vermittelten Schädigung von Endothelzellen bedarf zusätzlich des endothelialen Zellapparats. Die von aktivierten Granulozyten freigesetzte Elastase dringt zunächst in die Endothelzelle ein und wandelt dann die Xanthindehydrogenase in Xanthinoxidase um (87). Bei der Umsetzung des Substrats Xanthin durch die Endothelzelle entstehen Superoxidanionen. Dadurch wiederum kann Fe^{3+} zum instabilen Fe^{2+} umgewandelt werden, das in der Lage ist, mit H_2O_2 zu reagieren. Dadurch kommt es zur Redox-Imbalance, wodurch Fe^{2+} wieder zu Fe^{3+} oxidiert und H_2O_2 zu HO reduziert wird, eine Substanz, die sehr zytotoxisch ist (66). Verschiedene Typen von Endothelzellen unterscheiden sich jedoch in ihrer Empfindlichkeit gegenüber aktivierten neutrophilen Granulozyten und damit verbundener Zellschädigung. Dies steht wiederum in Zusammenhang mit der NO-Produktion. Dermale Endothelzellen produzieren z.B. viel weniger NO als pulmonale Endothelzellen und sind folglich anfälliger für eine Schädigung durch aktivierten Neutrophilen (zur Rolle von NO s.o.) (78).

Endothelzellen können im Rahmen der Reoxygenierung auch unabhängig von Neutrophilen durch lösliche Mediatoren wie TNF- α und IL-1 geschädigt werden. Wie genau sich der Mechanismus der Zellschädigung vollzieht, ist noch nicht vollständig geklärt. Eisen sowie Cyclooxygenaseprodukte scheinen allerdings involviert zu sein. Die direkte Schädigung könnte durch Apoptoseinduktion vermittelt werden (93).

2.4 Fragestellung

Bisher existiert kein standardisiertes in vitro-Modell zur Untersuchung der Adhäsion von Granulozyten unter verschiedenen Reaktionsbedingungen. Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, ein Modell zu entwickeln, das vielseitig einsetzbar ist. Es sollte bezüglich der verwendeten Zelltypen und Stimulanzen sowie der Dauer von Hypoxie- bzw. Reoxygenierung leicht modifizierbar sein.

Des Weiteren analysierten wir die Aktivierung von Granulozyten durch den chemotaktischen Faktor fMLP. Dazu verwendeten wir den Oberflächenmarker CD66b und untersuchten, ob dieser zur Quantifizierung der Aktivierung geeignet ist. Dabei kamen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz: zum einen führten wir eine immunzytochemische Färbung von CD66b durch und zum anderen erfolgte eine FACS-Messung.

Da es sich bei der Adhäsion von Neutrophilen an Endothelzellen um eine Interaktion zweier Zellentypen handelt, sollte das Aktivitätsniveau der Endothelzellen ebenso untersucht werden. Dazu sollte die Untersuchung der Expression von vWF mittels immunzytochemischer Färbung dienen.

Im Mittelpunkt der Untersuchung stand allerdings die Auswirkung von Hypoxie bzw. von Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung auf die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen und ob eventuelle Effekte durch Endothelzellen oder Granulozyten vermittelt werden. Es galt, folgende Fragen zu beantworten:

- Ändert sich die Adhäsionsrate, wenn die Endothelzellen vor der Interaktion Hypoxie ausgesetzt waren?
- Hat eine Reoxygenierungsphase im Anschluss an die Hypoxie Einfluss auf die Adhäsionsrate?
- Ändert sich die Funktionalität der Neutrophilen im Verlauf des Versuchs?
- Hat fMLP einen Einfluss auf die Adhäsion?
- Unterscheiden sich Hypoxie und fMLP bezüglich ihrer Wirkung auf die Adhäsion?

3. Material und Methoden

3.1 Methoden

3.1.1 Granulozytenisolierung

Eine Isolierung von Granulozyten aus Vollblut ist erforderlich, da andere Blutbestandteile die Interaktion mit den Endothelzellen behindern könnten und da in der vorliegenden Arbeit lediglich das Verhalten der Granulozyten von Interesse ist.

Die Isolation der verwendeten Granulozyten erfolgte aus dem Vollblut eines gesunden Probanden. Zunächst wurde die zu punktierende Vene am Oberarm so wenig wie möglich gestaut, wodurch der mechanische Stress, der bei einer Blutentnahme auf die Granulozyten einwirkt und zu einer Aktivierung führen kann, verringert werden sollte. Die Blutabnahme erfolgte mit Hilfe eines Venofix® - Venenpunktionsbestecks mit einem Durchmesser von 21 G (0,8 mm). Die Durchflussrate betrug hierbei 25 ml/min und sollte ebenfalls zu einer schonenden Blutentnahme beitragen. Es wurden zwei Heparin-Monovetten mit einem Volumen von jeweils 4,7 ml entnommen.

Zur Isolierung der Granulozytenfraktion aus Vollblut verwendeten wir Polymorphprep™, das 13,8% (w/v) Natriumdiatrizoat sowie 8,0% (w/v) Dextran 500 enthält. Da polymorphkernige Leukozyten eine höhere Schwimmdichte aufweisen als mononukleäre Zellen, ist durch Dichtegradientenzentrifugation eine Auftrennung in zwei verschiedene Banden möglich. Zunächst wurden 5 ml Polymorphprep™ mit einer Plastikpipette in ein 12 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Danach folgte das vorsichtige Pipettieren von 5 ml des entnommenen, antikoagulierten Vollbluts entlang des Gefäßrandes direkt an die Oberfläche des Trennmediums. Dies sollte langsam geschehen, um eine Vermischung der beiden Flüssigkeiten zu verhindern. Durch die sich nun anschließende Zentrifugation (1700 rpm, 30 min, 20°C) in einem Ausschwingrotor, wobei die Bremse ausgeschaltet wurde, erfolgte die Aufteilung des

3. Material und Methoden

Vollblutes in drei Zellfraktionen: mononukleäre Zellen (MC), polymorphkernige Zellen (PMN) sowie Erythrozyten. Durch die hohe Osmolalität von Polymorphprep™, die bei ca. 445 mOsm liegt, diffundiert Wasser aus den Erythrozyten ins Medium, so dass diese schrumpften und sich ihre effektive Schwimmdichte erhöhte. Folglich sedimentierten die durch das enthaltene Dextran aggregierten Erythrozyten durch das dichte Medium ($\rho=1,113 \text{ g/ml}$). Der osmotische Gradient zwischen Erythrozyten und Trennmedium wurde während der Sedimentation aufgrund des Osmolalitätsausgleichs immer geringer, da der Wasserverlust der Erythrozyten anfänglich am größten war und immer geringer wurde, je weiter die Erythrozyten sedimentierten. Folglich bildete sich ein Dichtegradient aus. Die PMNs bildeten innerhalb dieses Dichtegradienten eine Bande aus, während die MCs an der Interphase zwischen dem Überstand, der aus Plasma bestand, und Trennmedium verblieben.

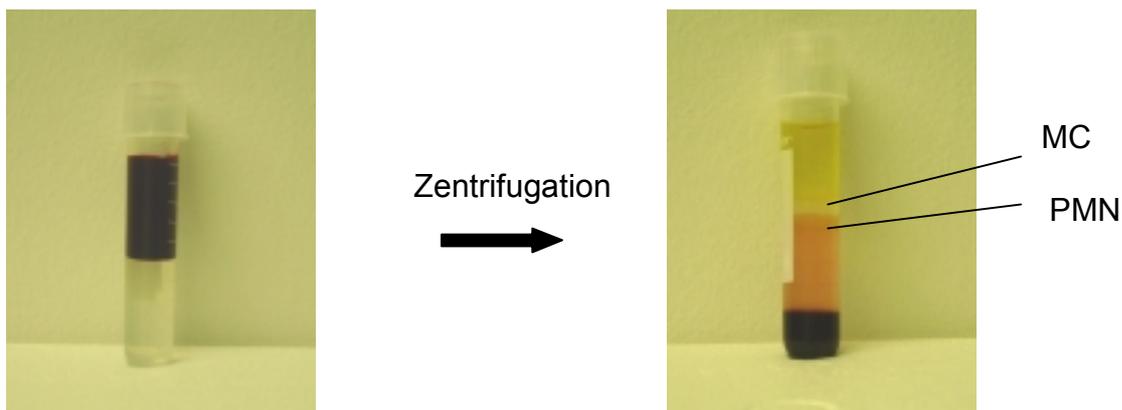


Abb. 3.1.1.1a PMN-Isolation mit Polymorphprep™

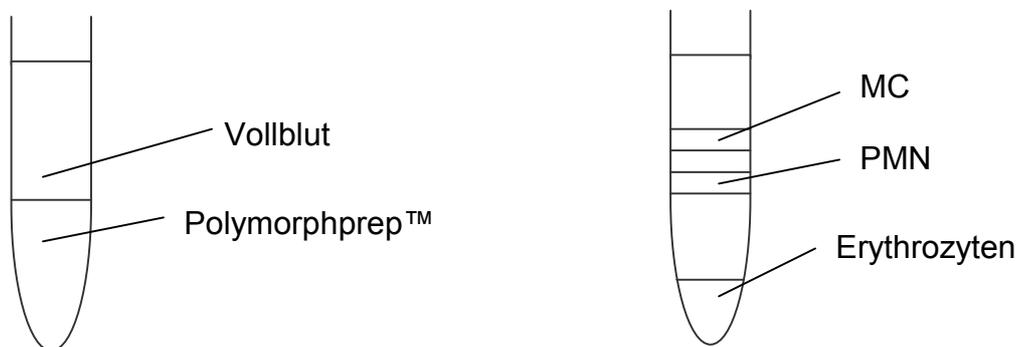


Abb. 3.1.1.1b schematische Darstellung

3. Material und Methoden

Die PMN-Bande wurde mit einer Pasteur-Pipette gewonnen und in ein weiteres 12 ml Reaktionsgefäß überführt, nachdem der Überstand sowie die MC-Bande abpipettiert wurden. Zu den PMNs wurde ein gleiches Volumen 0,45% NaCl sowie 0,5 ml 0,9% NaCl gegeben. Dann folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (1500 rpm, 10 min, 20°C), der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,45% NaCl resuspendiert. Die sich dann anschließende Zentrifugation erfolgte ebenfalls bei 1500 rpm (10 min, 20°C). Auch danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet letztendlich in 0,5 ml PBS resuspendiert.

Beim Umgang mit Polymorphprep™ ist zu beachten, dass dieser bei Raumtemperatur (18-22°C) gelagert werden muss und dass dieser Temperaturbereich auch bei der Versuchsdurchführung eingehalten wird, da Temperaturveränderungen sowohl Dichte als auch Viskosität des Trennmediums beeinflussen.

Bei der Granulozyten-Isolation mit Lymphoprep™ wurde zunächst mit Heparin antikoaguliertes Vollblut mit 1 ml ACD sowie 1,2 ml Macrodex vermischt. Anschließend folgte eine Sedimentation (45 min) bei Raumtemperatur, bei der sich die Erythrozyten genau wie bei Polymorphprep™ am Boden des Reaktionsgefäßes absetzten. Die Oberphase wurde abgenommen, mit kaltem PBS / 1 mM EDTA auf 8 ml verdünnt und anschließend 10 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in kaltem PBS / 1 mM EDTA resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 1250 rpm, 4°C). Danach wurde eine Lyse der verbliebenen Erythrozyten durchgeführt, indem das Pellet in 9 ml kaltem H₂O_{dd} resuspendiert wurde. Nach 1 min wurde die Lyse durch Zugabe von 3 ml 0,6 M KCl abgestoppt und wiederholt, falls die Zellsuspension noch immer rötlich verfärbt war, sich also weiterhin Erythrozyten darin befanden. Danach wurde die Zellsuspension 10 min bei 1250 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml PBS / 1 mM EDTA (Raumtemperatur) aufgenommen. Anschließend wurden 5 ml Lymphoprep™ vorsichtig mit dieser Suspension überschichtet, ohne dass eine Vermischung der beiden Phasen stattfand. Durch Zentrifugation (20 min, 1800 rpm, 20°C) des Gradienten im Ausschwingrotor bildete sich ein PMN-Pellet, das in 0,5 ml PBS aufgenommen wurde. Wichtig bei diesem Schritt ist, dass die Bremse der Zentrifuge komplett ausgeschaltet ist, da sonst eine Vermischung der verschiedenen Phasen stattfindet. Im Anschluss an die Isolation wurde eine Vitalitätsprüfung der Granulozyten mit Trypanblau durchgeführt, indem 10 µl Trypanblaulösung zu 10 µl Isolat pipettiert

wurden, das zuvor 1:20 mit PBS verdünnt worden war. Nach wenigen Minuten wurde die Zellsuspension dann mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, wobei blau angefärbte Granulozyten als tot gewertet wurden, da Trypanblau durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol eindringt.

3.1.2 FACS-Analyse

Ziel der FACS-Untersuchungen war es zum einen, festzulegen, welches Antikoagulans im Rahmen der Granulozytenisolation zu verwenden war, und andererseits sollten die FACS-Analysen uns bei der Wahl der zu verwendenden Isolationsmethode behilflich sein. Außerdem sollten die Zellen, die sich in dem Isolat befanden, anhand ihrer Oberflächenmoleküle näher charakterisiert werden und das Verhalten dieser Antigene bei Stimulation der Granulozyten untersucht werden.

Bei den durchgeführten FACS-Analysen wurde entweder mit Heparin, EDTA oder Citrat antikoaguliertes Vollblut oder PMN-Isolat verwendet. Das PMN-Isolat wurde wie unter 3.1.1 beschrieben entweder mit Polymorphprep™ oder mit Lymphoprep™ gewonnen.

Unabhängig davon, ob bei den FACS-Analysen eine Probe in Form von Vollblut oder Isolat untersucht wurde, gestaltete sich die Immunfärbung immer gleich. Zunächst wurden 200 µl der Probe sowie 1 ml PBS in ein FACS-Röhrchen pipettiert und resuspendiert, woran sich ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur anschloss. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert.

Als Antikörper verwendeten wir CD15 (PE-konjugiert), CD16 (CyChrome™(=PE-Cy3)-konjugiert) und CD66b (FITC-konjugiert) (siehe Einleitung). Wir führten zum einen Färbungen mit jeweils nur einem Antikörper durch, zum anderen mit allen drei Antikörpern gleichzeitig. Außerdem verwendeten wir die entsprechenden Isotyp-Kontrollen zum Nullabgleich. Bei einer Isotyp-Kontrolle handelt es sich um einen zum jeweils verwendeten Antikörper korrespondierenden Antikörper des gleichen Isotyps, der aber nicht gegen ein spezifisches Oberflächenmolekül gerichtet ist. Hierdurch sollen unspezifische Bindungen des Antikörpers mit den Granulozyten abgesättigt werden, die vor allem auf den Fc-Rezeptoren der Granulozyten beruhen. Anschließend wird durch eine FACS-Messung der Isotyp-Kontrolle eine Schwelle

3. Material und Methoden

festgelegt, die sich knapp oberhalb der Signalstärke der Isotyp-Kontrolle befindet. Folglich ist ein Signal, das oberhalb dieser Schwelle liegt, auf spezifische Bindung an den eigentlich untersuchten Rezeptor zurückzuführen.

Jeder Ansatz, außer der Leerkontrolle, wurde mit je 2 µl des entsprechenden Antikörpers bzw. der Isotyp-Kontrolle 40 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die sich in der Probe befindlichen Erythrozyten durch Zugabe von 1 ml *FACS™ Lysing Solution* lysiert. Dieser Schritt wurde auch beim Isolat durchgeführt, um bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Nachdem die Probe gründlich resuspendiert wurde, folgte eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur. Es wurden 2 ml PBS hinzugefügt, resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 1500 rpm, RT). Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm, RT). Letztendlich folgte die Zellfixierung mit 1 ml *Cell Fix*. Die Proben wurden dann bis zur Analyse mit *FACScan* bei 4°C aufbewahrt. Bei mehreren Untersuchungen wurden die Zellen aus Vollblut oder Isolat zuvor stimuliert. Die Stimulation fand direkt statt, nachdem die Probe ins FACS-Röhrchen pipettiert wurde. Dies geschah entweder durch Zugabe von 2 µl fMLP (10^{-6} M) oder 10 µl H₂O₂ (1%) zu 198 bzw. 190 µl Probe mit anschließender Inkubation (15 min, 37°C). Danach wurde je 1ml PBS zu jeder Probe gegeben und diese zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert, bevor sich die Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper, Lyse und Zellfixierung anschloss, was dem Vorgehen bei unstimulierten Proben entsprach.

3.1.3 Zellkultur

Bei dem von uns für die Interaktionsversuche verwendeten Endothel handelt es sich um Monolayer von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC), die nach Herstellerprotokoll (PromoCell, Heidelberg) angesetzt und unter Standardkulturbedingungen (5% CO₂, 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert wurden.

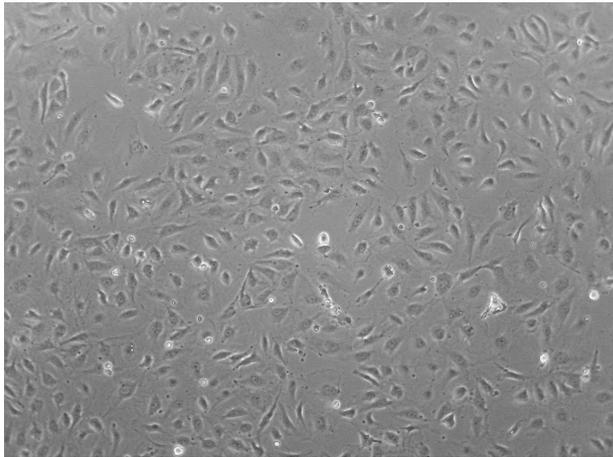


Abb. 3.1.3.1: HDMEC-Monolayer

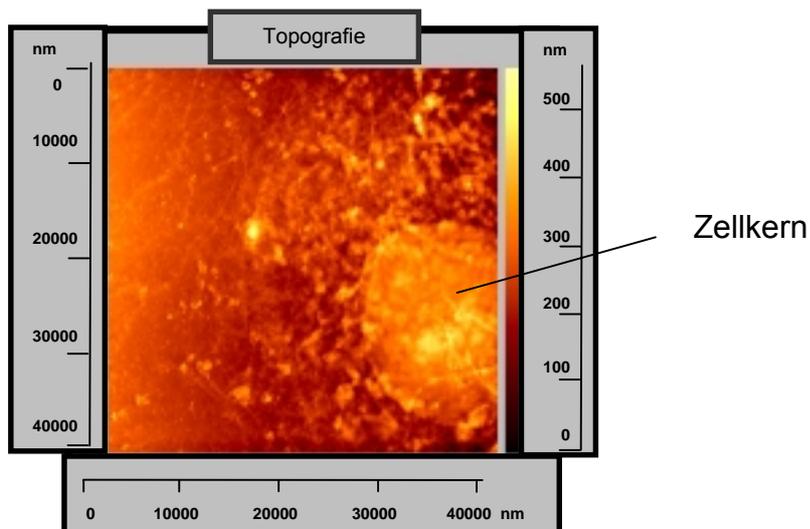


Abb. 3.1.3.2: AFM-Aufnahme einer Endothelzelle

3. Material und Methoden

Ein Mediumwechsel wurde zweimal wöchentlich durchgeführt. Das von uns benutzte Medium wurde vor Verwendung mit *Supplement Mix* ergänzt. Die im Folgenden verwendete Bezeichnung Medium bezieht sich jeweils auf komplettiertes Medium. Alle verwendeten Reagenzien wurden grundsätzlich vor Gebrauch auf 37°C erwärmt. Sobald in der Kulturflasche eine Konfluenz der Zellen von 80% erreicht war, wurde eine Unterkultivierung durchgeführt. Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Kulturflasche mit 10 ml sterilem PBS gespült, um zurückgebliebene Mediumreste zu entfernen. Dann wurden 5 ml Viralex-Trypsin / EDTA in die Kulturflasche gegeben, die 3 min im Brutschrank (37°C) verblieb. Durch mikroskopische Kontrolle wurde die Zellablösung überprüft und, wenn nötig, durch leichtes Beklopfen der Kulturflasche forciert. Die Zellsuspension wurde nun in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Kulturflasche wurde mit 5 ml Medium nachgespült, welches zur Suspension hinzupipettiert wurde. Danach folgte die Zentrifugation (1000 rpm, 3 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 8 ml Medium resuspendiert.

Bei der Durchführung sämtlicher Interaktionsversuche wurden *Chamber Slides* (CS) verwendet. Dabei handelt es sich um Objektträger mit zwei abgetrennten Kunststoffkammern und abnehmbarem Deckel. Der Kunststoffaufsatz wurde nach Beendigung der Interaktionsversuche mit Hilfe einer Hebelvorrichtung abgenommen, so dass man normale Objektträger erhielt. An diesen Interaktionspräparaten wurde anschließend die immunzytochemische Färbung vorgenommen.

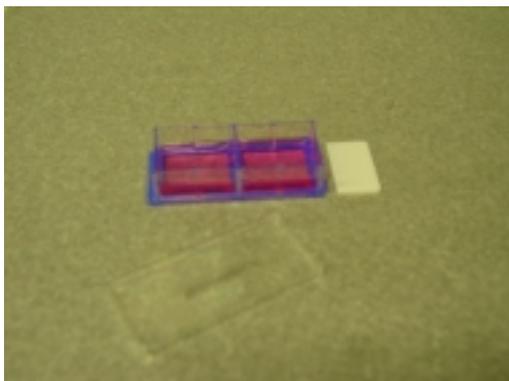


Abb. 3.1.3.1 Chamber Slides

In jede Kammer der *Chamber Slides* wurde 1 ml Medium vorgelegt und 350 µl Zellsuspension mit einer sterilen Einmal-Kunststoff-Pipette hinzugefügt. Der Rest der

Suspension wurde anschließend in eine Kulturflasche (75 cm²) pipettiert und mit Medium auf 10 ml aufgefüllt.

3.1.4 Interaktionsversuche

Die von uns durchgeführten Interaktionsversuche dienten der Untersuchung der Adhäsionsrate von Granulozyten an Endothelzellen unter verschiedenen Reaktionsbedingungen. Hierbei wurde zum einen der Einfluss von Hypoxie (H) bzw. Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung (HR) auf die Endothelzellen betrachtet und zum anderen mit fMLP stimulierte Granulozyten mit unstimulierten bezüglich ihres Interaktionsverhaltens verglichen.

3.1.4.1 Hypoxie

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde bei allen *Chamber Slides* ein Mediumwechsel durchgeführt. Eine *Chamber Slide* verblieb als Kontrolle (K_{2,5}) im Brutschrank, während drei in eine luftdichtverschlossene Hypoxiekammer überführt und mit einem Gasgemisch aus 95% N₂ und 5% CO₂ bei einer Durchflussrate von 1 l / min begast wurden.

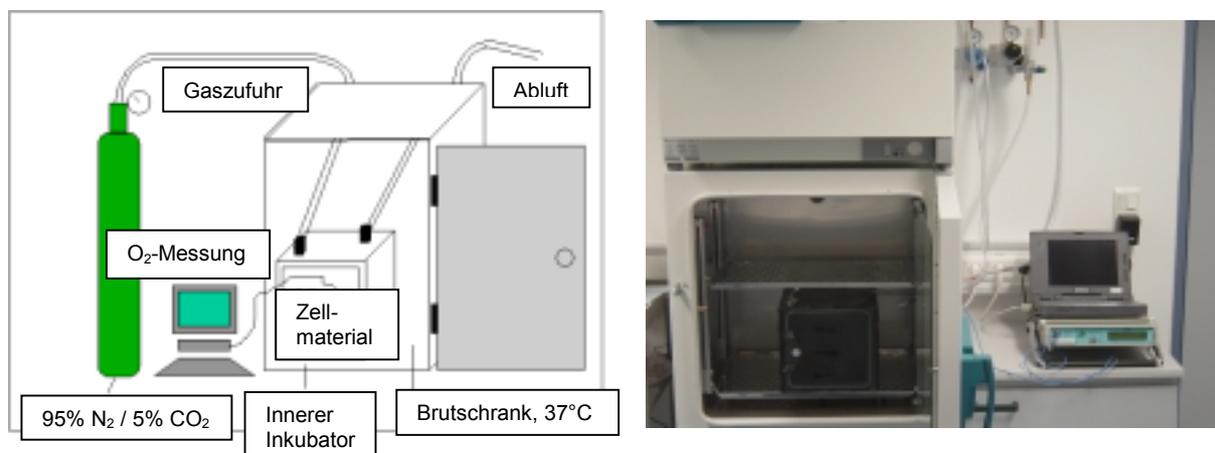


Abb. 3.1.4.1.1 schematische Darstellung der Hypoxiekammer und reelles Setup

3. Material und Methoden

Mit dem von uns verwendeten Versuchssetup wurde eine graduelle Hypoxie simuliert, wie sie z.B. bei einem Patienten vorliegt, der sich in einem Schockzustand befindet (siehe Abb. 3.1.4.2). Die drei *Chamber Slides* verblieben 2,5 h in der Hypoxiekammer ($H_{2,5}$). Die Zellen von zwei der *Chamber Slides* wurden zusätzlich zur Hypoxie noch 1 h ($HR_{3,5}$) bzw. 2 h ($HR_{4,5}$) im Brutschrank unter Standardbedingungen (Sauerstoffsättigung > 130 mmHg, 5% CO_2 , 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit) reoxygeniert, wo sich auch bis zum Interaktionsbeginn die *Chamber Slides* befanden, die als Kontrolle verwendet wurden ($K_{2,5}$).

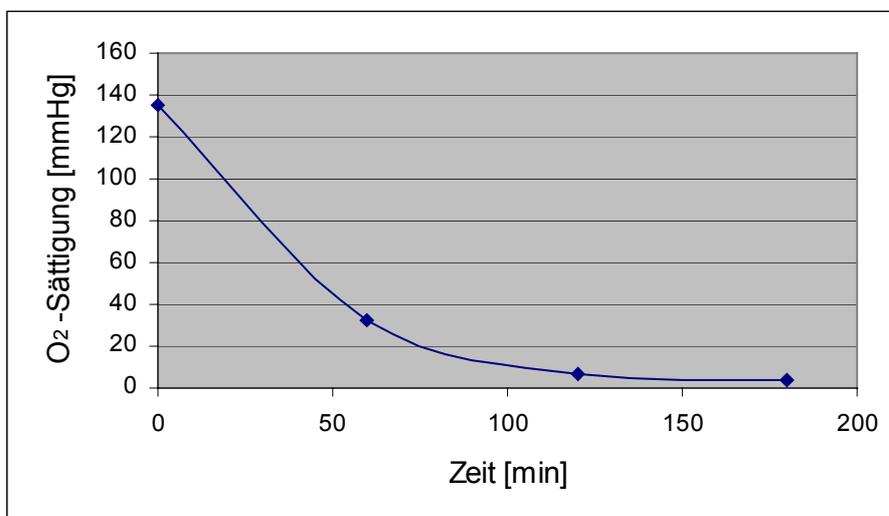


Abb. 3.1.4.1.2 O₂-Reduktion im Medium bei einem Gasdurchfluss von 1 l / min

Während der Hypoxie der HDMEC erfolgte die Isolation der Granulozyten wie unter 3.1.1 beschrieben. Das Auszählen der Zellzahl im Isolat erfolgte derart, dass ein Aliquot der PMN-Suspension mit einem Volumen von 2 μ l mit PBS 1:20 verdünnt wurde und davon jeweils 10 μ l gleichmäßig in jede der beiden Hälften einer Neubauer-Zählkammer pipettiert wurden. Unter dem Mikroskop wurde im Phasenkontrast eine Doppelbestimmung von jeweils zweimal 16 Feldern (= 1 Großquadrat) durchgeführt. Anschließend wurde das arithmetische Mittel der vier Großquadrate berechnet. Daraus ergab sich das pro CS-Kammer zu verwendende Volumen der PMN-Suspension, das in einem Endvolumen von 1 ml PBS 10^5 Granulozyten enthielt.

3.1.4.2 Stimulation

Bei den Interaktionsversuchen wurden sowohl unstimulierte, als auch stimulierte Granulozyten verwendet. Der zeitliche Ablauf der verschiedenen Versuchsreihen ist in Tab. 3.1.4.3 dargestellt. In die eine Kammer jeder *Chamber Slide* wurden unstimulierte und in die andere Kammer stimulierte Granulozyten pipettiert, so dass für jeden untersuchten Zeitpunkt für beide Granulozytenpopulationen Werte existieren.

Die Stimulation erfolgte durch das chemotaktische Peptid N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) (siehe Einleitung).

Die zu stimulierenden Granulozyten wurden 25 min lang mit einer 10^{-8} M Lösung von fMLP in DMSO bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Stimulation durch Lagerung auf Eis abgestoppt (5 min). Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 20°C) und das Pellet in 1 ml PBS pro Kammer resuspendiert.

3.1.4.3 Interaktion

Die Interaktionsversuche wurden mit allen vier *Chamber Slides* (K_{2,5}, H_{2,5}, HR_{3,5} und HR_{4,5}) durchgeführt (siehe Tab. 3.1.4.1). Zunächst wurde das Medium abgenommen und jeder Endothelzell-Monolayer mit 1 ml PBS gewaschen. Dann folgte die Zugabe von jeweils 10^5 Granulozyten in 1 ml PBS zu jeder Kammer. In eine Kammer jeder *Chamber Slide* wurden unstimulierte Granulozyten pipettiert und stimulierte in die andere. Die Interaktionsdauer mit dem Endothel betrug 15 min bei 37°C im Brutschrank. Danach wurde die Granulozyten-Suspension abgenommen und jede Kammer zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Nach horizontaler Fixierung mit 1 ml Methanol pro Kammer bei -20°C wurde der Kammeraufsatz abgenommen und die Objektträger luftgetrocknet, bevor sie letztendlich zur Lagerung in PBS-Glycerin eingedeckt wurden. Diese Versuchsreihe bestand aus sechs Einzelversuchen.

Zusätzlich zu diesen Interaktionsversuchen wurden noch zwei Kontrollversuchsreihen durchgeführt, um zu untersuchen, ob die verwendeten Granulozyten im Verlauf des Versuchs die gleiche Reaktionsfähigkeit besitzen. Zunächst wurde ein zweiter Kontrollzeitpunkt (K_{4,5}) am Ende des Versuchs eingeführt, also zeitgleich mit

3. Material und Methoden

HR_{4,5}, während der Beobachtungszeitpunkt HR_{3,5} entfiel. Die Versuchsdurchführung erfolgte ansonsten wie in den oben beschriebenen Interaktionsversuchen (siehe Tab. 3.1.4.3).

Bei der zweiten Kontrollversuchsreihe wurde zusätzlich zu den am Beginn des Versuchs isolierten Granulozyten (aPMN) eine weitere Isolation aus frisch abgenommenem, ebenfalls mit Heparin antikoaguliertem, Blut des gleichen Spenders durchgeführt (fPMN). Aufgrund der Zeit, die für die Isolation, die nachfolgende Auszählung der Zellzahl im Isolat, die Stimulation sowie die Interaktion (K_{2,5}) notwendig war, ergab sich eine Verlängerung der Hypoxiedauer von 2,5 h auf 5,5 h. Der erste Kontrollzeitpunkt lag allerdings auch bei diesen Versuchen bei 2,5 h. Zwei der verwendeten *Chamber Slides* wurden Hypoxie ausgesetzt, wovon eine mit bereits zu Versuchbeginn isolierten Granulozyten interagierende (H aPMN) und die andere mit denen, die unmittelbar vor Interaktionsbeginn isoliert wurden (H fPMN). Bei dieser Versuchsreihe fand nach der Hypoxie keine Reoxygenierung statt, allerdings wurde auch hier ein zweiter Kontrollzeitpunkt (K_{5,5}) angelegt, der am Ende der Hypoxie lag und ebenfalls in einer Interaktion von beiden Granulozytengruppen mit normoxisch (Sauerstoffsättigung > 130 mmHg) begastem Endothel bestand (K_{5,5} aPMN und K_{5,5} fPMN). Auch hier gestaltete sich der Versuchsablauf ansonsten analog zu den oben beschriebenen Interaktionsversuchen.

Tab. 3.1.4.3 Zeitschema der drei Versuchsreihen V1-6, V7-9 und V10-12 (Bez.=Bezeichnung)

Bez.	Zeit t						
	2,5h		3,5h	4,5h		5,5h	
V1-6	K _{2,5}	H _{2,5}	HR _{3,5}	HR _{4,5}			
V7-9	K _{2,5}	H _{2,5}		HR _{4,5}	K _{4,5}		
V10-12	K _{2,5}					H _{5,5} - aPMN - fPMN	K _{5,5} - aPMN - fPMN

Die Auswertung sämtlicher Interaktionsversuche erfolgte phasenkontrast-mikroskopisch bei 40-facher Vergrößerung. Es wurden 200 Gesichtsfelder pro Kammer im Live-Bild ausgezählt, wobei ein Gesichtsfeld einer Fläche von 214 µm x 168 µm entspricht. Dabei wurde zum einen festgestellt, wie viele Granulozyten sich auf dieser Fläche befanden und ob diese an Endothelzellen banden oder unspezifisch an der Matrix adhärten. Alle drei Versuchsreihen wurden hinsichtlich dieser Auswertungskriterien gleich ausgezählt.

3.1.5 Immunzytochemische Färbung

Bei der durchgeführten immunzytochemischen Färbung wurde zum einen der von Willebrand Faktor (vWF) und zum anderen das Oberflächenmolekül CD66b gefärbt (siehe Einleitung).

Zunächst wurden die zu färbenden Objektträger (*Chamber Slides* ohne Kammeraufsatz) mit einem Waschpuffer (PBS / 0,05% Tween) zweimal 5 min gewaschen. Der unmarkierte Primärantikörper war gegen vWF gerichtet (*rabbit anti-human*) und wurde in einer Verdünnung von 1:500 in PBS / 0,1% BSA verwendet. Die Inkubation mit 90 µl dieses Antikörpers pro Objektträger erfolgte in einer feuchten, vorgewärmten Kammer 15 min bei 37°C. Nachdem ungebundener Antikörper in einem Waschschrift (5 min in PBS / 0,05% Tween) entfernt wurde, folgte die Detektion mit Hilfe des mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 konjugierten Sekundärantikörpers (*goat anti-rabbit Cy3*) in einer Endverdünnung von 1:200 in PBS / 0,1% BSA (ebenfalls 15 min in feuchter Kammer bei 37°C), wobei auch ein Volumen von 90 µl pro Objektträger verwendet wurde. Nach einem erneuten Waschschrift von 5 min in PBS / 0,05% Tween schloss sich die Inkubation mit dem dritten, mit FITC direkt konjugierten Antikörper (*mouse anti-human CD66b*) an, was in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur geschah (40 min). Dieser Antikörper war gegen CD66b gerichtet und wurde mit einem Volumen von 90 µl pro Objektträger in einer Verdünnung von 1:45 in PBS / 0,1% BSA eingesetzt. Danach folgten drei Waschschriffe zu je 5 min in PBS / 0,05% Tween sowie jeweils 5 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70, 80, 96%). Die Objektträger wurden anschließend luftgetrocknet und in *Mounting Medium* / DAPI eingedeckt. DAPI dient

zur Gegenfärbung des Zellkernes und das Eindeckmedium dient der Stabilisierung der Fluoreszenzen.

Die Präparate wurden bei einer 1000-fachen Vergrößerung fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet, indem 200 Endothelzellen pro Kammer betrachtet wurden. Das Hauptaugenmerk lag auf der Endothelzelle und nicht auf den Granulozyten, so wie es bei der phasenkontrastmikroskopischen Auswertung der Interaktionsversuche der Fall war. Zunächst wurde der prozentuale Anteil vWF-positiver Zellen bestimmt. Es wurde weiterhin festgestellt, welcher Anteil der Endothelzellen eine Bindung zu Granulozyten einging. Außerdem wurde an diesen Präparaten die Anzahl der adhärennten Granulozyten pro Endothelzelle bestimmt.

3.1.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der phasenkontrastmikroskopischen Ergebnisse und der immunzytochemischen Färbung erfolgte mit dem t-Test für verbundene Stichproben. Alle Ergebnisse wurden als arithmetische Mittel mit Standardabweichung dargestellt. Die Ergebnisse wurden bei $p \leq 0,025$ als statistisch signifikant angesehen.

3.2 Material

Zur Durchführung der in 3.1 beschriebenen Experimente wurden folgende Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte verwendet:

3.2.1 Granulozytenisolierung

S-Monovette (LH-Gel, 4,7ml)	Sarstedt, 03.1631
Multiadapter für S-Monovette	Sarstedt, 14.1205
Venofix®	Braun, 4048083
Softasept	Braun, 3887138

Polymorphprep™	Axis-Shield, 1001971
NaCl	Roth, 3957.1
PBS (Dulbecco A)	Oxoid BR 0014 G
Citronensäure	Merck, 8.18707.1000
D-(+)-Glucose	Sigma, G-8270
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, 80431
FACS™ Lysing Solution	BD, 349202
fMLP	Sigma, F 3506
Formaldehyd (37 %)	Roth, 4979.1
H ₂ O ₂ (3%)	Fischar, 90275/1
KCl	Roth, 6781.1
Lymphoprep™	Axis-Shield, 1031966
Tri-Na-Citrat-Dihydrat	Roth, 3580.1
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Sigma, T8154

Pasteur-Pipetten	Roth, 4518
Plastikpipetten (5 ml)	Greiner Bio-one, Cellstar
Zentrifugationsröhrchen (14 ml, PP)	Greiner Bio-one, 187261
Zentrifuge (Rotina 48R, Ausschwingrotor)	Hettich

3.2.2 FACS-Analyse

Anti-CD15 (PE labeled anti-human CD15, isotype mouse IgM, κ, clone HI98)	BD Pharmingen, 555402
Anti-CD16 (CyChrome™ labeled anti-human CD16, isotype mouse IgG, κ, clone 3G8)	BD Pharmingen, 555408
Anti-CD66b (FITC labeled anti-human CD66b, isotype mouse IgM, κ, clone: G10F5)	BD Pharmingen, 555724
Isotyp-Kontrolle PE (mouse IgM, κ)	BD Pharmingen, 555584
Isotyp-Kontrolle CyChrome™ (mouse IgG1, κ)	BD Pharmingen, 555750
Isotyp-Kontrolle FITC (mouse IgM, κ)	BD Pharmingen, 555583

FACScan	BD
FACS-Röhrchen (Falcon polystyrene round-bottom tube, 5ml)	BD, 352054
S-Monovette (KE, 2,7 ml)	Sarstedt, 05.1167
S-Monovette (9 NC, 5 ml)	Sarstedt, 05.1071
Vortex	GLW L46
Zentrifugationsröhrchen (14 ml, PP, steril)	Greiner Bio-one, 187261
Zentrifugen	- Hermle, Z400K - Hettich, Rotina 48R mit Ausschwingrotor

2.2.3 Zellkultur

Endothelzellen (HDMEC-C)	Promocell, C-12210
Endothelial cell growth medium MV	Promocell, C-22020
Supplement Mix	Promocell, C 39225
Viralex-Trypsin/EDTA (1*)	PAA, L11-660

Chamber Slides (falcon culture slides, 2 chamber polystyrene vessel tissue culture treated glass slide)	BD, 354112
Zentrifugationsröhrchen (14 ml, PP, steril)	Greiner Bio-one, 187261

Brutschrank	Heraeus, BBD 6220
Sterilbank	Heraeus, Herasafe
Zentrifuge	Hermle, Z400K

2.2.4 Interaktionsversuche

DMSO	Roth, A994.1
fMLP	Sigma, F 3506
Glycerin	Roth, 3783.1
Methanol	Roth, 4627.2

Chamber Slides (2 chamber polystyrene vessel tissue culture treated glass slides)	BD, 354112
Reaktionsgefäße (1,5 ml, PP)	Roth, 4182.1
Zählkammer Neubauer (hell-linig)	Roth, T 734.1
Zentrifugationsröhrchen (14 ml, PP, steril)	Greiner Bio-one, 187261

Hypoxiekammer	Eigenkonstruktion (siehe 2.1.4.1)
Gas (95 % N ₂ , CO ₂ , zertifiziert)	Messer Griesheim
Sterilbank	Heraeus Herasafe
Brutschrank	- Heraeus, BBD 6220 - Heraeus, 37°C Inkubator
Zentrifuge	Hermle, Z400 K
Mikroskop	Zeiss, Axioskop 2 plus

Rasterkraft-Mikroskop (SIS Ultra Objektiv auf Axioskop 40)	Surface Imaging Systems SIS GmbH, D-Herzogenrath
--	--

2.2.5 Immunzytochemische Färbung

VWF-AK (factor VIII related antigen Ab-1 rabbit Pab)	Dianova, RB-281-A0
GAR (CY3-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ fragment goat anti-rabbit IgG (H+L))	Dianova, 111-166-045
Anti-CD 66b (FITC labeled anti-human, isotype mouse IgM, k, clone: G10F5)	BD Pharmingen, 555724

BSA	Roche, 238031
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitanmonolaurat)	Sigma, P-9416
Ethanol (min. 99,9% Vol.)	Berkel, Sorte 642
DAPI (vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI)	Vector, H-1200
Mounting Medium (vectashield mounting medium for fluorescence)	Vector, H-1000

Färbekästen (nach Hellendahl mit Erweiterung)	Roth, H550.1
Reaktionsgefäß (PP, 1,5 ml)	Roth, 4182.1
Mikroskop	Zeiss, Axioskop 2 plus
Fluoreszenzlampe	ebq 100 isolated
Fluoreszenzfilter	Zeiss: - 01 DAPI - 09 FITC - 15 Cy3 - 25 Simultan AHF: - 38 FITC bp

3.3 Lösungen

Bei der Herstellung der nachfolgend beschriebenen Lösungen wurde H₂O_{dd} (Reinstwasseranlage Arium 661, Sartorius (18,2 Megaohm)) verwendet. Die Sterilisation erfolgte mit einem Dampfsterilisator (Varioklav Typ 75s, Firma H+P).

3.3.1 Granulozytenisolierung

0,45% NaCl-Lösung:

1,8 g NaCl wurden in 400ml H₂O_{dd} gelöst und autoklaviert.

0,9% NaCl-Lösung:

3,6 g NaCl wurden in 400ml H₂O_{dd} gelöst und autoklaviert.

PBS:

Zur Herstellung von PBS wurden 4 Tabletten PBS (Oxoid) in 400 ml H₂O_{dd} gelöst und autoklaviert.

ACD:

ACD besteht aus:

Tri-Natrium-Citrat	0,2 M	⇒	2,94 g
Citronensäure	0,14 M	⇒	1,34 g
Glucose	0,22 M	⇒	1,98 g

Die abgewogenen Chemikalien wurden in 50 ml H₂O_{dd} gelöst, steril filtriert und fraktioniert zu je 10 ml bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

Macrodex:

Macrodex ist eine 6%-ige Lösung von Dextran 60 in 0,9% NaCl. Also wurden 6 g Dextran 60 in 100 ml 0,9% NaCl gelöst.

PBS / 1 mM EDTA:

1 mM EDTA entspricht einer Lösung von 0,37 g EDTA in 1 l. Es wurden folglich 0,07 g EDTA sowie 2 Tabletten PBS in 200 ml H₂O_{dd} gelöst und anschließend autoklaviert.

KCl:

Um eine 0,6%-ige Lösung von KCl zu erhalten, wurden 4,47 g KCl in 100 ml H₂O_{dd} gelöst und autoklaviert.

3.3.2 FACS-Analyse

FACS Lysing Solution:

Die Lysing Solution wurde vor Gebrauch 1:10 mit Aqua ad iniectabilia verdünnt.

Cell Fix:

Bei Cell Fix handelt es sich um eine 2,5%-ige Lösung von Formaldehyd (37%) in PBS.

fMLP:

Zunächst wurden 5 mg fMLP in 3 ml DMSO gelöst. Durch Zugabe von weiteren 8,4 ml DMSO entstand eine 10⁻³M Lösung. Davon wurde 1 µl entnommen und mit 999 µl DMSO verdünnt (10⁻⁶ M). Die letztendlich eingesetzte effektive Endverdünnung für fMLP als Stimulans lag bei 10⁻⁸ M. Die Aufbewahrung des fMLP erfolgte bei -20°C.

4. Ergebnisse

4.1 FACS-Analyse

Die FACS-Analysen wurden einerseits durchgeführt, um eine Isolationsmethode (4.1.1) sowie ein Antikoagulans auszuwählen (4.1.2) und andererseits, um die Zellen im Isolat zu charakterisieren (4.1.3). Des Weiteren wurde mit dieser Methode die Expression von CD15 und CD16 nach Stimulation untersucht (4.1.4).

4.1.1 Vergleich der Isolationsmethoden

Zur Isolation von Granulozyten wurden zunächst zwei verschiedene Methoden gewählt: zum einen Dextran-Sedimentation mit anschließender Lyse von Erythrozyten und Dichtegradientenzentrifugation über Lymphoprep™ und zum anderen die initiale Dichtegradientenzentrifugation über Polymorphprep™ gefolgt von mehreren Waschschritten. Obwohl rein methodisch gesehen Polymorphprep™ das schonendere Verfahren zu sein schien, führten wir Isolationen mit beiden Trennmedien durch und überprüften anschließend deren Effizienz durch FACS-Analyse.

Zunächst wurde der Verunreinigungsgrad des jeweiligen PMN-Isolats bestimmt. Dies geschah unter Verwendung des FSC (*forward scatter*) und des SSC (*sideward scatter*). Die Zellen, die sich in einer Probe befinden, werden zunächst durch eine Kapillare angesaugt und dabei durch Laserlicht abgetastet, wodurch sie charakterisiert werden. Der FSC untersucht die Zellen auf ihre Größe hin, während der SSC eine Aussage über die innere Granularität der Zellen liefert. Durch diese beiden Parameter lässt sich Vollblut in prinzipiell vier Fraktionen unterteilt (siehe Abb. 4.1.1.1).

4. Ergebnisse

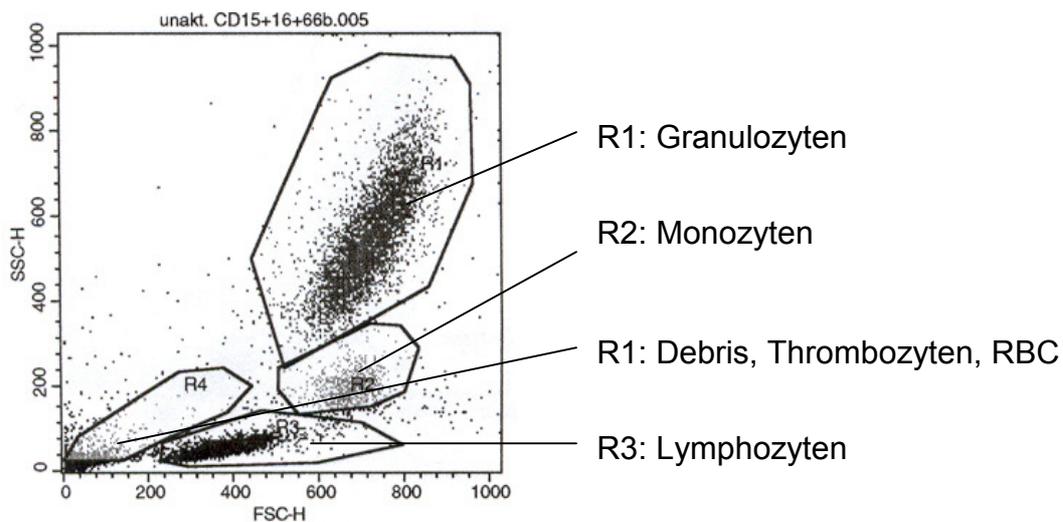


Abb. 4.1.1.1: Dot-Plot von lysiertem Vollblut unter Verwendung von FSC und SSC

Der prozentuale Anteil der Zellen, die sich beim Isolat im festgelegten Granulozyten-Gate befanden, gab uns folglich Aufschluss über die Effizienz der Isolationsmethode. Dieser Anteil lag anfänglich bei Polymorphprep™ bei 95,71% und bei Lymphoprep™ bei 98,14%. Es folgten weitere Untersuchungen, die dazu dienen sollten, die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse zu belegen.

Obwohl durch beide Trennmethode eine deutliche Anreicherung der Granulozytenfraktion im Vergleich zum Vollblut erreicht wurde, war die Qualität der Auftrennung, also die Kontaminationsrate mit anderen Zellen, sowohl bei der jeweiligen Präparationsmethode, als auch im Vergleich beider Methode, sehr unterschiedlich.

Bei der Analyse der Verunreinigungen des Isolats war festzustellen, dass diese bei Polymorphprep™ weitgehend aus Lymphozyten bestanden, während bei Lymphoprep™ weitaus mehr Zelldebris, Erythrozyten und Thrombozyten zu finden waren. Deren Punktwolke konfluente fast schon gänzlich mit der Granulozytenwolke, so dass die Granulozytenpopulation weitaus weniger deutlich abgrenzbar war als bei Polymorphprep™.

4. Ergebnisse

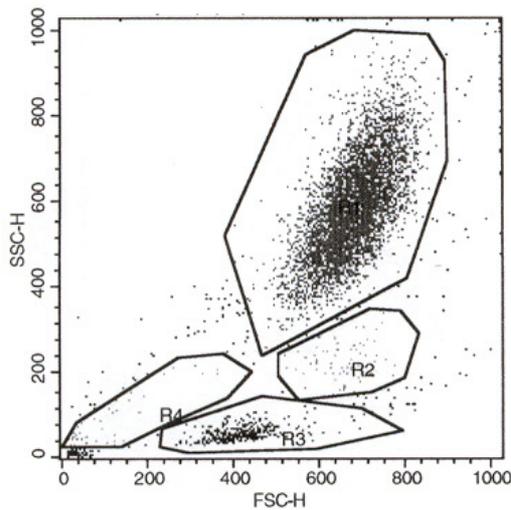


Abb. 4.1.1.2: *Dot-Plot* des Polymorphprep™-Isolats

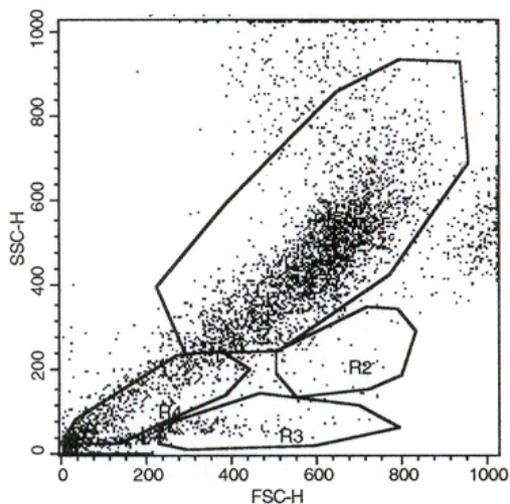


Abb. 4.1.1.3: *Dot-Plot* des Lymphoprep™-Isolats

Ein großer Unterschied bestand darin, dass die Punktwolke im Granulozyten-Gate bei Verwendung von Lymphoprep™ weiter streute als bei Verwendung von Polymorphprep™ (siehe Abb. 4.1.1.2 und Abb. 4.1.1.3). Auffällig war auch, dass mit Lymphoprep™ isolierte Granulozyten annähernd doppelt so groß waren wie bei Polymorphprep™. Diese Tatsache ist wohl auf die bei der Isolation durchgeführte Erythrozytenlyse mit hypotoner Lösung zurückzuführen, die osmotisch bedingt zum Wassereinstrom in die im Vergleich zu H_2O_{dd} hypertonen Granulozyten und folglich

4. Ergebnisse

zu deren Quellung führt. Dieses Phänomen ist ebenfalls in lysiertem Vollblut zu finden.

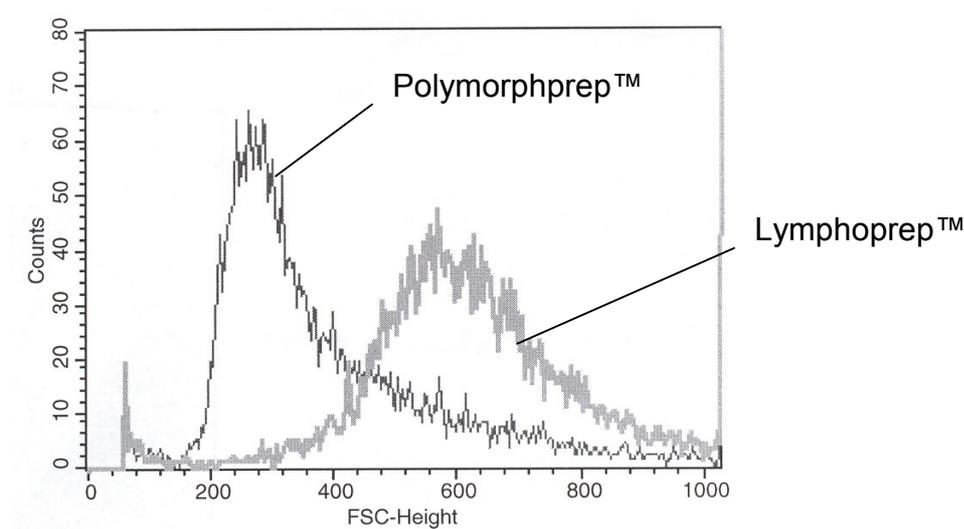


Abb. 4.1.1.4: Größenvergleich der isolierten Granulozyten bei Verwendung von Polymorphprep™ und Lymphoprep™

Um die Vergleichbarkeit der Isolationsmethoden zu gewährleisten, wurde das durch Polymorphprep™ gewonnene Isolat für die FACS-Analysen nach erfolgter Markierung ebenfalls den Bedingungen einer Lyse unterzogen. Folglich erscheint nachfolgend das Zellvolumen der Granulozyten bei Polymorphprep™ ebenfalls vergrößert.

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse entschieden wir uns für Polymorphprep™ als Trennmedium für alle weiteren Granulozytenpräparationen. Die Vitalität der mit Polymorphprep™ isolierten Granulozyten betrug 94%.

4.1.2 Auswahl des Antikoagulans

Da im Rahmen der Interaktionsversuche fMLP als Stimulans für die Granulozyten verwendet werden sollte, war folglich ein Antikoagulans zu wählen, das nicht in den Calciumhaushalt der Zelle eingreift (siehe Einleitung). Folglich wäre Heparin am besten geeignet, da Citrat und EDTA ihre Wirkung durch Bildung von

4. Ergebnisse

Chelatkomplexen mit Calciumionen vermitteln. Die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin hingegen beruht auf der Bindung von Antithrombin III, wobei es sich um ein Enzym handelt, das Gerinnungsfaktoren hemmt. Durch die Bindung von Heparin wird Antithrombin und seiner Wirksamkeit verstärkt und beschleunigt.

Um Heparin als zu verwendendes Antikoagulans zu bestätigen, führten wir bei Blut des gleichen Spenders jeweils eine Gerinnungshemmung mit Citrat, EDTA oder Heparin durch und untersuchten anschließend das Verhalten der verschiedenen Proben bei Stimulation mit fMLP. Um den Grad der Aktivierung der Granulozyten zu bestimmen, betrachteten wir das Oberflächenmolekül CD66b, das bereits basal in geringerem Maße von allen Granulozyten exprimiert wird und dessen Expression nach Stimulation entsprechend dem Aktivierungsgrad der Granulozyten um ein Mehrfaches hochreguliert wird (61). Die Untersuchungen wurden an lysiertem Vollblut durchgeführt, um einen möglichen Einfluss der Isolationsmethoden auf die Expression von CD66b auszuschließen. Leerkontrolle sowie Isotyp-Kontrolle lagen jeweils unterhalb der Signifikanzschwelle.

Interessant war, dass die MFI (*mean fluorescence intensity*) durchweg niedriger war, wenn man die Granulozyten mit CD66b und zwei anderen Antikörpern gleichzeitig markierte (Dreifachfärbung), als wenn man jeweils nur einen Antikörper verwendete (siehe Tab. 4.1.2.1). Dies könnte auf einer sterischen Behinderung der eingesetzten Antikörper bei der Bindung an die Zellrezeptoren beruhen.

In nachfolgender Tabelle ist die jeweilige MFI von CD66b aufgeführt:

Tab. 4.1.2.1: MFI von CD66b bei Verwendung verschiedenen Reaktionsbedingungen

	Einfachfärbung			Dreifachfärbung		
		+ H ₂ O ₂	+ fMLP		+ H ₂ O ₂	+ fMLP
<i>EDTA</i>	60,01	∅	119,83	53,84	50,76	102,46
<i>Heparin</i>	72,80	82,09	224,56	56,92	70,28	180,21
<i>Citrat</i>	73,06	81,84	194,89	49,11	67,21	163,97

Hierbei erkennt man, dass die Expression von CD66b bei Verwendung von Heparin tatsächlich nach Stimulation mit fMLP etwa 3,1-fach hochreguliert wurde. Bei Citrat-

4. Ergebnisse

Blut lag dieser Quotient immerhin bei ca. 2,7, und in mit EDTA antikoaguliertem Blut vermochte fMLP die Expression lediglich nur um etwa das Doppelte zu steigern. Die Literaturangaben wurden also durch diese Untersuchung bestätigt und Heparin im Folgenden als Antikoagulans verwendet.

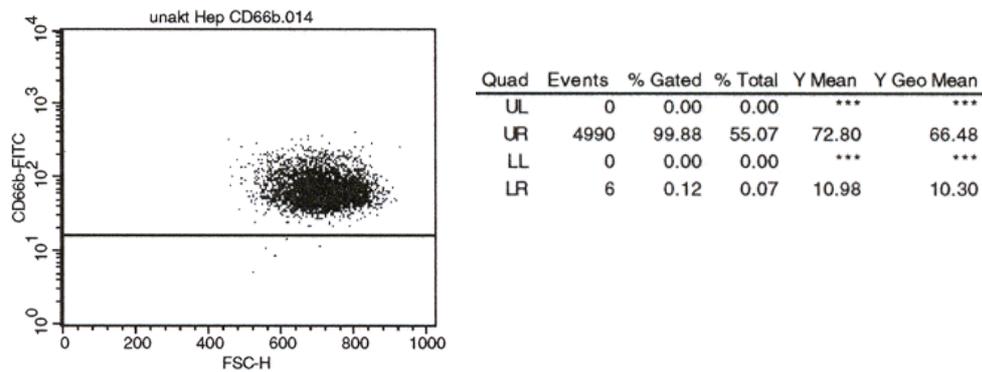


Abb. 4.1.2.1: *Dot-Plot* sowie MFI von CD66b in unstimuliertem, lysiertem Vollblut (Einzelfärbung)

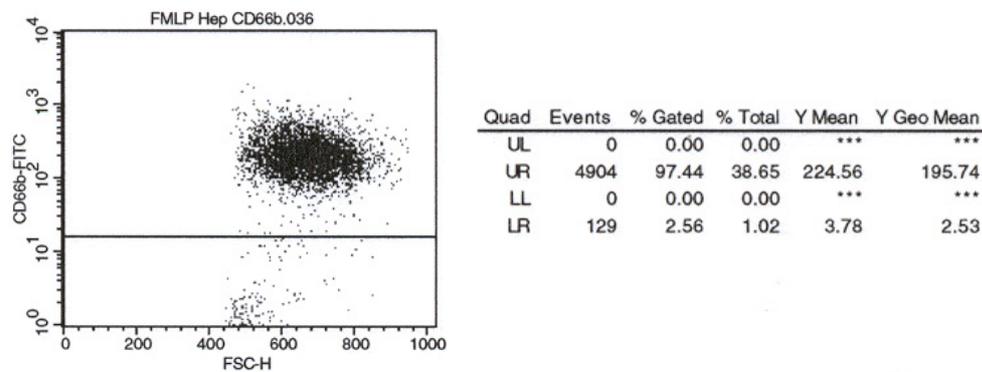


Abb. 4.1.2.2: *Dot-Plot* sowie MFI von CD66b in stimuliertem, lysiertem Vollblut (fMLP, Einzelfärbung)

Bei der Betrachtung von CD66b bot sich uns weiterhin die Möglichkeit, alternativ ein anderes Stimulans zu verwenden und somit die Eignung von fMLP zu überprüfen. Wir verwendeten H_2O_2 und mussten feststellen, dass es nur in geringem Maße im Stande war, die Expression von CD66b zu beeinflussen (siehe Tab. 4.1.2.1).

4.1.3 Charakterisierung der Zellen im Isolat

Neben einem Antikörper gegen CD66b verwendeten wir bei den FACS-Analysen auch Antikörper, die gegen die Oberflächenantigene CD15 und CD16 gerichtet waren (siehe Einleitung). CD15 ist außer auf Makrophagen/Monozyten nur auf Granulozyten zu finden, wobei Basophile als einzige Subpopulation dieses Molekül nicht exprimieren. Folgende Zelltypen hingegen sind positiv für CD16: Natürliche Killerzellen, Stammzellen / Präkursor-Zellen, Makrophagen / Monozyten und Granulozyten (außer Eosinophilen). Bei CD66b handelt es sich allerdings um einen spezifischen Granulozyten-Marker.

Bei Betrachtung der Abb. 4.1.3.1 ist erkennbar, dass 95,87% der Zellen, die sich im Granulozyten-Gate befanden, sowohl positiv für CD15 als auch für CD16 waren. Folglich handelt es sich dabei entweder um neutrophile Granulozyten oder Makrophagen / Monozyten. Wenn man allerdings die *Dot-Plots* in Abb. 4.1.3.2 und Abb. 4.1.3.3 mit in Betracht zieht, wird klar, dass es sich nur um Granulozyten handeln kann, da 98,80% im *gate* positiv für CD15 und CD66b und 96,85% positiv für CD16 und CD66b waren, CD66b jedoch nicht von Makrophagen/Monozyten exprimiert wird.

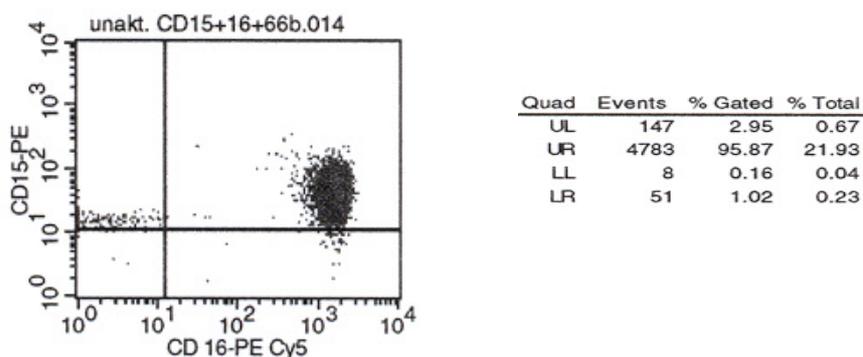


Abb. 4.1.3.1: *Dot-Plot* des Granulozyten-Gates (CD16 gegen CD15)

4. Ergebnisse

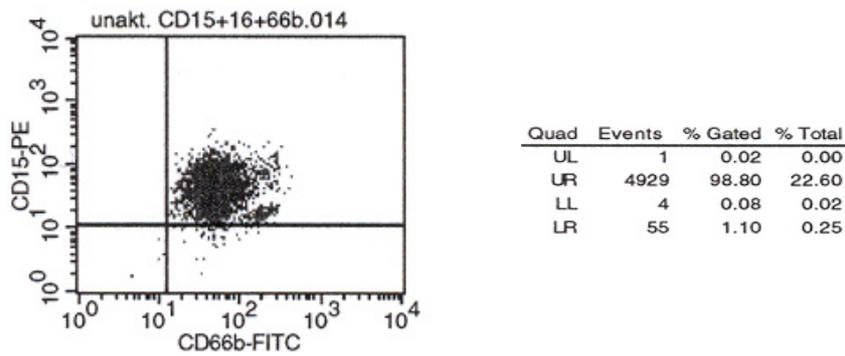


Abb. 4.1.3.2: *Dot-Plot* des Granulozyten-Gates (CD66b gegen CD15)

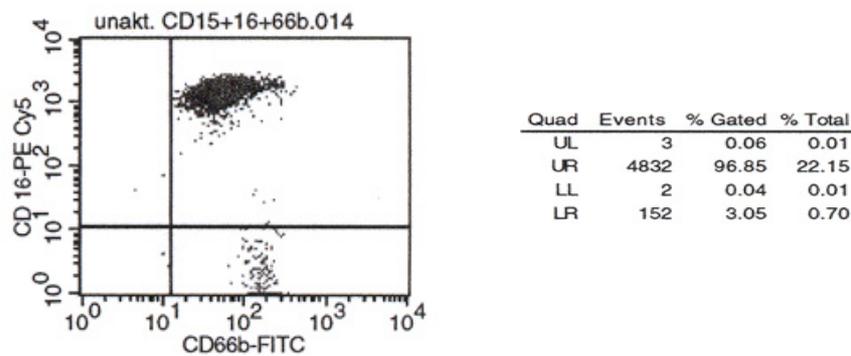


Abb. 4.1.3.3: *Dot-Plot* des Granulozyten-Gates (CD66b gegen CD16)

4.1.4 CD15- und CD16-Expression nach Stimulation

Das Ziel dieser Untersuchungen bestand darin, festzustellen, inwiefern die Expression von CD15 und CD16 durch Aktivierung der Granulozyten beeinflusst wird. Laut Literaturangaben war zu erwarten, dass CD16 von der Oberfläche abgestoßen und ins Medium freisetzt wird, was als „shedding“ bezeichnet wird, während zum Verhalten von CD15 entsprechende Untersuchungen fehlen.

Trotz mehrfacher Versuchsdurchführung (für CD16 n=7) war es uns leider nicht möglich, einen Trend bezüglich der Expression zu erkennen, da bereits das Ausmaß der basalen Expression eine enorme Streuung aufwies und auch das Verhalten nach Stimulation unterschiedlich war.

4.2 Interaktionsversuche

Ziel der durchgeführten Interaktionsversuche war die Untersuchung der veränderten Adhärenz von isolierten Granulozyten (Abb. 4.2.1) an kultivierten Endothelzellen (Abb. 4.2.2) als Antwort auf verschiedene Reaktionsbedingungen.

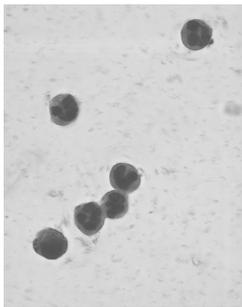


Abb. 4.2.1: isolierte Granulozyten im Phasenkontrast

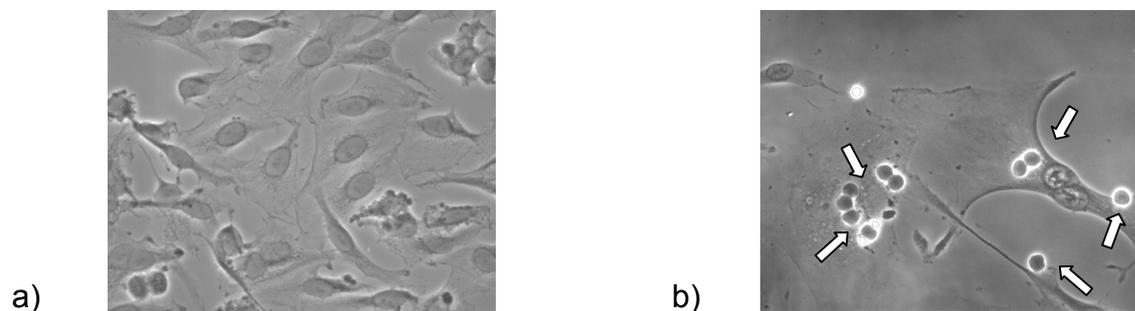


Abb. 4.2.2 a) und b): Endothelzellen mit adhärennten Granulozyten, Granulozyten im Abbildungsteil b) mit Pfeilen markiert

Die Aktivierung der HDMEC erfolgte, indem die Endothelzellen Hypoxie oder Hypoxie/Reoxygenierung ausgesetzt wurden. Die Aktivierung der Granulozyten erfolgte durch Inkubation mit fMLP (siehe Material und Methode). Die Versuchsreihe bestand aus sechs Einzelversuchen (V1-6)

4.2.1 Versuchsreihe V1-6

4.2.1.1 Granulozytenadhärenz

Nach Ablauf der Hypoxie war sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Granulozyten im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt $K_{2,5}$ eine verstärkte Adhärenz von Granulozyten am Endothel zu verzeichnen ($p_{\text{stim}} < 0,04$). Die Stimulation von Granulozyten durch fMLP führte nicht zu einem verstärkten Adhäsionsverhalten. Die Adhärenz der stimulierten Granulozyten war bei Betrachtung der Einzelversuche im Mittel sogar etwas geringer als die der unstimulierten.

Nachdem die hypoxischen HDMEC 1 h reoxygeniert worden waren ($HR_{3,5}$), war im Vergleich zum Hypoxiezeitpunkt ($H_{2,5}$) eine Verminderung der Adhäsionsrate auffällig ($p_{\text{unstim}} < 0,01$, $p_{\text{stim}} < 0,03$), die sogar deutlich unterhalb der Adhäsionsrate am Kontrollzeitpunkt $K_{2,5}$ lag. Dieser Verlauf setzte sich nach einer weiteren Stunde Reoxygenierung fort ($HR_{4,5}$); dort wurde ein Adhäsionsminimum erreicht.

Bei der Betrachtung der einzelnen Versuche fiel auf, dass die Verläufe des Adhäsionsverhaltens bei allen Versuchen weitgehend gleich waren. Ein nach V6 in der Versuchsreihe V1-6 durchgeführter Versuch fiel allerdings aus dem Rahmen, da bei diesem im Verlauf $K_{2,5}$ - $H_{2,5}$ - $HR_{3,5}$ - $HR_{4,5}$ eine durchweg stärkere Adhärenz zu verzeichnen war als bei V1-6 (siehe Diskussion). Deshalb wurden bei der Auswertung nur V1-6 berücksichtigt.

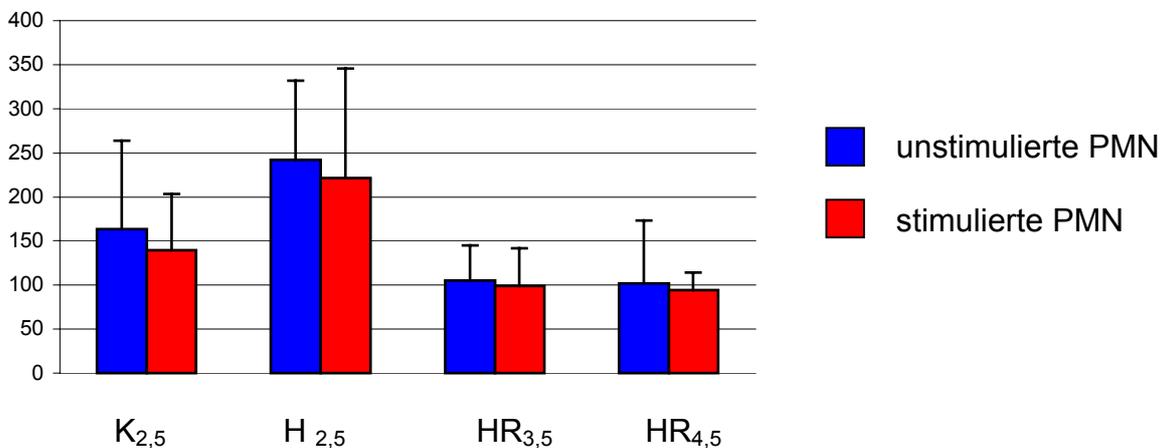


Abb. 4.2.1.1.1: Mittelwerte der Anzahl adhärenter Granulozyten in 200 GF (V1-6)

4.2.1.2 Granulozytenadhärenz an Endothelzellen und Matrix

Wenn man bei der Betrachtung der Interaktionsversuche auch Granulozyten mit einschloss, die nicht an die Endothelzelle selbst, sondern an die Matrix adhärten, fand man im Prinzip den gleichen Kurvenverlauf vor, wie wenn das Augenmerk nur auf diejenigen Granulozyten gerichtet war, die auch tatsächlich an den Endothelzellen adhären waren (siehe Abb. 4.2.1.1). Bei V1-6 wiesen etwa 25% aller Granulozyten eine Bindung an die Matrix auf. Allerdings war hier sowohl bei unstimulierten, als auch stimulierten Granulozyten der Unterschied zwischen den Adhäsionsraten bei $K_{2,5}$ und $HR_{3,5}$ bzw. $HR_{4,5}$ statistisch signifikant (siehe Anhang).

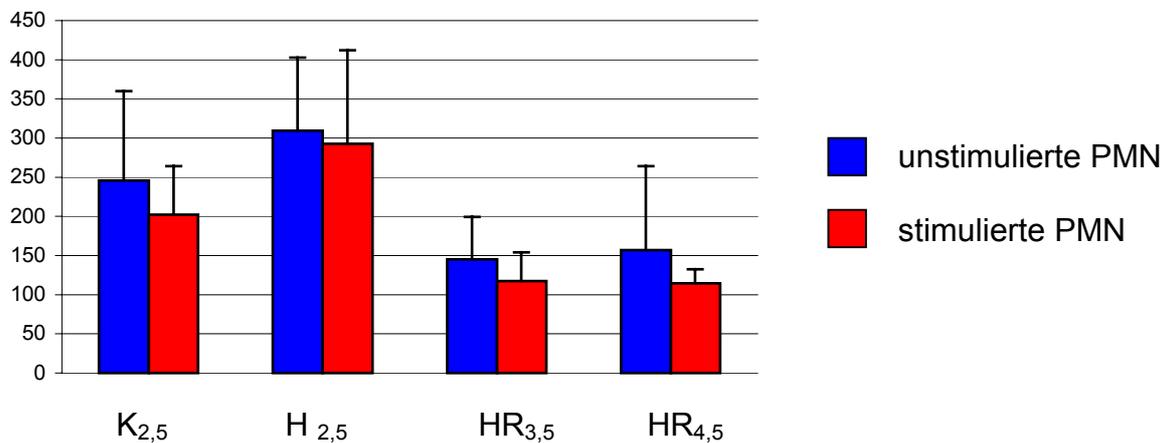


Abb. 4.2.1.2.1: Mittelwerte aller Granulozyten in 200 GF (V1-6)

4.2.1.3 Anteil der Endothelzellen, die eine Bindung eingehen

Zunächst wurde untersucht, wie hoch der Anteil derjenigen Endothelzellen war, die tatsächlich Granulozyten binden konnten. Hierbei stellte man bei V1-6 fest, dass dieser Anteil am Kontrollzeitpunkt $K_{2,5}$ am größten war und nach Ablauf der Hypoxie geringfügig absank. Bei $HR_{3,5}$ wiesen bei den unstimulierten Granulozyten nur noch 48% der Endothelzellen, die bei $H_{2,5}$ Granulozyten gebunden hatten, eine solche Bindung auf ($p_{\text{unstim}} < 0,04$). In der Gruppe der stimulierten Granulozyten lag dieser Prozentsatz lediglich bei etwa 28% ($p_{\text{stim}} < 0,03$). Am Versuchszeitpunkt $HR_{4,5}$ sank

4. Ergebnisse

der Prozentsatz weiter geringfügig ab. Auch dieses Verhalten der Endothelzellen lässt auf eine Schädigung bei der Reoxygenierung schließen.

Auffällig war weiterhin, dass an allen Zeitpunkten durchweg weniger stimulierte als unstimulierte Granulozyten gebunden wurden.

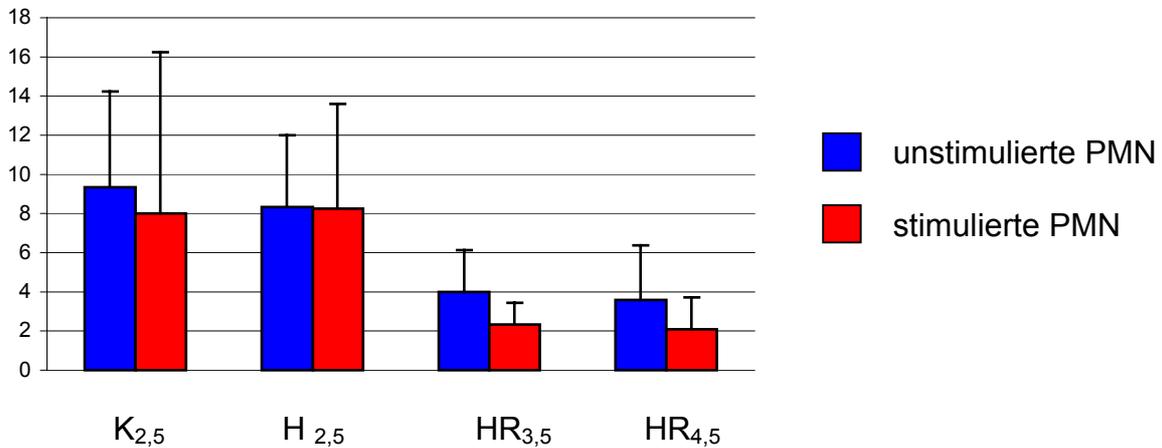


Abb. 4.2.1.3.1: Anteil der EC, die Granulozyten binden [%] (Mittelwerte V1-6)

4.2.1.4 Adhärenente Granulozyten pro Endothelzelle

Ein weiterer Aspekt, der untersucht wurde, war die Anzahl der gebundenen Granulozyten pro Endothelzelle. Hierbei wurden die adhärenente Granulozyten nur zu solchen Endothelzellen in Bezug gesetzt, die in der Tat Granulozyten binden konnten.

Bei V1-6 war im Vergleich von K_{2,5} mit H_{2,5} kein wesentlicher Unterschied festzustellen. Die Fähigkeit einer Endothelzelle, verstärkt Granulozyten zu binden, kann durch Hypoxie nicht gesteigert werden. Durch die Reoxygenierung trat allerdings eine leichte Verminderung der Zahl der gebundenen Granulozyten ein. Dieser Trend setzte sich auch im Rahmen der zweiten Reoxygenierungsphase weiter fort.

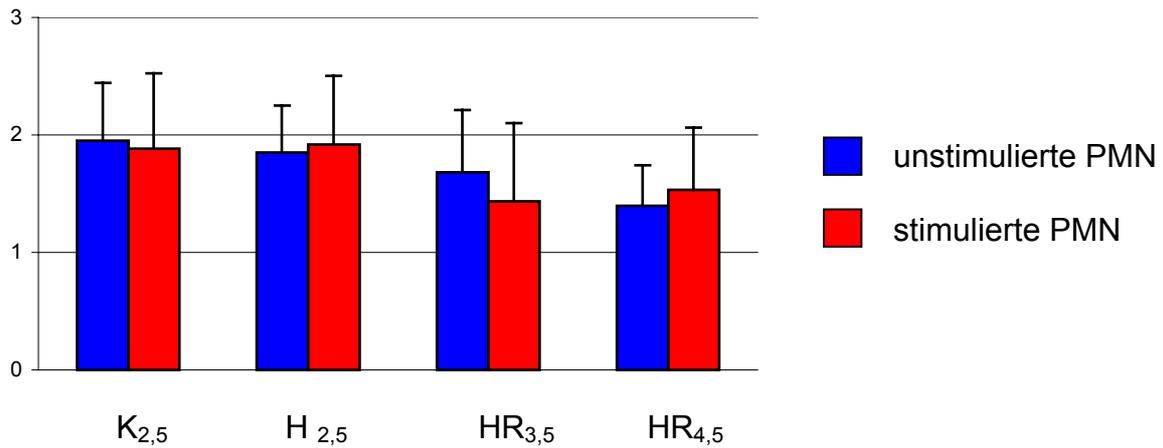


Abb. 4.2.1.4.1: Mittelwerte gebundener Granulozyten pro Endothelzelle (V1-6)

4.2.1.5 VWF-Expression

Bei V1-6 zeigten sich die ausgezählten Endothelzellen basal zu ca. 26% als vWF-positiv, was durch Hypoxie auf 37% gesteigert wurde ($p_{\text{unstim}} < 0,02$). Die folgende Reoxygenierung von 1 bzw. 2 h vermochte die Expression weiterhin geringfügig zu steigern.

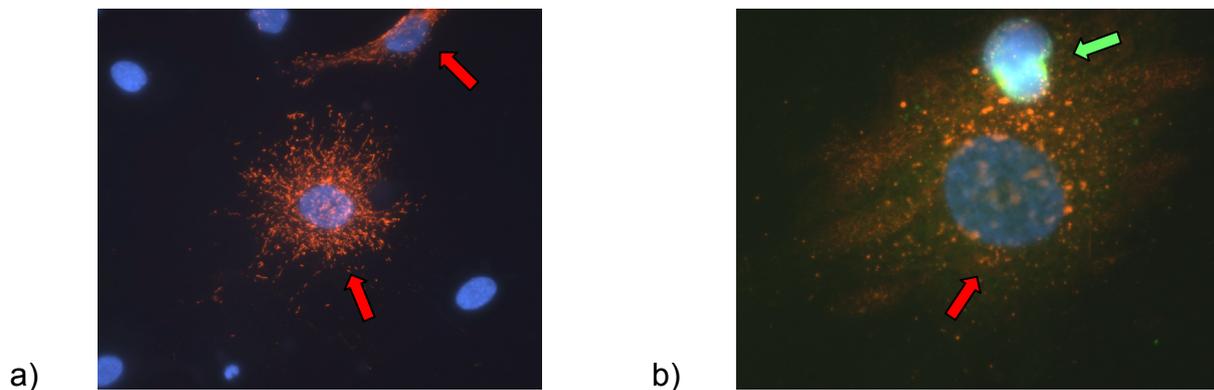


Abb. 4.2.1.5.1 a): VWF-positive Endothelzellen (rote Pfeile), b): vWF-positive Endothelzellen mit Granulozyten (grüner Pfeil, CD66b grün gefärbt)

4. Ergebnisse

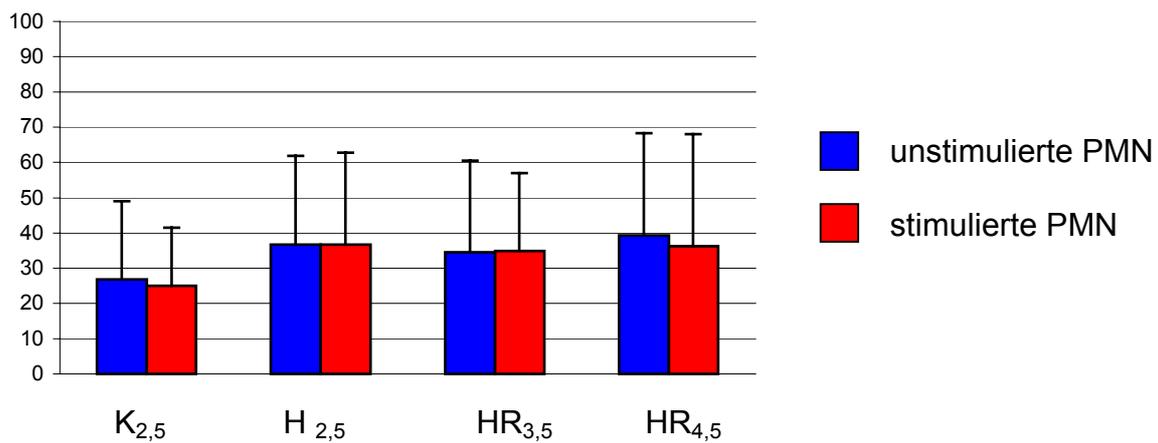


Abb. 4.2.1.5.2: Anteil vWF-positiver EC [%] (Mittelwerte V1-6)

4.2.2 Versuchsreihe V7-9

4.2.2.1 Granulozytenadhärenz

Aufgrund der Ergebnisse von V1-6 stellte sich die Frage, ob die Granulozyten im Verlauf des Versuchs an Reaktivität verlieren, da mögliche Ursachen für die deutlich reduzierte Adhärenz nach Ablauf der Reoxygenierung entweder auf Seiten der Endothelzellen oder bei den Granulozyten liegen könnten. Deshalb führten wir zusätzlich zum ersten Kontrollzeitpunkt $K_{2,5}$ einen zweiten Kontrollzeitpunkt $K_{4,5}$ ein. Die Interaktion fand am Versuchende statt und war damit zeitgleich mit $HR_{4,5}$ (siehe Tab. 3.1.4.3). Der sonstige Versuchsablauf gestaltete sich wie bei der Versuchsreihe V1-6. Aus organisatorischen Gründen verzichteten wir allerdings auf die Betrachtung der ersten Reoxygenierungsphase ($HR_{3,5}$) und beschränkten uns auf die 2-stündige Reoxygenierung $HR_{4,5}$.

Bei dieser Versuchsreihe V7-9 war tendenziell ein ähnliches Adhäsionsverhalten wie bei V1-6 zu erkennen (siehe 4.2.1.1). Die Zahl der adhärenen Granulozyten lag nach Ablauf der Hypoxie signifikant höher als bei $K_{2,5}$ ($p_{\text{unstim}} < 0,001$, $p_{\text{stim}} < 0,03$), und nach 2 h Reoxygenierung wurde auch hier ein Tiefpunkt bezüglich der Adhäsion erreicht. Die Adhärenz am zweiten Kontrollzeitpunkt $K_{4,5}$ entsprach weitgehend der Basaladhärenz am ersten Kontrollzeitpunkt $K_{2,5}$, was darauf hinweist, dass die Granulozyten auch nach einer Ruhephase von 2 h noch genauso reaktionsbereit sind wie unmittelbar nach ihrer Isolation.

Auch das Verhalten der stimulierten Granulozyten entsprach weitgehend dem bei V1-6, obwohl bei Betrachtung der Mittelwerte tendenziell eher eine leicht verstärkte Adhärenz zu erkennen war.

Bei unstimulierten sowie stimulierten Granulozyten war durchweg bei allen beobachteten Zeitpunkten eine deutlich höhere Anzahl adhärenen Granulozyten auffällig, obwohl bei der Auswertung der Kontrollversuche ebenfalls eine Fläche von 200 Gesichtsfeldern im Live-Bild ausgezählt wurde. Am ersten Kontrollzeitpunkt wurden bei V7-9 ca. 7-mal so viele unstimulierte und 8-mal soviel stimulierte Granulozyten von Endothelzellen gebunden wie bei V1-6, am Hypoxiezeitpunkt ca. 7,4- bzw. 8,7-mal, nach 1-stündiger Reoxygenierung 9,1- bzw. 9,4-mal und bei $HR_{4,5}$

4. Ergebnisse

sogar 12,1- bzw. 14,5-mal so viele Granulozyten. Die Ursache hierfür könnte in der höheren Zelldichte der Endothelzellen bei der Versuchsreihe V7-9 begründet sein.

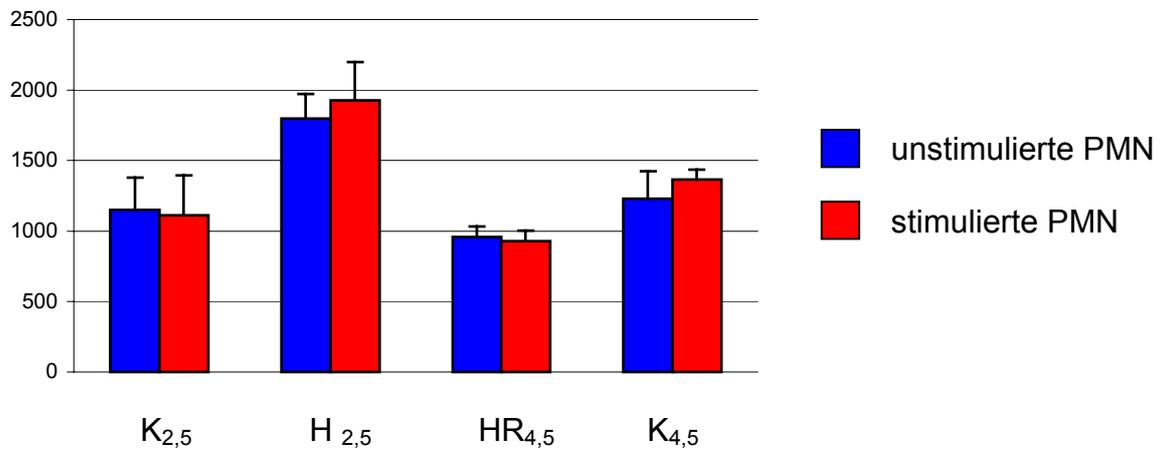


Abb. 4.2.2.1.1: Mittelwerte der Anzahl adhärenter Granulozyten in 200 GF (V7-9)

4.2.2.2 Granulozytenadhärenz an Endothelzellen und Matrix

Der Anteil der Matrixbindungen lag bei V7-9 nur bei 1%, was wiederum wohl auf die höhere Dichte der verwendeten Endothelzellen zurückgeführt werden kann. Allerdings war auch bei dieser Versuchsreihe das Adhäsionsverhalten an Endothelzellen verglichen mit der an Endothelzellen und Matrix an allen betrachteten Zeitpunkten ähnlich.

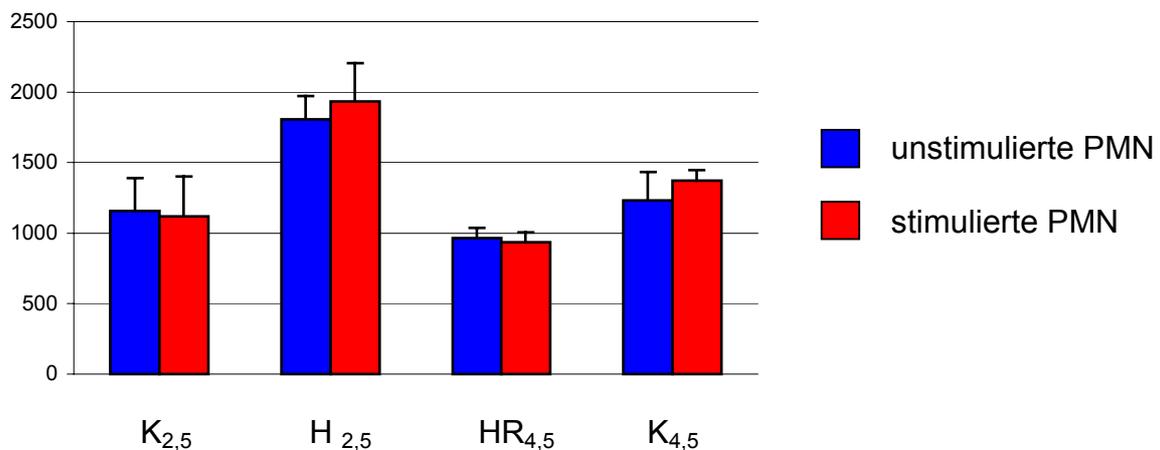


Abb. 3.2.2.2.1: Mittelwerte aller Granulozyten in 200 GF (V7-9)

4.2.2.3 Anteil der Endothelzellen, die eine Bindung eingehen

Die Endothelzellen der Versuchsreihe V7-9 verhielten sich bezüglich der Fähigkeit, Granulozyten zu binden, etwas anders als V1-6. Die Endothelzellen, die Hypoxie exponiert waren, zeigten die Tendenz, mehr Granulozyten zu binden als die Endothelzellen am Kontrollzeitpunkt $K_{2,5}$. Die Werte bei $HR_{4,5}$ lagen etwa auf dem Niveau von $K_{2,5}$. Das Bindungsverhalten der Endothelzellen entsprach bei $K_{4,5}$ dem bei $K_{2,5}$.

Das Verhalten der stimulierten Granulozyten war unstetig. Nachdem sie am Kontrollzeitpunkt $K_{2,5}$ gleich gut und an hypoxischem Endothel deutlich schlechter adhärten, waren sie bei $K_{4,5}$ wesentlich bindungsaffiner als unstimulierte Granulozyten.

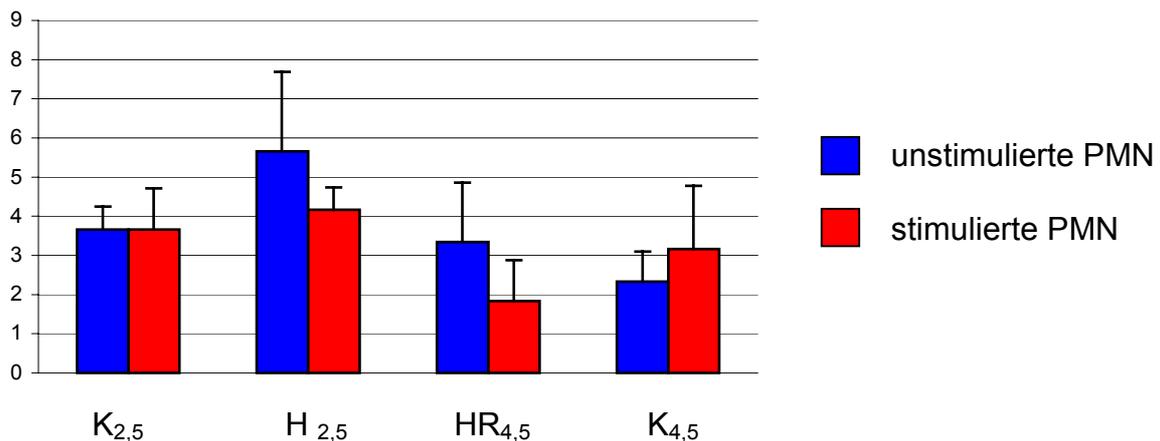


Abb. 4.2.2.3.1: Anteil der EC, die Granulozyten binden [%] (Mittelwerte V7-9)

4.2.2.4 Adhärenzte Granulozyten pro Endothelzelle

Am Kontrollzeitpunkt $K_{2,5}$ wurden in etwa so viele Granulozyten pro Endothelzellen gebunden wie bei $H_{2,5}$. Diese Versuchsreihe bestätigt also, dass die Bindungsfähigkeit der Endothelzellen nicht durch Hypoxie steigerbar ist (siehe 3.2.1.4). Am zweiten Kontrollzeitpunkt $K_{4,5}$ wurden allerdings etwas weniger Granulozyten gebunden als am ersten.

4. Ergebnisse

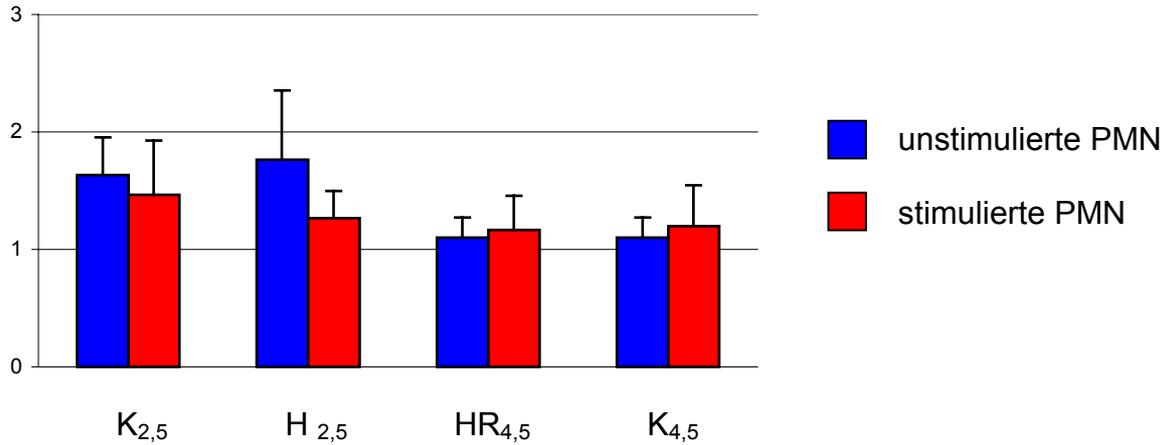


Abb. 4.2.2.4.1: Mittelwerte gebundener Granulozyten pro Endothelzelle (V7-9)

4.2.2.5 VWF-Expression

Bei V7-9 verhielten sich die Endothelzellen bezüglich vWF-Expression ähnlich wie bei V1-6 (siehe 4.2.1.5): Sie wurde durch Hypoxie gesteigert, allerdings lediglich von basal ca. 13% auf 18% und durch 2-stündige Reoxygenierung auf 20%. Die Werte bei K_{4,5} lagen etwas höher als bei K_{2,5} (ca. 18%).

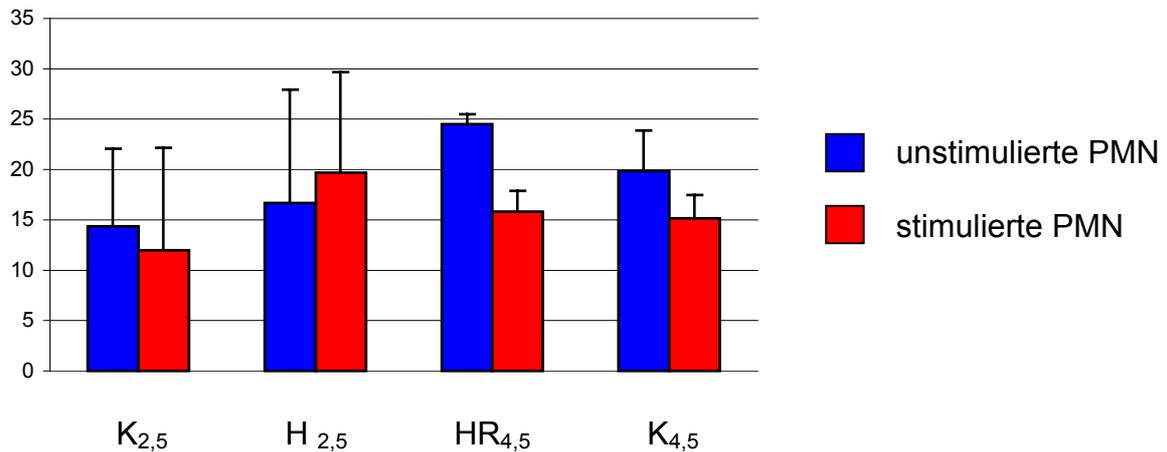


Abb. 4.2.2.5.1: Anteil vWF-positiver EC [%] (Mittelwerte V7-9)

4.2.3 Versuchsreihe V10-12

4.2.3.1 Granulozytenadhärenz

Neben der Versuchsreihe V7-9 wurde noch eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, die ebenfalls dazu diente, festzustellen, ob Granulozyten auch 3 h nach erfolgter Isolation reaktionsfähig sind. Hierzu wurde eine zweite Granulozytenisolation im Versuch durchgeführt (siehe Tab. 3.1.4.3). Die zu Versuchsbeginn isolierten Granulozyten werden als aPMN bezeichnet, während es sich bei fPMN um Granulozyten handelt, die aus der zweiten Granulozytenisolation stammen.

Die Absolutzahl der adhärennten Granulozyten war wie bei V7-9 deutlich höher als bei V1-6. Des Weiteren war auch hier ein deutlicher Anstieg der Adhäsionsrate bei $H_{2,5}$ im Vergleich zur $K_{2,5}$ zu verzeichnen. Dies traf sowohl für aPMN, als auch für fPMN zu, wobei fPMN in etwas größerem Maße zu adhären schienen. Dieser Unterschied im Interaktionsverhalten war allerdings am zweiten Kontrollzeitpunkt $K_{5,5}$ nicht mehr nachzuweisen. Frisch isolierte Granulozyten verhielten sich genauso wie die Granulozyten, die zum Interaktionszeitpunkt schon für einen Zeitraum von 3 h geruht hatten. Das Adhäsionsverhalten beider Gruppen bei $K_{5,5}$ entsprach dem zu Versuchsbeginn. Stimulierte Granulozyten verhielten sich auch bei dieser Versuchsreihe ähnlich wie unstimulierte Granulozyten.

Insgesamt legen die Ergebnisse von V9-12 nahe, dass die verminderte Adhärenz der Granulozyten nach 2 h Reoxygenierung in der Tat auf einer Schädigung der Endothelzellen während der Reoxygenierung beruht, was den Ergebnissen von V7-9 entspricht.

4. Ergebnisse

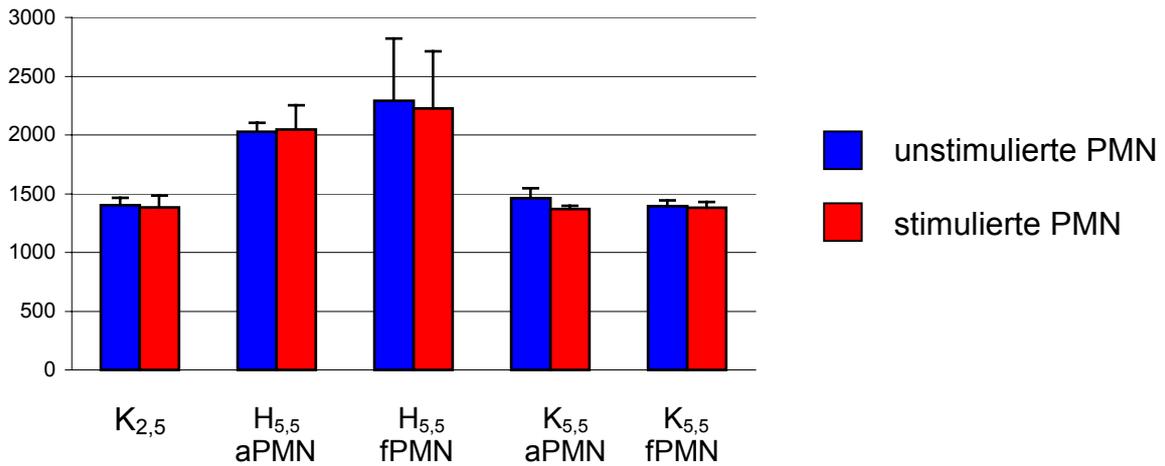


Abb. 4.2.3.1.1: Mittelwerte der Anzahl adhärenter Granulozyten in 200 GF (V10-12)

4.2.3.2 Granulozytenadhärenz an Endothelzellen und Matrix

Der Anteil der Matrixbindungen lag bei V10-12 genau wie bei V7-9 lediglich bei 1%, was auf die höhere Dichte der verwendeten Endothelzellen zurückgeführt werden kann. Der Adhäsionsverlauf im Rahmen des durchgeführten Versuches entspricht ansonsten dem Verlauf, der bei ausschließlich an Endothelzellen adhärierenden Granulozyten beobachtet wurde.

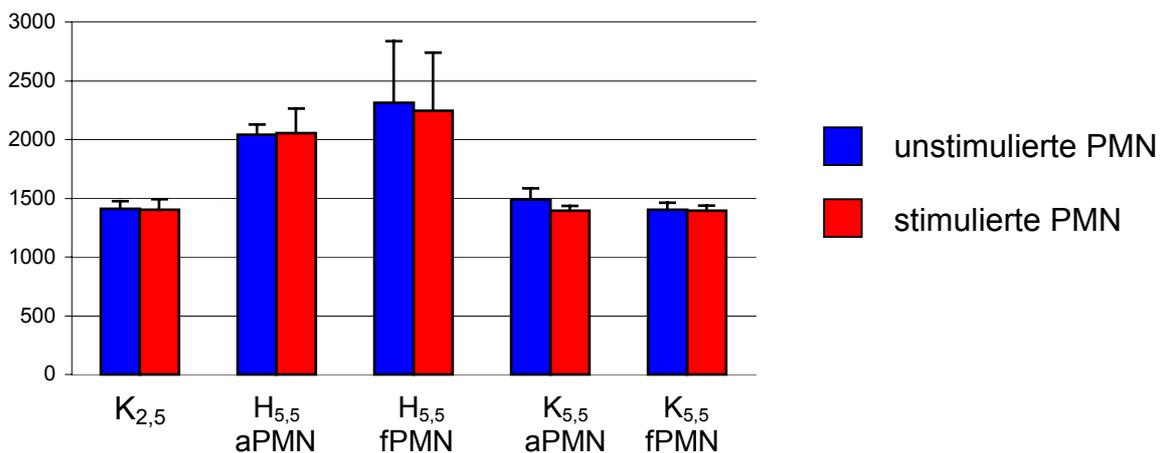


Abb. 4.2.3.2.1: Mittelwerte aller Granulozyten in 200 GF (V10-12)

4.2.3.3 Anteil der Endothelzellen, die eine Bindung eingehen

Sämtliche Kontrollwerte bei V10-12 entsprachen einander in etwa. Auch hier waren in beiden Hypoxiegruppen, also sowohl bei aPMN als auch bei fPMN, mehr Endothelzellen in der Lage, Granulozyten zu binden als zu Versuchsbeginn. Nach erfolgter Stimulation war hier die Bindungstendenz durchgehend geringer als ohne Stimulation.

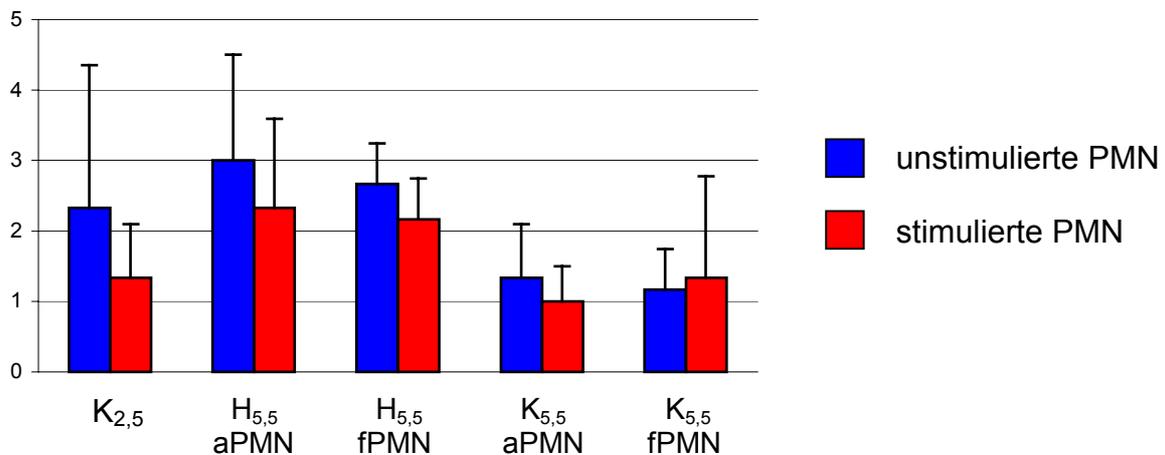


Abb. 4.2.3.3.1: Anteil der EC, der Granulozyten bindet [%] (Mittelwerte V10-12)

4.2.3.4 Adhärenente Granulozyten pro Endothelzelle

Bei V10-12 ist die Anzahl der gebundenen Granulozyten pro Endothelzelle generell etwas höher als bei V1-6 und V7-9, aber die Werte von Kontrollgruppe und Hypoxiegruppe entsprechen auch hier einander weitgehend.

4. Ergebnisse

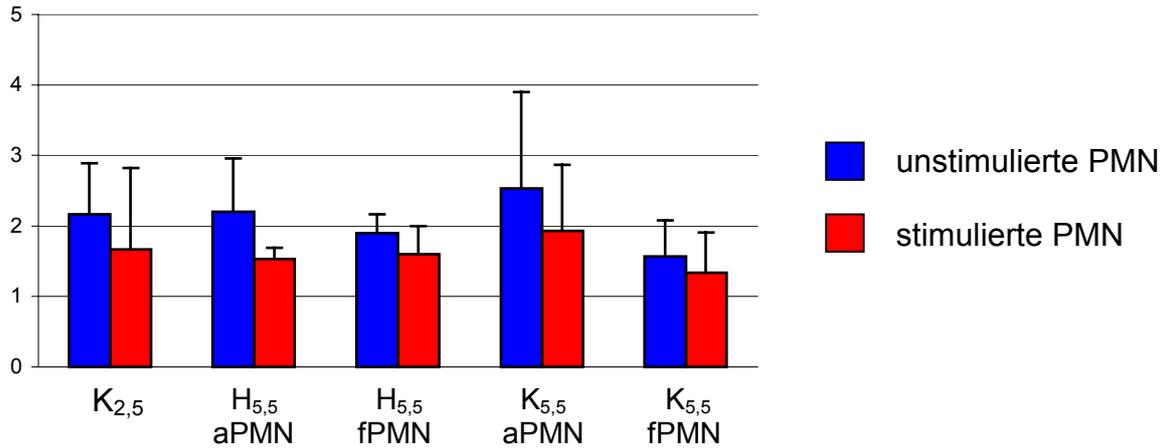


Abb. 4.2.3.4.1: Mittelwerte gebundener Granulozyten pro Endothelzelle (V10-12)

4.2.3.5 VWF-Expression

Der anfängliche Kontrollwert bei V10-12 lag bei nur knapp 6%, wird aber durch die Hypoxie in beiden Gruppen, also bei alten und frischen Granulozyten, auf etwa 27% gesteigert. Der zweite Kontrollwert am Versuchsende lag bei 18%.

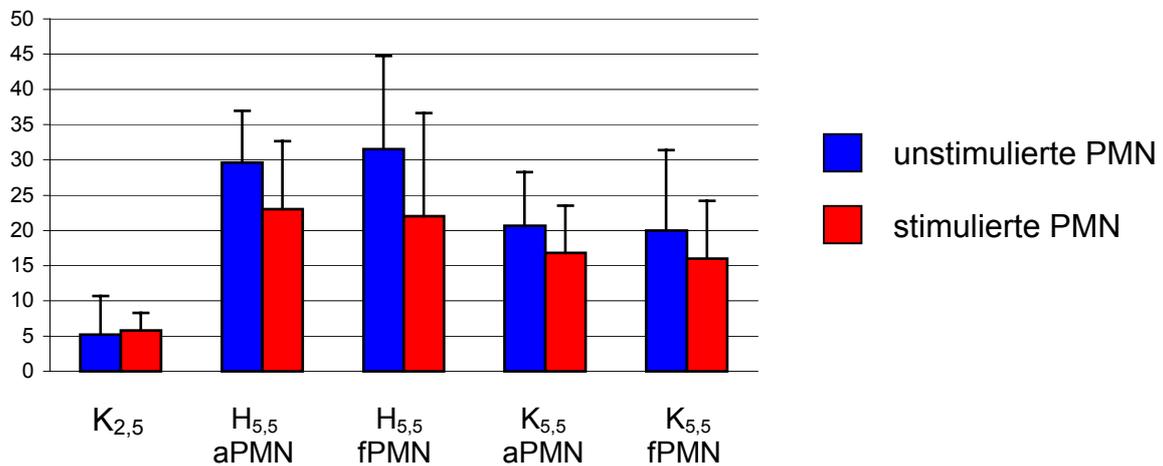


Abb. 4.2.3.5.1: Anteil vWF-positiver EC [%] (Mittelwerte V10-12)

5. Diskussion

5.1 Methodische Aspekte

5.1.1 Isolierungstechniken

In der Literatur ist eine Vielzahl von Methoden beschrieben, mit denen man neutrophile Granulozyten aus Vollblut isolieren kann. So kommen z.B. unterschiedliche Trennmedien zum Einsatz, aber auch bei Verwendung des gleichen Trennmediums gibt es wiederum zahlreiche Modifikationen. Vor Beginn dieser Arbeit musste eine Entscheidung gefällt werden, wie die Neutrophilen isoliert werden sollen.

Eine Möglichkeit, neutrophile Granulozyten zu isolieren, stellt die CCE (*counterflow centrifugal elutriation*) nach Jemionek dar. Hierbei werden verdünnte *Buffy Coats*, die durch Zentrifugation aus Vollblut gewonnen werden, in einen von einem Rotor betriebenen Elutriator gegeben. Unter *Buffy Coats* versteht man die sichtbare Schicht weißer Blutzellen und die oberen 6 ml der RBC-Schicht (10). In der Trennkammer des Elutriators ist der Fluss der zu trennenden Flüssigkeit nach zentripetal gerichtet ist. Wenn die Zentrifugal- und Zentripetalkräfte ausgeglichen sind, findet eine Schichtung der Zellen in der Trennkammer statt. Durch eine Erhöhung der Flussrate findet eine Auftrennung der Zellen nach Größe statt. Ist ein Plateau erreicht, wird dieses 10 min beibehalten, bevor der Rotor abgeschaltet wird (9).

Im Vergleich von CCE mit der Isolation von Neutrophilen durch Ficoll-Hypaque (FH) (s.u.), einem Verfahren, das von etlichen Arbeitsgruppen angewandt wird, ist festzustellen, dass mit CCE isolierte neutrophile Granulozyten größer sind und auf Stimulation hin mehr Superoxid und Granula freisetzen (9), was entweder auf ein mögliches Priming der Neutrophilen durch die CCE zurückzuführen sein könnte oder aber auch auf einer verminderten Reaktionsfähigkeit der FH-Granulozyten aufgrund

veränderter Oberflächenmoleküle beruhen könnte. CCE- und FH-Granulozyten weisen allerdings sehr ähnliche Membraneigenschaften auf (10), was gegen eine Schädigung der Oberflächenmoleküle auf FH-Granulozyten spricht. Da bei der CCE routinemäßig aus 100 ml Vollblut lediglich 1,2 bis 2×10^8 neutrophile Granulozyten gewonnen werden können und ein immenser mechanischer Stress durch den Vorgang der Elutriation an sich nicht auszuschließen ist, entschieden wir uns gegen die CCE als zu verwendende Isolationsmethode.

Zur Isolierung von Granulozyten aus Vollblut wird eine Vielzahl verschiedener Trennmedien verwendet, z.B. Percoll, Histopaque oder Ficoll-Hypaque (FH). Dabei wiederum kann man Vollblut entweder direkt über Ficoll-Hypaque zentrifugieren (z.B. bei Polymorphprep™) oder zunächst einen Sedimentationsschritt durchführen (z.B. bei der Methode nach *Böyum*).

Percoll ist ein Trennmedium, das auf Kolloid-Kieselerde basiert, die mit Polyvinylpyrrolidon beschichtet ist. Zunächst wird antikoaguliertes Vollblut zentrifugiert und danach das Plasma entfernt. Die RBC werden anschließend durch Dextranedimentation eliminiert. Die obere Schicht wird gewaschen, das Pellet resuspendiert und auf einen diskontinuierlichen Plasma-Percoll-Gradienten gelagert, der aus 42% und 51% Percoll besteht. Der Gradient wird anschließend zentrifugiert. Die neutrophilen Granulozyten befinden sich danach an der 42 / 51%-Interphase (30).

Auf einem ähnlichen Prinzip basiert auch die Isolation von Neutrophilen mit Histopaque. Bei Histopaque 1077 handelt es sich um ein Gemisch aus Polysucrose und Natriumditrizoat. Zunächst wird auch hier Vollblut gewaschen und anschließend einem Sedimentationsschritt unterzogen. Die Suspension wird auf Histopaque gelagert und der Gradient zentrifugiert. Abschließend werden die sich im Pellet befindlichen Erythrozyten mit einem hypotonen Puffer lysiert. Analog zur Percoll-Methode ist auch die Isolation mit Histopaque unter Verwendung eines diskontinuierlichen Gradienten durchführbar (36). Allerdings erachten wir die Verwendung eines einphasigen Gradienten als sinnvoller und konstanter, da er bereits gebrauchsfertig ist und nicht erst vor Versuchsbeginn hergestellt werden muss, was potenziell fehlerbehaftet ist. Beide Methoden, Percoll sowie Histopaque, sind sehr zeitaufwendig und schienen uns somit in Bezug auf die zu isolierenden Granulozyten mit einem großen Maße an Stress verbunden zu sein, da zahlreiche Zentrifugationsschritten, Temperaturveränderungen sowie bei Histopaque

eine recht aggressiven Lyse der Erythrozyten auf die Neutrophilen einwirken. Es ist bekannt, dass einige leukozytäre Integrine durch Veränderungen der Temperatur und durch mechanische Manipulation hochreguliert werden, woraus ein verändertes Interaktionsverhalten resultieren kann (28).

Da Neutrophile im Rahmen des Sedimentationsschritts durch das verwendete Agens stimuliert werden können, scheint es sinnvoll, einschrittige Isolationsmethoden vorzuziehen (43). Deshalb entschieden wir uns für die Verwendung von Polymorphprep™. Dabei handelt es sich um einen einschrittigen Ficoll-Hypaque-Gradienten. Nachdem die Fraktion der neutrophilen Granulozyten durch Zentrifugation des Gradienten gewonnen wurde, folgen lediglich noch zwei Waschschriffe. Somit stellt Polymorphprep™, rein methodisch gesehen, eine für die Granulozyten besonders schonende Isolationsmethode dar.

Zusätzlich führten wir eine Serie von Isolationen nach einer Modifikation der Methode von *Böyum* durch, die bei vielen Arbeitsgruppen Anwendung findet. Anschließend verglichen wir dann die beiden Methoden (Polymorphprep™ und Methode von *Böyum*) bezüglich ihrer Effizienz. Bei der Methode von *Böyum* (1968) wird durch die Schichtung von Vollblut auf Dextran eine Sedimentation und Agglutination der roten Blutzellen erreicht. Der Überstand wird zentrifugiert und das Pellet resuspendiert. Die sich danach anschließende Dichtegradientenzentrifugation der Suspension über FH (Lymphoprep™) bewirkt eine Trennung mononukleärer Zellen von neutrophilen Granulozyten. Durch eine anschließende hypotone Lyse werden die verbleibenden roten Blutzellen entfernt (9). Bei beiden untersuchten Methoden erfolgte eine deutliche Anreicherung von Neutrophilen im Vergleich zum Vollblut. Allerdings war im Isolat von Lymphoprep™ eine weitaus größere Verunreinigung durch andere Zellfraktionen festzustellen, und die Granulozyten-Population war bei der durchgeführten FACS-Analyse schlecht abgrenzbar. Des Weiteren war eine größere Streuung der Punktwolke im Dot-Plot festzustellen.

Außerdem war auffällig, dass die mit Lymphoprep™ isolierten Neutrophilen fast doppelt so groß waren wie bei Polymorphprep™, was wohl auf die durchgeführte hypotone Lyse der Erythrozyten im Isolat zurückzuführen ist. In Anbetracht der durchzuführenden Interaktionsversuche stellte sich die Frage, inwiefern eine veränderte Größe der isolierten Granulozyten einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten ausüben könnte. Den

Granulozyten steht zunächst eine größere Oberfläche zur Verfügung, und die Wahrscheinlichkeit, eine Bindung zu Endothelzellen einzugehen, könnte somit erhöht sein, da statistisch gesehen mehr Kontaktmöglichkeiten zu Endothelzellen bestehen. Andererseits ist es aber auch möglich, dass sie sich durch ihre Größe bedingt gegenseitig behindern. Außerdem erscheint es logisch, dass die Anzahl der Oberflächenmoleküle aufgrund der vergrößerten Oberfläche relativ gesehen vermindert ist. Es ist ebenfalls nicht auszuschließen, dass nicht nur die Größe der Zelle an sich, sondern auch das Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle durch die Isolation beeinflusst wird. Da vergrößerte neutrophile Granulozyten jedenfalls keinen physiologischen Zustand darstellen, entschieden wir uns für die Verwendung von Polymorphprep™ als Trennmedium bei der Isolation von Granulozyten aus Vollblut.

Polymorphprep™ stellt in der Tat eine schnelle und einfach durchzuführende Isolationsmethode dar. Allerdings gestaltete sich die Ernte der Granulozyten aus der korrespondierenden Bande manchmal schwierig. Obwohl bei jedem Versuch das frische Vollblut des gleichen Spenders verwendet wurde und die gleichen Rahmenbedingungen eingehalten wurden, variierte die Breite der Neutrophilen-Bande sehr stark. Bei einigen Versuchen (n=2) war die Bande so gering ausgeprägt, dass es nicht möglich war, daraus Zellen zu gewinnen, und es musste eine erneute Isolation erfolgen, ohne dass es aber zu einem Zeitverzug bezüglich der Dauer von Hypoxie und Reoxygenierung kam. Auffällig war außerdem, dass die Erythrozyten, die sich in Form eines Pellets am Boden des Reaktionsgefäßes befinden sollten, auch in variablem Ausmaß in der Interphase zwischen Boden und der Granulozyten-Bande zu finden waren. Aufgrund der Heterogenität des Bandenmusters führten wir zum Vergleich Isolationen mit dem Blut anderer Versuchspersonen durch und mussten feststellen, dass auch eine sehr starke interindividuelle Variabilität vorlag. Da die Neutrophilen-Bande bei jedem Versuch unterschiedlich stark ausgeprägt war, variierte auch die Konzentration von Granulozyten im Isolat. Folglich wurde bei jedem Versuchsansatz die Zellzahl neu bestimmt und in Hinblick auf die Interaktionsversuche adäquat verdünnt, um eine stets gleiche Anzahl von neutrophilen Granulozyten sicherzustellen. Beim letzten Versuch unserer Reihe, der letztendlich nicht in die Auswertung des Ergebnisteils miteinbezogen wurde, gab es eine Besonderheit: die Gesamtzahl an neutrophilen Granulozyten im Isolat war zu niedrig für die Durchführung eines Interaktionsversuchs. Wir gaben statt der sonst üblichen 10^5 nur

ca. 5×10^4 Neutrophile in jede Kammer der *Chamber Slides*. Bei ansonsten analoger Versuchsdurchführung stellten wir fest, dass im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Interaktionsversuchen deutlich mehr Granulozyten an den Endothelzellen adhärirten. Eventuell war die Zellzahl von 10^5 in den Standardversuchen pro Kammer zu hoch und sollte bei künftigen Interaktionsversuchen niedriger angesetzt werden. Es ist denkbar, dass sich die Granulozyten in zu hoher Dichte in ihren Adhäsionsverhalten behindern.

5.1.2 CD66b als Aktivierungsmarker

CD66b wird konstitutiv auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten exprimiert. Allerdings ist seine Expression durch Aktivierung der Neutrophilen deutlich steigerbar. Deshalb scheint CD66b ein geeigneter Marker für den Aktivationszustand von neutrophilen Granulozyten zu sein (siehe Einleitung).

Bei den von uns durchgeführten FACS-Analysen ist die Funktion von CD66b als Aktivationsmarker zwar nachweisbar, aber im Ausmaß durchaus heterogen, wenn fMLP als Stimulans dient. Bei Verwendung von H_2O_2 ist die Hochregulierung von CD66b generell schwächer ausgeprägt als bei fMLP. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass die Stimulanzien hinsichtlich unseres Versuchsaufbaus in suboptimalen Konzentrationen verwendet wurden. Die Konzentrationsangaben variieren in der Literatur stark.

Parallel zur FACS-Analyse wurde die Eignung des CD66b-Antikörpers zur Immunfärbung und Fluoreszenz-mikroskopischen Analyse der fixierten Interaktionspräparate überprüft. Bei der Auswertung der Interaktionspräparate, die einer CD66b-Immunfärbung unterzogen wurden, stellte sich zunächst das Problem des schnellen Ausbleichens des Fluoreszenzfarbstoffes (FITC), das eine detaillierte Betrachtung der gefärbten Neutrophilen nicht ermöglichte. Außerdem wurde erwartet, dass jeder Granulozyt aufgrund der basalen Expression von CD66b FITC-positive Signale zeigt. Das war aber nicht der Fall. Die Differenzierung zwischen positiven und negativen Granulozyten war ebenfalls nicht eindeutig möglich, da nur wenige Zellen deutliche Signale zeigten. Selbst Signale, die als positiv einzustufen waren, konnten nicht sicher quantifiziert werden.

Es ist denkbar, dass der verwendete Antikörper nicht speziell für unsere Anwendungen geeignet ist. Laut Herstellerangaben wird er für die Durchflusszytometrie und für formalinfixierte oder immunhistochemische Färbungen an Gefrierpräparaten empfohlen. Da unsere Präparate mit Methanol fixiert wurden, könnte darin eine mögliche Inkompatibilität liegen.

Zur Optimierung der immunzytochemischen Färbung scheint es folglich sinnvoll, ein anderes Fixans zu verwenden, da Methanol u. U. die Eigenschaften der CD66b-Antikörper-Bindung beeinflusst. Des Weiteren sollte die Konzentration des verwendeten Antikörpers variiert werden. Wenn dies ebenfalls nicht zu einem stärkeren und konstanteren Signal führt, wäre es in Erwägung zu ziehen, das CD66b-Signal durch Bindung eines wiederum markierten anti-FITC-Antikörper an den anti-mouse-FITC-Antikörper in einem weiteren Färbeschritt zu amplifizieren.

5.1.3 Verwendeter Zelltyp HDMEC

Die bisherige Forschung auf dem Gebiet der Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit Endothelzellen wurde fast ausschließlich an Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC) durchgeführt. Diese schienen für unsere Fragestellung nur bedingt geeignet, da die meisten pathophysiologischen Phänomene auf mikrovaskulärer Ebene stattfinden. Die nur sporadische Anwendung von HDMEC ist dadurch zu erklären, dass oft Schwierigkeiten bei der Isolation und Kultivierung auftreten. Es ist bekannt, dass die Mikrogefäße den Hauptteil des menschlichen Gefäßsystems darstellen und dass die ernährungsbedingten Wachstumsbedingungen, der immunologische Phänotyp, die Regulation der Oberflächenantigene sowie die Sekretion chemischer Mediatoren durch die Endothelzellen in der Mikrovaskulatur und den großen Gefäße verschieden sind (16). Untersuchungen bezüglich der Adhäsionsrate von neutrophilen Granulozyten an makrovaskulären im Vergleich zu mikrovaskulären Endothelzellen deuten auf Unterschiede bei der Regulation hin, was die funktionelle Heterogenität von Endothelzellen unterstreicht und unter gleichen Bedingungen zu unterschiedlichen Adhäsionsraten führt (82).

Bei den von uns verwendeten Zellen handelt es sich um Primärzellen, die kommerziell erworben wurden. Wir haben uns gegen eine selbst durchgeführte Isolierung entschieden, da dabei in der Regel ein schlechterer Reinheitsgrad erreicht wird, der über mehrere Passagen hinweg schnell schlechter wird. Die Verdopplungszeit der HDMEC ist jedoch relativ schwierig zu standardisieren, so dass am Versuchstag der Interaktion zum Teil an Präparaten mit unterschiedlicher Zelldichte gearbeitet werden musste. Bei den beiden Kontrollversuchsreihen zeigte sich z.B. eine höhere Konfluenz der Endothelzellen.

5.1.4 Interaktionsmodelle

Bei der Durchführung von Interaktionsversuchen *in vitro* werden entweder statische oder Flussmodelle verwendet. Die statischen Modelle basieren auf dem Prinzip der Schwerkraft. Die Neutrophilen werden in Puffer resuspendiert und auf die Endothelzellen gegeben, die sich auf Mikrotiterplatten oder in Kulturgefäßen befinden. Sobald sie in die Nähe der Endothelzellen sedimentiert sind, bildet sich abhängig vom Aktivationszustand beider Interaktionspartner eine Bindung aus oder die Granulozyten kommen auf der Endothelzelle zu liegen, ohne dass eine Bindung ausgebildet wird. Nicht oder nur schwach gebundene Granulozyten werden durch anschließende Waschschriffe entfernt.

Bei den apparativ aufwändigeren Flussmodellen wird meist die transparente Parallelplattenperfusionskammer nach *Sakariassen et al.* (97) verwendet. Die Kammer enthält eine Halterung für die Objektträger (18 x 18 mm), auf denen sich die Endothelzellen befinden. Für jede Perfusion werden 1,2 ml Suspension aus einem Reservoir durch eine Pumpe aspiriert, so dass die Flussrate kontrolliert werden kann. Die Perfusionskammer befindet sich auf einer Mikroskopbühne mit Videokamera, so dass die Interaktion aufgezeichnet und ausgewertet werden kann.

Allerdings gibt es für keines der beiden Ansätze bisher ein standardisiertes Modell. So variieren nicht nur die Anzahl der verwendeten Endothelzellen und Granulozyten pro Fläche, sondern auch die Interaktionsdauer sowie die Detektionsmethoden gebundener Granulozyten. Bei den Flussmodellen variieren außerdem die Kriterien, ab wann eine

festen Sekundäradhäsion vorliegt. Des Weiteren ist es schwer festzustellen, wie viel Zeit vergeht, bis ein aktivierter Granulozyt tatsächlich in der Interaktionskammer ankommt.

Wir entschieden uns letztendlich für ein statisches Modell, weil das Gesamtsetup mit Hypoxie und Fluss in Bezug auf die benötigte Geräteapparatur nur schwierig zu realisieren ist. Das statische Modell ist besser dazu geeignet, Präparate anzufertigen, die für nachträgliche Immunfärbungen verwendet werden können.

Vorversuche konnten zeigen, dass zwei Waschschriffe genügen, um nicht adhärenle Granulozyten von der Endothelzelloberfläche zu entfernen.

Nach der Fixierung der Interaktionspräparate werden diese mit PBS-Glycerin eingedeckt. Wenn man die Präparate in einem weiteren Schritt wieder aus- und erneut eindeckt, wie es zur immunzytochemischen Färbung nötig ist, stellt man fest, dass die Granulozyten in unveränderter Zahl stabil am Endothel haften bleiben.

5.1.5 FMLP als Stimulans

Auch bei der Verwendung von fMLP als Stimulans fehlt eine Standardisierung: die Angaben zur eingesetzten Endkonzentration und Stimulationsdauer variieren in der Literatur stark (21, 112). In unserem Versuchssetup ist zwischen unstimulierten und stimulierten neutrophilen Granulozyten bezüglich der Adhäsionsrate an Endothelzellen kein signifikanter Unterschied festzustellen, obwohl fMLP ein bekanntes Chemoattraktans ist und routinemäßig zur Stimulation von Neutrophilen eingesetzt wird (siehe Einleitung).

In Bezug auf einen Punkt wurden die unstimulierten und stimulierten neutrophilen Granulozyten allerdings nicht gleich behandelt. Nach der Inkubation mit fMLP wurde die Reaktion durch kurze Lagerung auf Eis abgestoppt, und die stimulierten Granulozyten wurden anschließend ein zusätzliches Mal gewaschen. Diese beiden Schritte wurden bei den unstimulierten Granulozyten unterlassen, da eine mögliche Aktivierung durch Zentrifugation vermieden werden sollte. Allerdings konnte retrospektiv durch die abschließende Kontrollversuchsreihe gezeigt werden, dass eine Aktivierung durch zusätzliche Zentrifugation doch eher unwahrscheinlich ist, da Granulozyten nach einer Ruhephase noch in gleichem Maße reagieren wie frisch isolierte Zellen. Fände

tatsächlich eine Aktivierung durch mechanischen Stress wie Zentrifugation statt, würden Neutrophile nach einer Ruhepause in geringerem Maße adhären. Durch die zusätzlichen Schritte, die bei den fMLP-behandelten Neutrophilen durchgeführt wurden, könnte allerdings auch ein Zellschaden entstehen. Solch ein Zellschaden ist allerdings als Erklärung für die relativ geringe Adhäsionsrate stimulierter Neutrophiler unwahrscheinlich, da die Zellen bei der Isolierung weitaus größeren Zentrifugationskräften ausgesetzt waren.

Eine weitere mögliche Erklärung für die nicht gesteigerte Adhäsion der stimulierten Neutrophilen, könnte darin begründet sein, dass beim Resuspendieren nach erfolgter Zentrifugation ein Teil der Granulozyten im verworfenen Überstand verloren ging und deshalb die Anzahl der letztendlich interagierenden neutrophilen Granulozyten geringer war. Aber auch diese Erklärung scheint unzutreffend, da das Verhältnis von adhären den unstimulierten zu stimulierten Neutrophiler relativ konstant war. Das Reagens selbst scheidet als Verursacher ebenso aus, da fMLP mehrfach neu angesetzt wurde und auch verschiedene Aliquots verwendet wurden. Die Reaktivität stimulierter Neutrophiler blieb allerdings annähernd gleich. Warum war die Aktivierung durch fMLP also nicht erfolgreich? Vielleicht induziert fMLP zwar die Aktivierung der Granulozyten, die in unserem Setup jedoch nicht sichtbar wird, da die Endothelzellen ebenfalls schon basal aktiviert sind und in gleichem Maße wie fMLP zur maximalen Aktivierung der unstimulierten Granulozyten führen. Diese würde in einer Adhäsionsrate resultieren, die mit der bei unstimulierten Neutrophilen vergleichbar ist.

5.1.6 Vorteile des verwendeten Modells

Als Vorteil des von uns vorgestellten Modells ist zunächst die einfache Handhabung zu nennen. Sowohl die Interaktionsversuche, als auch die Untersuchungen bzgl. des Einflusses von Hypoxie und Reoxygenierung auf die Adhäsionsrate von neutrophilen Granulozyten können problemlos und schnell von einer Person durchgeführt werden. Auch das apparative Setup ist leicht überschaubar, und der Versuch ist standardisierbar durchführbar. Des Weiteren sind Variationen der Endothelzellart, der Interaktionsdauer, des Stimulans oder auch bezüglich der Hypoxie- und Reoxygenierungszeiten

5. Diskussion

problemlos möglich. Unser Modell erlaubt außerdem die getrennte Beobachtung der Auswirkungen von Hypoxie und Hypoxie/Reoxygenierung, was z.B. bei einem in vivo-Modell nicht der Fall ist. In unserem Versuchsaufbau werden außerdem lediglich fest adhärierende Granulozyten betrachtet, die durch Waschschriffe nicht zu entfernen waren. Bei einem Flussmodell gestaltet sich die Abgrenzung schwierig und erfolgt mehr oder weniger willkürlich. Das Modell bietet prinzipiell die Möglichkeit, nach Abschluss der Interaktionsversuche Immunfärbungen von Oberflächenmarkern sowohl simultan an normoxischen, hypoxischen oder zusätzlich reoxygenierten Endothelzellen als auch auf Granulozyten durchzuführen.

5.2 Thematische Aspekte

5.2.1 Einfluss von Hypoxie auf die Adhäsion

Im Rahmen unserer Interaktionsversuche stellten wir fest, dass die Adhäsionsrate von neutrophilen Granulozyten an mikrovaskulären Endothelzellen erhöht ist, wenn die Endothelzellen zuvor 2,5 h gradueller Hypoxie ausgesetzt waren. Die Rolle von Hypoxie als adäquates Stimulans wurde bereits von etlichen Arbeitsgruppen wie z.B. von *Arnould et al.* beschrieben (3) und konnte durch unsere Untersuchungen bestätigt werden. Die Arbeitsgruppe von *Palluy et al.* hingegen stellte fest, dass die Adhäsionsrate von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen allein durch Hypoxie nicht steigerbar war (84). Bei deren Untersuchung wurden die Präparate nach Durchführung der Hypoxie sofort mit Glutaraldehyd fixiert, um jegliche Reoxygenierung zu vermeiden. Die Interaktion mit den isolierten neutrophilen Granulozyten fand erst im Anschluss an die Fixierung statt. Es ist also davon auszugehen, dass die Oberflächenmoleküle der Endothelzellen durch die Fixierung derart verändert wurden, dass keine adäquate Interaktion mehr möglich war.

Bei einem Großteil der Arbeiten zum Thema Adhäsion nach Hypoxie und Reoxygenierung wurde allerdings nur der Zustand nach Reoxygenierung untersucht und nicht der Einfluss von Hypoxie allein (96). Außerdem wurden bei solchen Untersuchungen größtenteils makrovaskuläre Endothelzellen verwendet. Die Versuche, die an mikrovaskulären Zellen durchgeführt wurden, untersuchten dagegen ebenfalls vorwiegend den Einfluss von Hypoxie mit zusätzlicher Reoxygenierung (110). Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Hypoxie nicht nur ein Stimulans für makrovaskuläre, sondern auch für mikrovaskuläre Zellen ist. Bezüglich zukünftiger Untersuchungen scheint daher der direkte Vergleich beider Zelllinien unter gleichen Hypoxiebedingungen interessant.

Die gesteigerte Adhäsionsrate nach Hypoxie resultiert zum einen aus einer veränderten Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen und zum anderen aus der Sekretion

von proinflammatorischen Mediatoren. So exozytieren aktivierte Endothelzellen Weibel-Pallade-Körperchen. Dadurch wird P-Selektin verstärkt auf der Zelloberfläche präsentiert. Zum gleichen Zeitpunkt wie die Hochregulierung von P-Selektin findet auch z.B. die Sekretion des proinflammatorischen PAF statt (2). Die feste Adhäsion wird dann durch ICAM-1 und CD11b/CD18 vermittelt.

In den Weibel-Pallade-Körperchen wird auch vWF gespeichert (73). Dieser wird durch Hypoxie in verstärktem Maße exozytiert (89). Auch die Untersuchung der vWF-Expression bei unseren Versuchen hat gezeigt, dass durch Hypoxie eine Aktivierung der Endothelzellen erfolgt, da vWF im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt nach Hypoxie von einer größeren Anzahl Endothelzellen ausgeschüttet wird. Dies ist mit einer verstärkten Rekrutierung von Granulozyten zu vereinbaren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde allerdings keine Quantifizierung der exozytierten Menge an vWF vorgenommen. Die Endothelzellen wurden lediglich in vWF-positive und vWF-negative Zellen unterteilt. Die Festlegung von objektiven Kriterien zur Quantifizierung des vWFs mittels Fluoreszenzmikroskop ist als schwierig anzusehen. Eine solche Quantifizierung sollte in weiteren Versuchsreihen dennoch vorgenommen werden, um vWF als Aktivationsmarker für Endothelzellen etablieren zu können. Bei *Goerge et al.* kam bei der Auswertung die Sandwich-ELISA-Technik zur Anwendung (35). Deren Studie zeigte, dass es sich bei der durch Hypoxie induzierten vWF-Freisetzung um ein akutes Ereignis handelt, das in den ersten 5 min nach Beginn der Hypoxie auftritt. Bei längerer Stimulation kommt es zu keinem weiteren Anstieg. Es konnte dabei eine 1,8 mal höhere vWF-Ausschüttung nach Hypoxie als unter Normoxie nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage, warum sich bei unseren Untersuchungen ein Teil der Endothelzellen als vWF-negativ darstellten. Handelt es sich dabei um avitale Zellen? Wie ist es dann zu erklären, dass solche Zellen nach Hypoxie vWF exozytieren oder dass vWF-negative Endothelzellen trotzdem in der Lage sind, neutrophile Granulozyten zu binden? Es scheint also unwahrscheinlich, dass die Zellen avital sind. Es ist weiterhin denkbar, dass der ausgeschüttete vWF der Endothelzellen bei manchen Endothelzellen fluoreszenzmikroskopisch nicht zur Darstellung kam. Bei zahlreichen Studien unserer Arbeitsgruppe hat sich gezeigt, dass die Färbung prinzipiell zur Darstellung des vWF auf HDMEC geeignet ist (80, 81). Es muss also ein Zusammenhang mit den

Besonderheiten unseres Versuchsetups bestehen. Um welchen Umstand es sich dabei allerdings handelte, konnte nicht eruiert werden.

In unserem Modell werden die Endothelzellen derart aktiviert, dass nicht die Bindungskapazität der Zelle selbst steigt - es werden nämlich jeweils etwa 2 Granulozyten pro Endothelzelle gebunden - sondern die Anzahl der Endothelzellen, die überhaupt Granulozyten bindet. Dies ist mit der o.g. Beobachtung zu vereinbaren, dass mehr Endothelzellen aktiviert werden und folglich mehr Endothelzellen vWF exozytieren.

5.2.2 Einfluss von Reoxygenierung auf die Adhäsion

Nach 1 h Reoxygenierung wurden weniger Granulozyten von Endothelzellen gebunden als direkt nach Hypoxie. Dieser Trend setzt sich auch nach der zweiten Reoxygenierungsphase weiter fort. Da die Anzahl der gebundenen Granulozyten pro bindender Endothelzelle nur minimal abfällt, ist aus einer verminderten Anzahl von adhärennten Granulozyten zu folgern, dass weniger Endothelzellen Granulozyten binden. Die Anzahl der zur Bindung beitragenden Endothelzellen sinkt also ab, nicht aber die Kapazität der Einzelzelle.

Die verminderte Adhäsionsrate nach Reoxygenierung könnte durch eine Schädigung der Endothelzelle durch Hypoxie und anschließende Reoxygenierung erklärt werden. Da die Adhäsionsrate nach einer Reoxygenierung von 2 h weiter abnimmt, ist davon auszugehen, dass der Zellschaden abhängig von der Reoxygenierungszeit ist und mit zunehmender Dauer der Reoxygenierung zunimmt.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben werden Granulozyten bei der Bindung an hypoxisches Endothel aktiviert. Die Schädigung der Endothelzellen vollzieht sich dann durch Sauerstoffradikale, die von Granulozyten produziert werden, die Elastase der Granulozyten, die über eine Modifikation des Zellapparats der Endothelzelle zum Schaden führt, oder durch freigesetzte proinflammatorische Mediatoren. Allerdings wird in der Literatur bei der Betrachtung verschiedener in vitro-Modelle fast ausschließlich eine Steigerung der Adhäsionsrate von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen nach Reoxygenierung beschrieben (111). Viele Ergebnisse beruhen aber auf der Untersuchung von makrovaskulären Endothelzellen oder nicht-humanen Zellen. Wie

unter 5.1.3 beschrieben spielt der verwendete Endothelzelltyp aufgrund der konstitutionellen Unterschiede und unterschiedlicher Regulation eine wichtige Rolle. Bei den häufig verwendeten HUVEC steht eine weitere Besonderheit im Vordergrund und zwar, dass es sich um Endothelzellen aus Nabelschnurvenen handelt. Wir verwendeten mit HDMEC dermale Endothelzellen, welche z.B. nur vergleichsweise wenig NO produzieren. Da es sich dabei um eine Art Schutz gegenüber Zellschädigungen durch Hypoxie/Reoxygenierung handelt, sind HDMEC recht anfällig dafür. *Natarajan et al.*, die ebenfalls eine dermale, mikrovaskuläre Endothelzelllinie verwendeten (79), beobachteten allerdings eine höhere Adhäsionsrate nach Reoxygenierung. So wird beschrieben, dass im Vergleich zur Kontrolle sogar 500-mal so viele Granulozyten an reoxygenierten Endothelzellen adhäreren. Diese Adhäsionssteigerung beruhte auf einer verstärkten Transkription, welche durch die nach Reoxygenierung freigesetzten Sauerstoffradikale vermittelt wurde. Bezüglich des verwendeten Modells finden sich aber einige Unterschiede im Vergleich zu unserem Modell. Die Hypoxiedauer betrug 6 h, woran sich 2 h Reoxygenierung anschlossen. Leider wurde auch bei dieser Versuchsreihe die Interaktion direkt nach Hypoxie nicht untersucht. Die Endothelzellen wurden 10 min lang mit 1% O₂ begast. Die Sauerstoffsättigung betrug nach 30 min noch 3% und blieb über 24 h konstant. Bei unserem Modell hingegen verwendeten wir ein Gemisch aus 95% N₂ und 5% CO₂ mit einem Durchfluss von 1 l / min. Wir erreichten zum Vergleich nach 60 min eine Sauerstoffsättigung von 30 mmHg. Dadurch simulierten wir im Gegensatz zu dem Model von *Natarajan et al.* eine graduelle Hypoxie. Es stellt sich die Frage, inwiefern die Untersuchungsergebnisse vergleichbar sind und ob die sehr unterschiedlichen Ergebnisse allein durch den Versuchsaufbau bedingt sind. Jedenfalls lieferten unsere Untersuchungen reproduzierbare Ergebnisse, die zumindest belegen, dass die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an mikrovaskulären Endothelzellen unter bestimmten Umständen nach Reoxygenierung vermindert ist, was entweder auf einer Schädigung oder Inaktivierung der Endothelzellen zu beruhen scheint.

5.2.3 Reaktionsfähigkeit der Neutrophilen

Unsere Kontrollversuchsreihen zeigten, dass die neutrophilen Granulozyten auch nach längerer Ruhephase noch reaktionsfähig waren. Die Adhäsionsrate war an allen untersuchten Kontrollzeitpunkten vergleichbar. Die Granulozyten waren auch Stunden nach der Isolation noch zur Interaktion fähig, solange sie in einem geeigneten Puffer aufbewahrt wurden. Des Weiteren war im Vergleich zu einem späteren Kontrollzeitpunkt direkt nach Isolation auch keine verstärkte Adhäsionsrate zu verzeichnen, was z.B. nach Aktivierung der Granulozyten durch die Isolation denkbar gewesen wäre.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Beobachtungen schließen, dass sich die Reaktivität der Granulozyten im Laufe der Versuche nicht wesentlich veränderte. Folglich beruhte die verminderte Adhäsionsrate nach Hypoxie/Reoxygenierung auf Endothelzellebene. Ebenso schien auch die verstärkte Adhäsion nach Hypoxie primär durch die Endothelzellen vermittelt, da fMLP als Granulozyten-Stimulans keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsionsrate ausübte.

Vergleichbare Studien bzgl. der Reaktionsfähigkeit der isolierten Granulozyten in Abhängigkeit von der Standzeit konnten trotz ausführlicher Literaturrecherche nicht gefunden werden.

5.2.4 Matrixadhärenz

Die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an der Matrix erwies sich während der Versuchsauswertung als sehr interessant, obwohl unserer Augenmerk nicht primär darauf gerichtet war. Erwartungsgemäß adhärten nicht alle Granulozyten nur an den Endothelzellen, sondern auch an der die Endothelzellen umgebenden Matrix. Überraschend hingegen war die Beobachtung, dass das Ausmaß der Adhäsion der Granulozyten auf Zelloberfläche und Matrix einander weitgehend entsprach. Nach Hypoxie adhärten mehr Granulozyten an der Matrix als unter Normoxie. Wurden die Objektträger nach Hypoxie 1 h oder 2 h reoxygeniert, lag die Adhäsionsrate der

5. Diskussion

Granulozyten an der Matrix unter derjenigen nach Hypoxie und sogar unter den Werten zum Kontrollzeitpunkt. Entweder werden diese Effekte durch die Endothelzelle selbst vermittelt oder Hypoxie bzw. Hypoxie/Reoxygenierung haben einen direkten Einfluss auf die Matrixproteine. So ist es denkbar, dass von der Endothelzelle exozytierte Mediatoren die Affinität der Granulozyten zur Zellkulturgefäß-Oberfläche erhöhen und dort auch die Adhäsion der Granulozyten vermitteln. Verschiedene Oberflächenmoleküle werden während der Adhäsionskaskade von der Zelle abgegeben (siehe Einleitung). Diese Moleküle befinden sich anschließend auf der Matrix und könnten dort aktivierte Granulozyten binden. Aufnahmen mit dem Rasterkraft-Mikroskop zeigen die Topographie der Matrix und verdeutlichen, dass sich auf der Matrix Proteine befinden, welche die Adhäsion von Granulozyten vermitteln könnten.

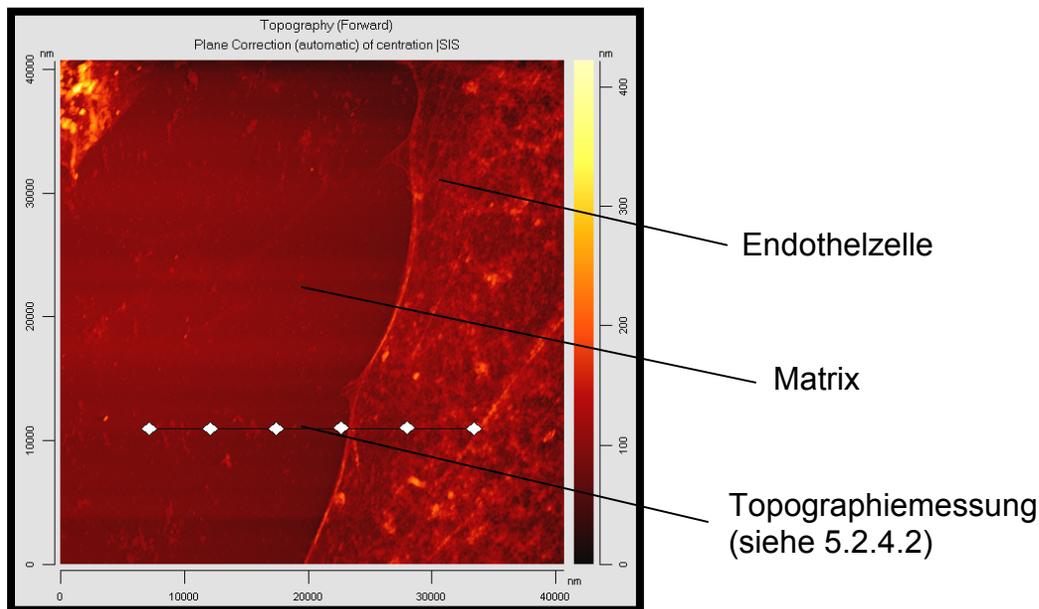


Abb. 5.2.4.1: AFM-Aufnahme einer Endothelzelle mit angrenzender Matrix

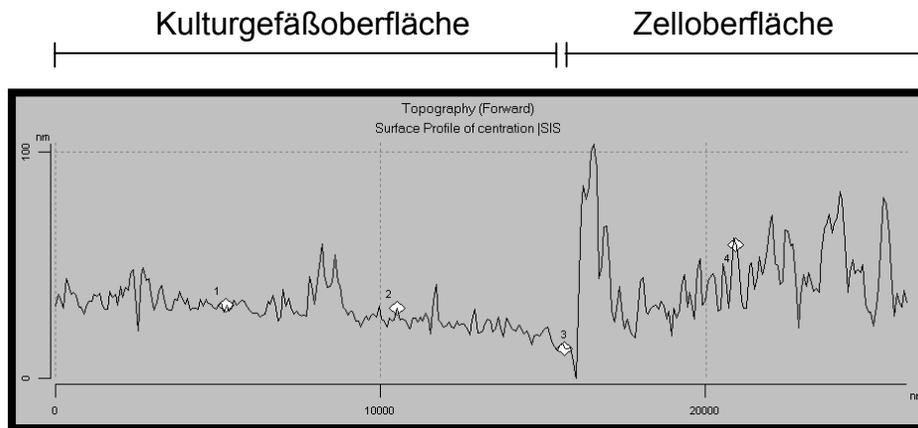


Abb. 5.2.4.2: Topografie von Matrix und Zelle (vgl. Abb. 5.2.4.1)

Diese Matrixproteine werden u.a. von den Endothelzellen sezerniert (s. u.). Die Endothelzellen retrahieren sich außerdem im Laufe der Kultivierung, was man mikroskopisch verfolgen kann. Dabei hinterlassen sie ebenfalls Proteine auf der Matrix. *De Vree et al.* untersuchten in einer ihrer Arbeiten die Auswirkungen einer photodynamischen Behandlung von Endothelzellen auf die Adhäsionsrate von neutrophilen Granulozyten (22). Dabei war eine dramatische Veränderung der Morphologie der Endothelzellen festzustellen, welche den Veränderungen unserer Endothelzellen ähnelte, aber deutlich stärker ausgeprägt war. Zum einen zeigte sich eine Retraktion der Endothelzellen und zum anderen waren große Membranvesikel zu beobachten. Dadurch wurden große Bereiche subendothelialer Matrix freigelegt, woran die neutrophilen Granulozyten in großem Maße adhärten, sogar mehr als an den Endothelzellen selbst. Die Adhäsionsrate stieg, je mehr Matrix exponiert wurde. Die Morphologie der Endothelzellen zeigte nach der photodynamischen Behandlung eine große Ähnlichkeit mit Endothelzellen, die mit tertiärem Butylhydroperoxid behandelt worden waren, wie eine Studie von *Patel et al.* zeigte (86). Die Arbeitsgruppe konnte außerdem nachweisen, dass die Vesikel von den Endothelzellen abgeschnürt wurden und PAF-ähnliche Moleküle enthielten, die die Adhärenz von Granulozyten an Gelatine stimulierten. Dafür schien die Aktivierung des $\beta 2$ -Integrin-Rezeptors durch Interaktion mit der Matrix vonnöten zu sein (22, 86). Die subendotheliale Matrix, die von Endothelzellen in Kultur an der basolateralen Seite

5. Diskussion

produziert wird, besteht aus verschiedenen Matrixproteinen wie Kollagen, Proteoglykanen, Laminin, Fibronectin und Elastin. Es konnte bereits gezeigt werden, dass mehrere dieser Proteine bei der Adhärenz von Neutrophilen eine Rolle spielen (13, 22).

5.3 Ausblick

Zuletzt möchte ich die Bedeutung unserer in vitro-Ergebnisse anhand eines klinischen Beispiels verdeutlichen. Im Rahmen der Wiederherstellungschirurgie werden freie Lappen zur plastischen Deckung von Gewebedefekten transplantiert. Obwohl ein Großteil dieser Lappenplastiken letztendlich erfolgreich verläuft, ist dennoch der Verlust des Lappens möglich.

Chirurgisch gesehen wird zunächst der zu transplantierende Lappen aus dem Gewebsverband gelöst und unter Abklemmung der Gefäßzufuhr abgehoben. Im nächsten Schritt wird der ischämische Lappen in den zu versorgenden Gewebedefekt eingefügt. Dabei werden die Gefäße des Lappens mit lokalen Gefäßen anastomosiert. Wird die korrekt angelegte Anastomose freigegeben, erfolgt die Reperfusion des Lappens. Eine wichtige Frühkomplikation stellt die lokale Thrombose an der Anastomosestelle dar, woraus dann eine zweite Ischämiephase resultiert.

Auf zellulärer Ebene bedeutet Ischämie zunächst ein Absinken der Sauerstoffkonzentration und somit die Umstellung auf einen anaeroben Zellstoffwechsel. Das bedeutet für die Zelle den Verbrauch von ATP-Vorräten und dadurch bedingt das Versagen von Membranpumpen. Entzündungsfördernde Mediatoren, Metabolite sowie Toxine sammeln sich an und zerstören letztendlich intrazelluläre Strukturen. Dauert dieser Zustand an, führt er letztendlich zur Nekrose der hypoxischen Zelle. Ein Verlust des Lappens auf der Stufe der primären Ischämie vollzieht sich praktisch nie, dennoch sind die pathophysiologischen Folgen meistens verantwortlich für den späteren Lappenverlust (15). Die Schwere des Schadens durch die primäre Ischämie ist ihrer Dauer direkt proportional (75). Allerdings ist das Ausmaß der Schädigung abhängig von Stoffwechselrate der Zellen und dem Gewebetyp. So sind z.B. Skelettmuskel und intestinale Mukosa gegenüber Hypoxie empfindlicher als Haut oder Knochen, die 3 h Hypoxie ohne große Probleme überdauern können.

Tritt nach der Ischämiephase die Reperfusion ein, ist das Schicksal des Lappens abhängig vom Ausmaß der Schädigung, die während der primären Ischämie erfolgt ist. Dies gilt sowohl für die Anastomosestelle, als auch für die Zellen der Mikrozirkulation,

wo der Schaden oft entzündungsbedingt ist. Das Gewebe kann sich bei geringer Schädigung weitgehend erholen, und der Lappen trägt nur einen minimalen Schaden davon. Die Reperfusion kann aber auch tödlich für den Lappen sein, da die Wiederherstellung des Blutflusses eine Zufuhr von Substraten bedeutet. Als Reperfusionserletzung an sich wird die Schädigung von Zellen durch aktivierte neutrophile Granulozyten bezeichnet (siehe Einleitung). Entzündungsmediatoren werden lokal produziert und freie Sauerstoffradikale sowie proteolytische Enzyme werden freigesetzt. Die Reperfusionserletzung tritt dann auf, wenn der wieder einsetzende Blutfluss Substrate für eine Entzündungsreaktion liefert, die letztendlich den Lappen zerstört. Die Reperfusion erlaubt außerdem die Einschwemmung zusätzlicher Neutrophiler und anderer Blutzellen. Die Kapillaren werden durch Schwellung der geschädigten Endothelzellen verengt. Außerdem werden in verstärktem Maße vasokonstriktische Substanzen anstelle von Vasodilatoren wie NO (94) freigesetzt. Die adrenerge Kontrolle des vaskulären Tonus geht verloren, und es bildet sich ein interstitielles Ödem aus. Allein die Anwesenheit von unaktivierten Leukozyten kann aufgrund des Durchmessers dieser Zellen den Blutfluss der Mikrozirkulation behindern (109). Aktivierte neutrophile Granulozyten bilden Pseudopodien aus, die für Migration und Phagozytose vonnöten sind. Allerdings erschweren diese die Passage durch die Kapillaren zusätzlich (67). Die erhöhte Anzahl von Adhäsionsmolekülen auf Neutrophilen könnte die Bildung von Aggregaten erleichtern, wie sie in im Rahmen von Ischämie/Reperfusion vorgefunden werden, und den Blutfluss in der Mikrozirkulation behindern (39). Arteriovenöse Shunts öffnen sich, und das Blut umfließt damit die kapilläre Mikrozirkulation. Damit bleibt dem distalen Gewebe eine Versorgung mit Nährstoffen verwehrt. Wenn dieser Punkt erreicht ist, ist eine Umkehrung des Prozesses und eine Rettung des Lappens schwierig.

Bisher wurden zahlreiche, meist pharmakologische, Therapieansätze untersucht und miteinander verglichen. Dazu gehören verschiedene Antikoagulanzen, Thrombolytika, entzündungshemmende Substanzen, freie Radikalfänger, Vasodilatoren oder Immunmodulatoren. Leider war es bisher nicht möglich, einen Durchbruch bezüglich der Behandlung der Reperfusionserletzung zu erzielen. Die untersuchten Substanzen zeigten entweder eine ungenügende Wirkung oder der klinische Einsatz war nicht in ausreichenden Maße möglich. Es scheint vonnöten, die genaue Pathophysiologie und

5. Diskussion

die beteiligten Mechanismen weiter zu untersuchen, zu verstehen und letztendlich neue Therapieansätze zu entdecken. Unser Modell bietet einen alternativen Ansatz, die diskutierten Substanzen in vitro hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Endothelzell-Granulozyten-Interaktion unter Normoxie, Hypoxie oder Hypoxie/Reoxygenierung zu charakterisieren.

6. Anhang

Statistische Auswertung

In den nachfolgenden Tabellen sind die Ergebnisse des durchgeführten t-Tests für verbundene Stichproben aufgeführt. Die Nullhypothese H_0 wurde dabei folgendermaßen definiert:

H_0 = es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten zweier gegeneinander getesteten, verbundenen Stichproben zu verschiedenen Versuchszeitpunkten.

Das Signifikanzniveau α wurde auf 5% festgelegt. Aufgrund der zweiseitigen Fragestellung wurde bei $p \leq 0,025$ die Nullhypothese widerlegt, bei $p > 0,025$ bestätigt.

Legende:

D = Betrag des arithmetischen Mittels der Differenzen der korrespondierenden Messwerte an den zwei gegeneinander zu testenden Versuchszeitpunkten

S = Standardabweichung der Differenzen

t = t-Wert

t_s = Signifikantsschranke des t-Werts, abhängig von den Freiheitsgraden der jeweiligen Versuchsreihe

p = Überschreitungswahrscheinlichkeit

6. Anhang

6.1 Versuchsreihe V1-6

6.1.1 Granulozytenadhärenz

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{2,5}	78,17	95,07	2,01	2,57	beibehalten	
H _{2,5} – HR _{3,5}	136,50	66,86	5,00	2,57	verwerfen	0,004102
HR _{3,5} – HR _{4,5}	3,17	52,23	0,15	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{3,5}	58,33	86,49	1,65	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	61,50	90,86	1,66	2,57	beibehalten	
stimulierte Granulozyten						
K _{2,5} – H _{2,5}	81,83	67,95	2,95	2,57	verwerfen	0,031879
H _{2,5} – HR _{3,5}	122,00	90,91	3,29	2,57	verwerfen	0,021778
HR _{3,5} – HR _{4,5}	4,83	37,83	0,31	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{3,5}	40,17	44,73	2,20	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	45,00	49,51	2,23	2,57	beibehalten	

6.1.2 Granulozytenadhärenz an Endothelzellen und Matrix

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{2,5}	64,00	110,10	1,42	2,57	beibehalten	
H _{2,5} – HR _{3,5}	164,83	74,92	5,39	2,57	verwerfen	0,002968
HR _{3,5} – HR _{4,5}	11,50	78,43	0,36	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{3,5}	100,83	93,21	2,65	2,57	verwerfen	0,045430
K _{2,5} – HR _{4,5}	89,33	64,13	3,41	2,57	verwerfen	0,018995
stimulierte Granulozyten						
K _{2,5} – H _{2,5}	90,00	83,49	2,64	2,57	verwerfen	0,045952
H _{2,5} – HR _{3,5}	175,33	90,23	4,76	2,57	verwerfen	0,005060
HR _{3,5} – HR _{4,5}	2,67	31,12	0,21	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{3,5}	85,33	48,74	4,29	2,57	verwerfen	0,007799
K _{2,5} – HR _{4,5}	88,00	48,95	4,40	2,57	verwerfen	0,006995

6. Anhang

6.1.3 Anteil der Endothelzellen, die eine Bindung eingehen

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{2,5}	1,00	4,60	0,53	2,57	beibehalten	
H _{2,5} – HR _{3,5}	4,33	3,62	2,94	2,57	verwerfen	0,032391
HR _{3,5} – HR _{4,5}	0,42	2,56	0,40	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{3,5}	5,33	2,82	4,63	2,57	verwerfen	0,005691
K _{2,5} – HR _{4,5}	5,75	3,91	3,60	2,57	verwerfen	0,015482
stimulierte Granulozyten						
K _{2,5} – H _{2,5}	0,25	3,79	0,16	2,57	beibehalten	
H _{2,5} – HR _{3,5}	5,92	4,40	3,30	2,57	verwerfen	0,021585
HR _{3,5} – HR _{4,5}	0,25	1,29	0,47	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{3,5}	5,67	7,15	1,94	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	5,92	7,57	1,91	2,57	beibehalten	

6.1.4 Adhärente Granulozyten pro Endothelzelle

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{2,5}	0,10	0,43	0,57	2,57	beibehalten	
H _{2,5} – HR _{3,5}	0,17	0,34	1,21	2,57	beibehalten	
HR _{3,5} – HR _{4,5}	0,28	0,34	2,06	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{3,5}	0,27	0,27	2,39	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	0,55	0,47	2,88	2,57	verwerfen	0,034635
stimulierte Granulozyten						
K _{2,5} – H _{2,5}	0,03	0,52	0,16	2,57	beibehalten	
H _{2,5} – HR _{3,5}	0,48	0,50	2,35	2,57	beibehalten	
HR _{3,5} – HR _{4,5}	0,10	0,49	0,50	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{3,5}	0,45	0,70	1,57	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	0,35	0,76	1,12	2,57	beibehalten	

6. Anhang

6.1.5 VWF-Expression

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{2,5}	9,67	6,41	3,70	2,57	verwerfen	0,014073
H _{2,5} – HR _{3,5}	2,00	15,51	0,32	2,57	beibehalten	
HR _{3,5} – HR _{4,5}	4,75	14,95	0,78	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{3,5}	7,67	10,84	1,73	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	12,42	22,90	1,33	2,57	beibehalten	
stimulierte Granulozyten						
K _{2,5} – H _{2,5}	11,50	11,93	2,36	2,57	beibehalten	
H _{2,5} – HR _{3,5}	1,67	11,67	0,35	2,57	beibehalten	
HR _{3,5} – HR _{4,5}	1,33	13,62	0,24	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{3,5}	9,83	12,24	1,97	2,57	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	11,17	24,73	1,11	2,57	beibehalten	

6. Anhang

6.2 Versuchsreihe V7-9

6.2.1 Granulozytenadhärenz

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{2,5}	651,33	99,95	11,29	4,30	verwerfen	0,007758
H _{2,5} – HR _{4,5}	840,67	194,98	7,47	4,30	verwerfen	0,017463
HR _{4,5} – K _{4,5}	269,67	120,93	3,86	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	189,33	221,75	1,48	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{4,5}	80,33	248,89	0,56	4,30	beibehalten	
stimulierte Granulozyten						
K _{2,5} – H _{2,5}	813,67	244,96	5,75	4,30	verwerfen	0,028909
H _{2,5} – HR _{4,5}	997,00	330,12	5,23	4,30	verwerfen	0,034656
HR _{4,5} – K _{4,5}	435,00	15,88	47,46	4,30	verwerfen	0,000444
K _{2,5} – HR _{4,5}	183,33	286,87	1,11	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{4,5}	251,67	271,14	1,61	4,30	beibehalten	

6.2.2 Granulozytenadhärenz an Endothelzellen und Matrix

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{2,5}	648,00	105,73	10,62	4,30	verwerfen	0,008758
H _{2,5} – HR _{4,5}	841,33	188,90	7,71	4,30	verwerfen	0,016392
HR _{4,5} – K _{4,5}	269,33	126,87	3,68	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	193,33	220,41	1,52	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{4,5}	76,00	249,65	0,53	4,30	beibehalten	
stimulierte Granulozyten						
K _{2,5} – H _{2,5}	816,00	246,20	5,74	4,30	verwerfen	0,029029
H _{2,5} – HR _{4,5}	1002,33	330,12	5,26	4,30	verwerfen	0,034308
HR _{4,5} – K _{4,5}	438,67	12,34	61,56	4,30	verwerfen	0,000264
K _{2,5} – HR _{4,5}	186,33	286,53	1,13	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{4,5}	252,33	274,19	1,59	4,30	beibehalten	

6. Anhang

6.2.3 Anteil der Endothelzellen, die Bindung eingehen

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{2,5}	2,00	1,80	1,92	4,30	beibehalten	
H _{2,5} – HR _{4,5}	2,33	0,76	5,29	4,30	verwerfen	0,033908
HR _{4,5} – K _{4,5}	1,00	1,32	1,31	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	0,33	1,16	0,50	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{4,5}	1,33	1,04	2,22	4,30	beibehalten	
stimulierte Granulozyten						
K _{2,5} – H _{2,5}	0,50	0,50	1,73	4,30	beibehalten	
H _{2,5} – HR _{4,5}	2,33	1,04	3,88	4,30	beibehalten	
HR _{4,5} – K _{4,5}	1,33	2,52	0,92	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	1,83	1,04	3,05	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{4,5}	0,50	1,80	0,48	4,30	beibehalten	

6.2.4 Adhärente Granulozyten pro Endothelzelle

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{2,5}	0,13	0,51	0,45	4,30	beibehalten	
H _{2,5} – HR _{4,5}	0,67	0,55	2,10	4,30	beibehalten	
HR _{4,5} – K _{4,5}	0	0	0	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	0,53	0,15	6,05	4,30	verwerfen	0,026271
K _{2,5} – K _{4,5}	0,53	0,15	6,05	4,30	verwerfen	0,026271
stimulierte Granulozyten						
K _{2,5} – H _{2,5}	0,20	0,40	0,87	4,30	beibehalten	
H _{2,5} – HR _{4,5}	0,10	0,27	0,66	4,30	beibehalten	
HR _{4,5} – K _{4,5}	0,03	0,06	1,00	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	0,30	0,17	3,00	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{4,5}	0,27	0,12	4,00	4,30	beibehalten	

6. Anhang

6.2.5 VWF-Expression

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{2,5}	2,33	12,50	0,32	4,30	beibehalten	
H _{2,5} – HR _{4,5}	7,83	11,45	1,19	4,30	beibehalten	
HR _{4,5} – K _{4,5}	4,67	5,03	1,61	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	10,17	8,75	2,01	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{4,5}	5,50	3,78	2,52	4,30	beibehalten	
stimulierte Granulozyten						
K _{2,5} – H _{2,5}	7,67	11,30	1,18	4,30	beibehalten	
H _{2,5} – HR _{4,5}	3,83	8,01	0,83	4,30	beibehalten	
HR _{4,5} – K _{4,5}	0,67	0,58	2,00	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – HR _{4,5}	3,83	9,07	0,73	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{4,5}	3,17	8,51	0,65	4,30	beibehalten	

6. Anhang

6.3 Versuchsreihe V10-12

6.3.1 Granulozytenadhärenz

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{5,5} aPMN	624,67	14,01	77,22	4,30	verwerfen	0,000168
K _{2,5} – H _{5,5} fPMN	889,67	479,35	3,22	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – H _{5,5} fPMN	265,00	467,15	0,98	4,30	beibehalten	
K _{5,5} aPMN – K _{5,5} fPMN	70,00	72,52	1,67	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – K _{5,5} aPMN	562,33	36,12	26,97	4,30	verwerfen	0,001372
H _{5,5} fPMN – K _{5,5} fPMN	897,33	514,40	3,02	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} aPMN	62,33	39,80	2,71	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} fPMN	7,67	35,22	0,38	4,30	beibehalten	
stimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{5,5} aPMN	659,00	112,87	10,11	4,30	verwerfen	0,009637
K _{2,5} – H _{5,5} fPMN	838,33	388,01	3,74	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – H _{5,5} fPMN	179,33	278,57	1,12	4,30	beibehalten	
K _{5,5} aPMN – K _{5,5} fPMN	13,00	66,78	0,34	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – K _{5,5} aPMN	675,67	190,12	6,16	4,30	verwerfen	0,025390
H _{5,5} fPMN – K _{5,5} fPMN	842,00	529,39	2,76	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} aPMN	16,67	77,37	0,37	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} fPMN	3,67	142,22	0,05	4,30	beibehalten	

6.3.2 Granulozytenadhärenz an Endothelzellen und Matrix

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{5,5} aPMN	628,67	21,39	50,92	4,30	verwerfen	0,000385
K _{2,5} – H _{5,5} fPMN	897,00	485,08	3,20	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – H _{5,5} fPMN	268,33	465,08	1,00	4,30	beibehalten	
K _{5,5} aPMN – K _{5,5} fPMN	84,00	87,74	1,66	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – K _{5,5} aPMN	555,00	40,93	23,49	4,30	verwerfen	0,001808
H _{5,5} fPMN – K _{5,5} fPMN	907,33	517,12	3,04	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} aPMN	73,67	54,52	2,34	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} fPMN	10,33	33,29	0,54	4,30	beibehalten	
stimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{5,5} aPMN	653,33	114,61	9,87	4,30	verwerfen	0,010102
K _{2,5} – H _{5,5} fPMN	844,00	399,40	3,66	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – H _{5,5} fPMN	190,67	287,19	1,15	4,30	beibehalten	
K _{5,5} aPMN – K _{5,5} fPMN	3,33	78,56	0,07	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – K _{5,5} aPMN	663,00	180,14	6,38	4,30	verwerfen	0,023736
H _{5,5} fPMN – K _{5,5} fPMN	850,33	536,43	2,75	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} aPMN	9,67	67,47	0,25	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} fPMN	6,33	137,61	0,08	4,30	beibehalten	

6. Anhang

6.3.3 Anteil der Endothelzellen, die Bindung eingehen

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{5,5} aPMN	0,67	0,58	2,00	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – H _{5,5} fPMN	0,33	2,57	0,23	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – H _{5,5} fPMN	0,33	2,02	0,29	4,30	beibehalten	
K _{5,5} aPMN – K _{5,5} fPMN	0,17	1,26	0,23	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – K _{5,5} aPMN	1,67	0,76	3,78	4,30	beibehalten	
H _{5,5} fPMN – K _{5,5} fPMN	1,50	0	Inf.0,00	4,30	verwerfen	0,000000
K _{2,5} – K _{5,5} aPMN	1,00	1,32	1,31	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} fPMN	1,17	2,57	0,79	4,30	beibehalten	
stimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{5,5} aPMN	1,00	0,50	3,46	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – H _{5,5} fPMN	0,83	0,29	5,00	4,30	verwerfen	0,037750
H _{5,5} aPMN – H _{5,5} fPMN	0,17	0,76	0,38	4,30	beibehalten	
K _{5,5} aPMN – K _{5,5} fPMN	0,33	1,53	0,38	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – K _{5,5} aPMN	1,33	1,61	1,44	4,30	beibehalten	
H _{5,5} fPMN – K _{5,5} fPMN	0,83	1,26	1,15	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} aPMN	0,33	1,16	0,50	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} fPMN	0	1,00	0	4,30	beibehalten	

6.3.4 Adhärente Granulozyten pro Endothelzelle

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{5,5} aPMN	0,03	0,35	0,16	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – H _{5,5} fPMN	0,27	0,47	0,98	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – H _{5,5} fPMN	0,30	0,50	1,04	4,30	beibehalten	
K _{5,5} aPMN – K _{5,5} fPMN	0,97	1,23	1,36	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – K _{5,5} aPMN	0,33	0,61	0,95	4,30	beibehalten	
H _{5,5} fPMN – K _{5,5} fPMN	0,33	0,42	1,39	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} aPMN	0,37	0,78	0,82	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} fPMN	0,60	0,46	2,27	4,30	beibehalten	
stimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{5,5} aPMN	0,13	1,27	0,18	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – H _{5,5} fPMN	0,07	1,51	0,08	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – H _{5,5} fPMN	0,07	0,38	0,31	4,30	beibehalten	
K _{5,5} aPMN – K _{5,5} fPMN	0,60	1,35	0,77	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – K _{5,5} aPMN	0,40	1,04	0,67	4,30	beibehalten	
H _{5,5} fPMN – K _{5,5} fPMN	0,27	0,31	1,51	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} aPMN	0,27	0,25	1,84	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} fPMN	0,33	1,53	0,38	4,30	beibehalten	

6. Anhang

6.3.5 VWF-Expression

unstimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{5,5} aPMN	24,50	5,77	7,36	4,30	verwerfen	0,017968
K _{2,5} – H _{5,5} fPMN	26,33	14,97	3,05	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – H _{5,5} fPMN	1,83	9,70	0,33	4,30	beibehalten	
K _{5,5} aPMN – K _{5,5} fPMN	0,67	5,69	0,20	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – K _{5,5} aPMN	9,00	6,87	2,27	4,30	beibehalten	
H _{5,5} fPMN – K _{5,5} fPMN	11,50	7,76	2,57	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} aPMN	15,50	10,58	2,54	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} fPMN	14,83	15,63	1,64	4,30	beibehalten	
stimulierte Granulozyten						
	D	S	t	t _s	H ₀	p
K _{2,5} – H _{5,5} aPMN	17,17	9,28	3,21	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – H _{5,5} fPMN	16,17	12,91	2,17	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – H _{5,5} fPMN	1,00	8,32	0,21	4,30	beibehalten	
K _{5,5} aPMN – K _{5,5} fPMN	0,83	1,89	0,76	4,30	beibehalten	
H _{5,5} aPMN – K _{5,5} aPMN	6,17	3,33	3,21	4,30	beibehalten	
H _{5,5} fPMN – K _{5,5} fPMN	6,00	8,68	1,20	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} aPMN	11,00	6,00	3,18	4,30	beibehalten	
K _{2,5} – K _{5,5} fPMN	10,17	7,78	2,26	4,30	beibehalten	

7. Literaturverzeichnis

- 1 Arnaout MA (1990): Structure and function of the leukocyte adhesion molecule CD11/CD18. *Blood* 75: 1037-1050
- 2 Arnould T, Michiels C, Remacle J (1993): Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involvement of PAF, CD18/CD11b and ICAM-1. *Am J Physiol* 264: 1102-1110
- 3 Arnould T, Michiels C, Remacle J (1994): Hypoxic human umbilical vein endothelial cells induce activation of adherent polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 83: 3705-3716
- 4 Arnould T, Michiels C, Janssens D, Delaive E, Remacle J (1995): Hypoxia induces PMN adherence to umbilical vein endothelium. *Cardiovasc Res.* 6: 1009-1016
- 5 Arnould T, Thibaut-Vercruyssen R, Bouaziz N, Dieu M, Remacle J, Michiels C (2001): PGF_{2α}, a prostanoid released by endothelial cells activated by hypoxia, is a chemoattractant candidate for neutrophil recruitment. *Am J Pathol.* 159: 345-357
- 6 Atherton A, Born GVR (1973): Relationship between the velocity of rolling granulocytes and that of the blood flow in venules. *J Physiol.* 233: 157-165
- 7 Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M (1991): Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of neutrophil-activating peptides 1/interleukin 8. *J Exp Med.* 173:771-774
- 8 Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC (1993): L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* 366: 695-698
- 9 Berkow RL, Tzeng DY, Williams LV, Baehner RL (1983): The comparative responses of human polymorphonuclear leukocytes obtained by counterflow centrifugal elutriation and Ficoll-Hypaque density centrifugation. I. Resting volume, stimulus-induced superoxide production, and primary and specific granule release. *J Lab Clin Med* 102: 732-742
- 10 Berkow RL, Weisman SJ, Tzeng D, Haak RA, Kleinhans FW, Barefoot S, Baehner RL (1984): Comparative responses of human polymorphonuclear leukocytes obtained by counterflow centrifugal elutriation and Ficoll-Hypaque density centrifugation. II. Membrane potential changes, membrane receptor analysis, membrane fluidity, and analysis of the effects of the preparative technique. *J Lab Clin Med.* 104: 698-710

7. Literaturverzeichnis

- 11 Berlin C, Berg EL, Brinskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC (1993): $\alpha 4\beta 7$ integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74: 185-195
- 12 Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, Klunk D, Schleimer RP (1991): Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular Endothelial cells: Contribution of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med.* 173: 1553-1556
- 13 Borel JP, Bellon G, Garnotel R, Monboisse JC (1993): Adhesion and activation of human neutrophils on basement membrane molecules. *Kidney Int.* 43: 26-29
- 14 Carlos TM, Harlan JM (1994): Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101
- 15 Carroll WR, Esclamado RM (2000): Ischemia/reperfusion injury In microvascular surgery. *Head & Neck* 22: 700-713
- 16 Chung KY, Chang NS, Park YK, Lee KH (2002): Effects of ultraviolet light on the expression of adhesion molecules and T lymphocyte adhesion to human dermal microvascular endothelial cells. *Yonsei Med J.* 43: 165-174
- 17 Closse C, Seigneur M, Renard M, Pruvost A, Dumain P, Belloc F, Boisseau MR (1996): Influence of hypoxia and hypoxia-reoxygenation on endothelial P-selectin expression. *Haemostasis* 26: 177-181
- 18 Dallegri F, Ottonello L (1997): Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm. Res.* 46: 382-391
- 19 Dang PM, Rais S, Hakim J, Périnanin A (1995): Redistribution of protein kinase C isoforms in human neutrophils stimulated by formyl peptides and phorbol myristate acetate. *Biochem Biophys Res Commun.* 212: 664-672
- 20 Davies-Cox EV, Laffafian I, Hallett MB (2001): Control of Ca^{2+} influx in human neutrophils by inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) binding: differential effects of micro-injected IP3 receptor antagonists. *Biochem. J.* 355: 139-143
- 21 De Haas M, Kerst JM, van der Schoot CA, Calafat J, Hack CE, Nuijens JH, Roos D, van Oers RHJ, von dem Borne AE (1994): Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: Analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. *Blood* 84: 3885-3894
- 22 De Vree WJA, Fontijne-Dorsman ANRD, Koster JF, Sluiter W (1996): Photodynamic treatment of human endothelial cells promotes the adherence of neutrophils in vitro. *Br J Cancer* 73: 1335-1340

7. Literaturverzeichnis

- 23 Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA (1991): Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 65: 961-971
- 24 Ducker TP, Skubitz KM (1992): Subcellular localization of CD66, CD67 and NCA in human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 52: 11-16
- 25 Dunlop LC, Skinner MP, Bendall LJ, Favalaro EJ, Castaldi PA, Gorman JJ, Gamble JR, Vadas MA, Berndt MC (1992): Characterization of GMP-140 (P-Selectin) as a circulating plasma protein. *J Exp Med.* 175: 1147-1150
- 26 Eades-Perner AM, Thompson J, van der Putten H, Zimmermann W (1998): Mice transgenic for the human CGM6 gene express its product, the granulocyte marker CD66b, exclusively in granulocytes. *Blood* 91: 663-672
- 27 Fadeel B, Ahlin A, Henter JI, Orrenius S, Hampton MB: Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by active oxygen species. *Blood* 92: 4808-4818
- 28 Forsyth KD, Levinsky RJ (1990): Preparative procedures of cooling and re-warming increase leukocyte integrin expression and function on neutrophils. *J Immunol Methods* 128: 159-163
- 29 Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M, Hasegawa A, Asa D, Brandley BK (1992): The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis X oligosaccharide. *J Cell Biol.* 117: 895-902
- 30 Franciose RJ, Moore EE, Moore FA, Read RA, Carl VS, Banerjee A (1996): Hypoxia/reoxygenation of human endothelium activates PMNs to detach endothelial cells via PAF mechanism. *J Surg Res.* 61: 459-462
- 31 Freed MS, Needelman P, Dunkel CG, Saffitz JE, Evers AS (1989): Role of invading leukocytes in enhanced atrial eicosanoid production following rabbit left ventricular myocardial infraction. *J Clin Invest.* 83: 205-212
- 32 Furie MB, Tancinco MCA, Smith CW (1991): Monoclonal antibodies to leukocyte Integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood* 78: 2089-2097
- 33 Gerard C, Gerard NP (1994): The pro-inflammatory seven transmembrane segment receptor of the leukocyte. *Curr Opin Immunol.* 6: 140-145
- 34 Ginsberg MH, Du X, Plow EF (1992): Inside-out integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 4: 766-771

7. Literaturverzeichnis

- 35 Goerge T, Niemeyer A, Rogge P, Ossig R, Oberleithner H, Schneider SW (2002): Secretion pores in human endothelial cells during acute hypoxia. *J. Membrane Biol.* 187: 203-211
- 36 Grisham MB, Engerson TD, McCord JM, Jones HP (1985): A comparative study of neutrophil purification and function. *J Immunol Methods* 82: 315-320
- 37 Haslett C (1992): Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin Sci* 83: 639-648
- 38 Hattori R, Hamilton KK, Fugates RD, McEver RP, Sims PJ (1989): Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* 264: 7768-7771
- 39 Hennigan SM, Wang JH, Redmond HP, Bouchier-Hayes D (1999): Neutrophil heat shock protein expression and activation correlate with increased apoptosis following transmigration through the endothelial barrier. *Shock* 12: 32-38
- 40 Hofman P, d'Andrea L, Guzman E, Selva E, Le Negrate G, Far DF, Lemichez E, Boquet P, Rossi B (1999): Neutrophil F-actin and myosin but not microtubules functionally regulate transepithelial migration induced by interleukin 8 across a cultured intestinal epithelial monolayer. *Eur Cytokine* 10:227-236
- 41 Hynes RO (1992): Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25
- 42 Ichikawa H, Flores S, Kvietys PR, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY (1997): Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Circ Res.* 81: 922-931
- 43 Jackson MH, Millar AM, Dawes J, Bell D (1989): Neutrophil activation during cell separation procedure. *Nucl Med Commun.* 10: 901-904
- 44 Jones DA, Smith CW, Picker LJ, McIntire LV (1996): Neutrophil adhesion to 24-hour IL-1-stimulated endothelial cells under flow conditions. *J Immunol.* 157: 858-863
- 45 Jung TM, Dailey MO (1990): Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J Immunol.* 144: 3130-3136.
- 46 Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, Pinsky D, Yan SD, Anderson M, Sunouchi K, Major J, Hamilton T, Kuwabara K, Rot A, Nowygrod R, Stern D (1994): Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest* 93: 1564-1570

7. Literaturverzeichnis

- 47 Karmazyn M (1989): Synthesis and relevance of cardiac eicosanoids with particular emphasis on ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol.* 67: 912-921
- 48 Kausalya S, Nath J (1998): Interactive role of nitric oxide and superoxide anion in neutrophil-mediated endothelial cell injury. *J Leuk Biol.* 654: 185-191
- 49 Kilgore KS, Friedrichs GS, Homeister JW, Lucchesi BR (1994): The complement system in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 28: 437-444
- 50 Kim FJ, Moore EE, Moore FA, Biffi WL, Fontes B, Banerjee A (1995): Reperfused gut elaborates PAF that chemoattracts and primes neutrophils. *J Surg Res* 58: 636-640
- 51 Kobayashi SD, DeLeo FR (2004): An apoptosis differentiation programme in human polymorphonuclear leucocytes. *Biochem Soc Trans.* 32: 474-476
- 52 Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY (1999): Molecular mechanisms of neutrophil-endothelial cell adhesion induced by redox imbalance. *Circ Res.* 84: 516-524
- 53 Kokura S, Yoshida N, Yoshikawa T (2002): Anoxia/reoxygenation-induced leukocyte-endothelial cell interactions. *Free Radic Biol Med.* 33: 427-432
- 54 Kotovuori P, Tontti E, Pigott R, Sheperd M, Kiso M, Hasegawa A, Renkonen R, Nortamo P, Altieri DC, Gahmberg CG (1993): The vascular E-selectin binds to the leukocyte integrins CD11/CD18. *Glycobiology* 3: 131-136
- 55 Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991): Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4651-4655
- 56 Kuijpers TW, Hakkert BC, Hart MHL, Roos D (1992): Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8. *J Cell Biol.* 117: 565-572
- 57 Kuijpers TW, Hoogerwerf M, van der Laan LJW, Nagel G, van der Schoot CE, Grunert F, Roos D (1992): CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells. *J Cell Biol.* 118: 457-466
- 58 Kuijpers TW, Mul EP, Blom M, Kovach NL, Gaeta FCA, Tollefson V, Elices MJ, Harlan JM (1993): Freezing adhesion molecules in a state of high-avidity binding blocks eosinophil migration. *J Exp Med.* 178: 279-284

7. Literaturverzeichnis

- 59 Kuijpers TW, van der Schoot CA, Hoogerwerf M, Roos D (1993): Cross-linking of the carcinoembryonic antigen-like glycoproteins CD66 and CD67 induces neutrophil aggregation. *J Immunol.* 151: 4934-4940
- 60 Kukielka GL, Smith CW, Larosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, Hughes BJ, Youker KA, Hawkins HK, Michael LH, Rot A, Entman ML (1995): Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest* 95: 89-103
- 61 Kuroki M, Matsuo Y, Kinugasa T, Matsuoka Y (1992): Augmented expression and release of nonspecific cross-reacting antigens (NCAs), members of the CEA family, by human neutrophils during cell activation. *J Leukoc Biol.* 52: 551-557
- 62 Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, Altieri DC (1993): Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* 73: 1423-1434
- 63 Lawrence MB, Springer TA (1993): Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol.* 151: 6338-6346
- 64 Lefer AM, Lefer DJ (1996): The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.* 32: 743-751
- 65 Lentsch AB, Shanley TP, Sarma V, Ward PA (1997): In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13. *J Clin Invest.* 100: 2443-2448
- 66 Lentsch AB, Ward PA (2000): Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol* 190: 343-348
- 67 Liu Q, Kishimoto TK, Mainolfi E, Deleon RP, Myers C, Moretz RC (1998): Dynamic expression of L-selectin in cell-to-cell interactions between neutrophils and endothelial cells in vitro. *Exp Cell Res.* 243: 87-93
- 68 Lo SK, Lee SL, Ramos RA, Lobb R, Rosa M, Chi-Rosso G, Wright SD (1991): Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, $\alpha\text{M}\beta\text{2}$) on human neutrophils. *J Exp Med* 173: 1493-1500
- 69 Lund-Johansen F, Olweus J, Horejsi V, Skubitz KM, Thompson JS, Vilella R, Symington FW (1992): Activation of human phagocytes through carbohydrate antigens (CD15, sialyl-CD15, CDw17, and CDw65). *J Immunol* 148: 3221-3229

7. Literaturverzeichnis

- 70 Lund-Johansen F, Olweus J, Symington FW, Årli A, Thompson JS, Vilella R, Skubitz K, Horejsi V (1993): Activation of human monocytes and granulocytes by monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens. *Eur J Immunol.* 23: 2782-2791
- 71 Maianski NA, Roos D, Kuijpers TW (2003): Tumor necrosis factor alpha induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils. *Blood* 101: 1987-1995
- 72 Marks R, Todd RF, Ward PA (1989): Rapid induction of neutrophil-endothelial adhesion by endothelial complement fixation. *Nature* 339: 314-317
- 73 McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF (1989): GMP-140, a platelet α -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.* 84: 92-99
- 74 Michiels C, Arnould T, Knott I, Dieu M, Remacle J (1993): Stimulation of prostaglandin synthesis by human endothelial cells exposed to hypoxia. *Am J Physiol* 264: 866-874
- 75 Morris SF, Pang CY, Zhong A, Boyd B, Forrest CR (1993): Assessment of ischemia-induced reperfusion injury in the pig latissimus dorsi myocutaneous flap model. *Plast Reconstr Surg* 92: 1162-1172
- 76 Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM (1993): PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 178: 449-460
- 77 Munro JM, Lo SK, Corless C, Robertson MJ, Lee NC, Barnhill RL, Weinberg DS, Bevilacqua MP (1992): Expression of sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes, and lymphoid tissues. *Am J Pathol.* 141: 1397-1408
- 78 Murphy HS, Warner RL, Bakopoulos N, Dame MK, Varani J, Ward PA (1999): Endothelial cell determinants of susceptibility to neutrophil-mediated killing. *Shock* 12:111-117
- 79 Natarajan R, Fisher BJ, Jones DG, Ghosh S, Fowler AA (2002): Reoxygenating microvascular endothelial exhibits temporal dissociation of NF- κ B and AP-1 activation. *Free Radic Biol Med.* 32: 1033-1045
- 80 Oberringer M, Jennewein M, Motsch SE, Pohlemann T, Seekamp A (2005): Different cell cycle responses of wound healing protagonists to transient in vitro hypoxia. *Histochem Cell Biol.* 123: 595-603

- 81 Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T (2007): A new in vitro wound model based on the co-culture of human dermal microvascular endothelial cells and human dermal fibroblasts. *Biol Cell* 99: 197-207
- 82 Otto M, Bittinger F, Kriegsmann J, Kirkpatrick CJ (2001): Differential adhesion of polymorphous neutrophilic granulocytes to macro- and microvascular endothelial cells under flow conditions. *Pathobiology* 69: 159-171
- 83 Owen CA, Campbell MA, Sannes PL, Boudekes SS, Campbell EJ (1995): Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol* 131: 775-789
- 84 Palluy O, Morliere L, Gris JC, Bonne C, Modat G (1992): Hypoxia/reoxygenation stimulates endothelium to promote neutrophil adhesion. *Free Radic Biol Med.* 13: 21-30
- 85 Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre TM (1991): Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* 112: 749-759
- 86 Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM (1992): Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. *J Biol Chem.* 267: 15168-15175
- 87 Phan SH, Gannon DE, Ward PA, Karmiol S (1992): Mechanism of neutrophil-induced xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase conversion in endothelial cells: evidence of a role for elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 6: 270-278
- 88 Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC (1991): The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* 66: 921-933
- 89 Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, Oz MC, Wagner DD, Mayadas TN, Johnson RC, Hynes RO, Heath M, Lawson CA, Stern DM (1996): Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J. Clin. Invest.* 97: 493-500
- 90 Rainger GE, Fisher A, Shearman C, Nash GB (1995): Adhesion of flowing neutrophils to cultured endothelial cells after hypoxia and reoxygenation in vitro. *Am J Physiol* 269: 1398-1406
- 91 Reinhardt PH, Elliott JF, Kubes P (1997): Neutrophils can adhere via $\alpha 4\beta 1$ -integrin under flow conditions. *Blood* 89: 3837-3846
- 92 Rensing H, Bauer M (2001): Multiorganversagen. *Anaesthesist* 50: 819-841

7. Literaturverzeichnis

- 93 Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P (1991): Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol.* 138: 447-453
- 94 Rubanyi GM (1991): Endothelium derived relaxing and contracting factors. *J Cell Biochem* 46: 27-36
- 95 Ruggeri ZM (1999): Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 82: 576-584
- 96 Rui T, Cepinskas G, Feng Q, Ho YS, Kvietys PR (2001): Cardiac myocytes exposed to anoxia-reoxygenation promote neutrophil transendothelial migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: 440-447
- 97 Sakariassen KS, Aarts PAMM, De Groot PG, Houdijk WPM, Sixma JJ (1983): A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix, and purified components. *J Lab Clin Med* 102: 522-535
- 98 Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B, Cumming DA, Larsen GR (1993): Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 75: 1179-1186
- 99 Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF (1992): Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol* 119: 229-238
- 100 Simmons DL, Walker C, Power C, Pigott R (1990): Molecular cloning of CD31, a putative intercellular adhesion molecule closely related to carcinoembryonic antigen. *J Exp Med* 171: 2147-2152
- 101 Simon SI, Hu Y, Vestweber D, Smith CW (2000): Neutrophil tethering on E-selectin activates β 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Immunol.* 164: 4348-4358
- 102 Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV (1993): Regulation of vascular integrins. *Blood* 81: 2827-2843
- 103 Springer TA (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314
- 104 Staunton DE, Dustin ML, Springer TA (1989): Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339: 61-64

7. Literaturverzeichnis

- 105 Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP, Springer TA (1990): The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding site for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* 61: 243-254
- 106 Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W (1991): Carcinoembryonic antigen gene family: Molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal.* 5: 344-366
- 107 Tosi MF, Zakem H (1992): Surface expression of Fc gamma receptor III (CD16) on chemoattractant-stimulated neutrophils is determined by both surface shedding and translocation from intracellular storage compartments. *J Clin Invest.* 90: 462-470
- 108 Von Asmuth EJU, Smeets EF, Ginsel LA, Onderwater JJM, Leeuwenberg JFM, Buurman WA (1992): Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells. *Eur J Immunol* 22: 2519-2526
- 109 Warnke KC, Skalak TC (1990): The effects of leukocytes on blood flow in a model skeletal capillary network. *Microvasc Res* 40: 118-136
- 110 Wiles ME, Hechtman HB, Morel NM, Shepro D (1993): Hypoxia reoxygenation-induced injury of cultured pulmonary microvessel endothelial cells. *J Leukoc Biol.* 53: 490-497
- 111 Yoshida N, Granger DN, Anderson DC, Rothlein R, Lane C (1992): Anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 262: 1891-1898
- 112 Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E (1997): The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods* 200: 173-179
- 113 Zhou MJ, Brown EJ (1994): CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. *J. Cell Biol.* 125: 1407-1416
- 114 Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM (1992): Endothelial cell interactions with granulocytes: Tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 13: 93-100

8. Publikationen / Dank

8.1 Publikationen

Übersichtsarbeiten:

Oberringer M, Jennewein M, Schmitz K, Motsch S, Seekamp A, Pohlemann T, Bohn H, Ißle J, Hartmann U: Inflammation Research using Fluorescence and Atomic Force Microscopy. *Imaging and Microscopy* Vol.5, 4/03: 44-45 (2003)

Veröffentlichte Tagungsbeiträge:

Oberringer M, Jennewein M, Motsch S, Schmitz K, Pohlemann T, Seekamp A: Characteristic response patterns of endothelial cells to hypoxia, 6th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis - Pathophysiology, Immune Consequences and Therapy, March 2-6, 2004, Munich, Germany; *Shock* 21: 92-92, 367 Suppl. 1 (2004)

Schmitz K, Jennewein M, Pohlemann T, Seekamp A, Oberringer M: Hypoxie triggert die Adhäsion von Granulozyten an Endothelzellen im *in vitro*-Modell, 1. Gemeinsamer Kongress Orthopädie-Unfallchirurgie, October 19-22, 2005, Berlin, Germany; Electronic supplementary material in: Mutschler W, Gradinger R, Locher H: 1. Gemeinsamer Kongress Orthopädie-Unfallchirurgie; *Der Unfallchirurg* 108(10): 791(2005), DOI: 10.1007/s00113-005-1014-0

Oberringer M, Jennewein M, Motsch SE, Schmitz K, Meins C, Seekamp A, Pohlemann T: Effects of transient hypoxia in different cell culture models of human dermal microvascular endothelial cells, 2nd International Conference "Strategies in Tissue Engineering", Mai 31 - June 2, 2006, Würzburg, Germany; *Cytotherapy* 8 (Supplement 2): 53 (2006)

Posterdemonstrationen:

Seekamp A, Oberringer M, Jennewein M, Motsch SE, Schmitz K, Pohlemann T: Cytogenetic characterization of in vitro hypoxia treated cells, Twenty-sixth annual conference on shock. June 07-10, 2003, Phoenix, Arizona, USA

Schmitz K.: „Die Interaktion von Granulozyten mit dem Endothel“, Besichtigung des molekularbiologischen Forschungslabors der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie Homburg/Saar durch den Minister für Bildung, Kultur und Wissenschaft des Saarlandes, Herrn Schreier (06/03)

In Vorbereitung: Schmitz K, Jennewein M, Pohlemann T, Seekamp A, Oberringer M:

„Hypoxia and not reoxygenation triggers the adhesion of polymorphonuclear neutrophils to human dermal microvascular endothelial cells in vitro“. *Inflammation Research*

8.2 Dank

Abschließend möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ein herzlicher Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. T. Pohlemann, der schon während des Studiums mein Interesse an der Unfallchirurgie weckte und mir nicht nur mehrere Famulaturen in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie in Homburg, sondern auch die Teilnahme am ersten gemeinsamen Kongress für Unfallchirurgie und Orthopädie im Jahr 2005 in Berlin ermöglichte. Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. T. Pohlemann und meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. A. Seekamp für die Überlassung des sehr interessanten Themas und für die Bereitstellung der Materialien sowie der Räumlichkeiten danken. Unerwähnt soll ebenfalls nicht bleiben, dass Prof. Dr. A. Seekamp meine Arbeit auch weiterhin betreute, nachdem er die Leitung der Klinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel übernahm. Ich möchte ihm außerdem für seine Anregungen, die konstruktive Kritik sowie das Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Menger, dem Leiter des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg, für sehr hilfreiche Diskussionen und für die Bereitstellung des FACS-Geräts. Außerdem möchte ich Frau R. Nickels für ihre Hilfe bei der Durchführung der FACS-Färbungen und der Messungen am FACS-Gerät danken. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. U. Hartmann und seinen Mitarbeitern der Experimentalphysik in Saarbrücken für die Messungen am Rastersondenmikroskop.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. M. Oberringer für die stete Hilfsbereitschaft, die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und fruchtbaren Diskussionen, das Korrekturlesen sowie seinem Interesse am Fortschritt meiner Arbeit. Seine tatkräftige Unterstützung von der Konzeption über die Durchführung bis zur Fertigstellung haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Des Weiteren möchte ich Frau M. Jennewein

für ihre Unterstützung bei der Kultivierung der Endothelzellen und für die Vermittlung des damit verbundenen theoretischen Hintergrundwissens danken. Auch die zahlreichen Anregungen und hilfreichen Diskussionen werden in Erinnerung bleiben. Ein weiterer Dank gilt Frau S. Motsch für ihre Unterstützung bei der Arbeit am Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskop sowie bei der Durchführung der immunzytochemischen Färbungen. Auch Herr Dr. W. Metzger und Herr A. Jung sollen nicht unerwähnt bleiben. Ihnen gilt ein Dank für ihre Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen, technischen und zahlreichen sonstigen Fragen. Die Arbeit im Labor war durch eine angenehme und unterhaltsame Arbeitsatmosphäre gekennzeichnet und wird mir stets als eine sehr schöne Zeit in Erinnerung bleiben.

Mein herzlichster Dank gebührt allerdings meiner Familie und meinen Freunden für ihre Geduld und ihren ständigen Zuspruch, in besonderem Maße natürlich meinem Partner Herrn Charles W. Vonk Jr. Meiner lieben Mama gilt mein innigster Dank für ihre liebevolle und verständnisvolle Unterstützung und ihren unermüdlichen Einsatz und Zuspruch auch in schweren Zeiten. Meinem lieben Vater, der die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr erleben durfte, danke ich in stillem Gedenken für all die aufopferungsvollen Jahre der Unterstützung.

9. LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Katrin Schmitz
Gaustrasse 33
67655 Kaiserslautern

geb. am 19.10.1979 in Saarbrücken
ledig, kinderlos

SCHULBILDUNG

1986-1990 Grundschule Bergstraße Völklingen
1990-1999 Realgymnasium Völklingen
1999 Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife (Note 1,1)

HOCHSCHULBILDUNG

10/99 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität
des Saarlandes
09/01 Ärztlichen Vorprüfung
08/02 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/05 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/05 – 03/06 Praktisches Jahr in den Fächern Chirurgie, Psychiatrie und
Innere Medizin

9. Lebenslauf

04/06 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Abschluss des Studiums mit der Gesamtnote 2,1

Famulaturen in den Bereichen Gynäkologie, Unfallchirurgie und Orthopädie

BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 07/06 Assistenzärztin in der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungs-
chirurgie des Westpfalz-Klinikums am Standort Kaiserslautern
Weiterbildung zum Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie

SPEZIELLE KENNTNISSE

Fremdsprachen: Englisch, fließend in Wort und Schrift
Gute Kenntnisse in Französisch
Grundkenntnisse in Spanisch
Großes Latinum

EDV-Kenntnisse: gute Computerkenntnisse vor allem in Word, Excel,
Powerpoint, SAP und Orbis