Institut für Klinische und Experimentelle Trauma-Immunologie, Universität Ulm

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Markus S. Huber-Lang

Veränderungen des Membranpotentials von neutrophilen Granulozyten durch das Komplementaktivierungsprodukt C5a

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von David Alexander Christian Messerer

geboren in Heidelberg

2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Huber-Lang

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Frick

Tag der Promotion: 14.02.2019

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Messerer D A C, Denk S, Föhr K J, Halbgebauer R, Braun C K, Hönes F, Harant J, Fauler M, Frick M, Nußbaum B L, Radermacher P, Hafner S, Huber-Lang M S: Complement C5a Alters the Membrane Potential of Neutrophils during Hemorrhagic Shock. Mediators Inflamm (2018), veröffentlicht unter der Lizenz CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Denk S, Neher M D, Messerer D A C, Wiegner R, Nilsson B, Rittirsch D, Nilsson-Ekdahl K, Weckbach S, Ignatius A, Kalbitz M, Gebhard F, Weiss M E, Vogt J, Radermacher P, Köhl J, Lambris J D, Huber-Lang M S: Complement C5a Functions as a Master Switch for the pH Balance in Neutrophils Exerting Fundamental Immunometabolic Effects. J Immunol Baltim Md (1950)

Denk S, Taylor R P, Wiegner R, Cook E M, Lindorfer M A, Pfeiffer K, Paschke S, Eiseler T, Weiss M, Barth E, Lambris J D, Kalbitz M, Martin T, Barth H, Messerer D A C, Gebhard F, Huber-Lang M S: Complement C5a-induced changes in neutrophil morphology during inflammation. Scand J Immunol (2017)

Des Weiteren wurde eine Übersichtsarbeit zu der Thematik veröffentlicht:

Kovtun A, Messerer D A C, Scharffetter-Kochanek K, Huber-Lang M, Ignatius A: Neutrophils in Tissue Trauma of the Skin, Bone, and Lung: Two Sides of the Same Coin. Journal of Immunology Research 2018: S. 1–12 (2018)

INHALT

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung 1
   1.1. Klinische Relevanz 1
   1.2. Immunsystem 1
   1.3. Neutrophile Granulozyten 3
   1.4. Komplementsystem 4
   1.5. Interaktion von C5a und neutrophilen Granulozyten 5
   1.6. Membranpotential 8
   1.7. Membranpotential der neutrophilen Granulozyten 9
   1.8. Zielsetzung 10
2. Material und Methoden 13
   2.1. Geräte und Chemikalien 13
   2.2. Herstellung der Zellpufferlösungen 14
   2.3. Auswahl und Blutentnahme von gesunden menschlichen Probanden 16
   2.4. Versuchsprotokoll des porkinen hämorrhagischen Schocks 16
   2.5. Isolation von neutrophilen Granulozyten 17
   2.6. Isolation von Leukozyten aus Vollblut 18
   2.7. Färbung der Zellen und Messung mittels Durchflusszytometrie 18
   2.8. Entwicklung und Feinanpassung eines Algorithmus zur Berechnung des Membranpotentials 22
   2.9. Ethik 23
   2.10. Statistische Analyse und Umgebungsvariablen 24
3. Ergebnisse 26
   3.1. Eichkurve Membranpotential 26

3.2. Veränderungen des Membranpotentials auf Stimulation mit C5a und LPS beim gesunden Menschen 29
3.3. Ionenaustauschexperimente 35
3.4. Zusammenhang Membranpotential und intrazellulärer pH-Wert 35
3.5. Veränderung des extrazellulären pH-Wertes 37
3.6. C5aR1 38
3.7. Monozyten und Lymphozyten 39
3.8. Mitochondriales Membranpotential 39
3.9. Membranpotential von neutrophilen Granulozyten im porkinen hämorrhagischen Schock 40
3.10. Abgleich mit der Fragestellung 42
4. Diskussion 45
4.1. Methodendiskussion 45
4.2. Ergebnisdiskussion 47
4.3. Stärken der Arbeit 59
4.4. Limitationen der Arbeit 60
4.5. Relevanz der Ergebnisse 61
4.6. Ausblick 62
5. Zusammenfassung 64
6. Literaturverzeichnis 66
7. Danksagung 72
8. Lebenslauf 73

Abkürzungsverzeichnis

Name / Abkürzung	Bedeutung / Anmerkung
[x]	Einheit oder molare Konzentration von x, meist mol / l
0,9%-NaCl	0,9%-Natriumchlorid-Lösung
2,7%-NaCl	2,7%-Natriumchlorid-Lösung, hergestellt aus destilliertem Wasser (Apotheke des Universitätsklinikums Ulm) und NaCl (Sigma-Aldrich)
APC	Allophycocyanin, eine Substanz, welche, wenn angeregt, besonders bei 660 nm fluoresziert
AU	Arbitrary Units = künstliche Einheiten
BGA	Blutgasanalyse
C5, C5a, …	Komplementfaktor C5, Komplementfaktor C5a, …
C5aR1 bzw. C5aR2	C5a-Rezeptor 1 bzw. 2
Ca^{++}	Kalzium, genauer: Kalziumion
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon, Ionophor
CD x	Cluster of differentiation x (englisch), Marker auf Zelloberfläche, zur Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen
Cl^-	Chlorid, genauer: Chloridion
DAMP	Damage-associated molecular pattern (englisch), Molekulare Muster, welche Gefahren-assoziiert sind
$DiBAC_4(3)$	bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
e	extrazellulär
EC_{50}	mittlere effektive Konzentration
F	Faradaykonstante = 96485 [C / mol]
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	fluorescein isothiocyanate, eine Substanz, welche, wenn angeregt, besonders bei 520 nm fluoresziert
FSC-A, -H	Forward Scatter -Area, -Height, etwa: Vorwärtsstreulicht, ein Maß für die Zellgröße beziehungsweise das Signal der Zelle
Glc	Glukose

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure, Puffersubstanz
$_i$	intrazellulär
JC-1	5, 5´,6,6´-tetrachloro-1,1´,3,3´-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
K^+	Kalium, genauer: Kaliumion
K4,5; Kx …	Siehe 2.2.
K_d	Dissoziationskonstante
M	mol / l
Mg^{++}	Magnesium, genauer: Magnesiumion
Na^+	Natrium, genauer: Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
n.s.	nicht signifikant
osmol	Osmolarität = Stoffmengenkonzentration osmotisch wirksamer Teilchen / Volumen
P	Permeabilität, 1 = 100%
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern (englisch), Molekulare Muster, welche Pathogen-assoziiert sind
PE	R-Phycoerythrin, eine Substanz, welche, wenn angeregt, besonders bei 612 nm fluoresziert
PerCP	Peridinin-chlorophyll protein, eine Substanz, welche, wenn angeregt, besonders bei 678 nm fluoresziert
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	polymorphonuclear leukocytes (englisch), Polymorphkernige Leukozyten, auch polymorphkernige Granulozyten
R	universale Gaskonstante = 8,314 [J / (K x mol)]
SSC-A	Side Scatter Area, etwa: Seitwärtsstreulicht, unter anderem abhängig von dem Grad der Granularität der Zelle
T	Temperatur [K], genauer T in K = ϑ in °C + 273,15
U	errechnetes Membranpotential [mV]
x	Mathematisches Zeichen für Multiplikation

1. EINLEITUNG

1.1. KLINISCHE RELEVANZ

Zahlreiche pathophysiologische Zustände des Menschen beziehen das Immunsystem grundlegend mit ein. Beispielsweise spielt das angeborene Immunsystem bei (Poly-) Trauma, Sepsis und hämorrhagischem Schock eine zentrale Rolle. Diese Entitäten sind nicht nur mit einer hohen Letalität vergesellschaftet, sondern auch mit einem hohen Verlust an Lebensqualität bereits im jungen Alter sowie durch die volkswirtschaftlichen Folgeschäden assoziiert. Die Weltgesundheitsorganisation schätzt, dass Unfallverletzungen für 10% der Todesfälle weltweit verantwortlich sind [52, 90]. Sepsis, ein noch nicht abschließend definierter Zustand aus Entzündung und Organdysfunktion, ist mit einem Anteil von 1,5% aller Krankenhausfälle und einer Krankenhausletalität von rund 27% in Deutschland eine schon vor zweitausend Jahren beschriebene, jedoch noch nicht befriedigend behandelbare Pathologie [19, 34]. Nach schweren Verletzungen oder Infektionen beginnt ein komplexes Wechselspiel aus körpereigenem Immunsystem, körperfremden Pathogenen und weiteren Organsystemen, welches entscheidend am klinischen Ausgang ist [52].

1.2. IMMUNSYSTEM

„The function of the immune system is to prevent the takeover of the body by genomes other than that encoded in the germline" [62]

Die Hauptaufgaben des Immunsystems sind das Erkennen und Beseitigen von potentiell schädlichen, meist körperfremden, aber auch körpereigenen Substanzen sowie die Beteiligung an der anschließenden Reparatur des eventuell entstandenen Schadens [62].

Traditionell wird das Immunsystem unterteilt in zelluläre Anteile, also Abwehrzellen, und humorale, also flüssige, meist im Plasma gelöste Anteile. Alternativ lässt das Immunsystem sich in erworbene, spezifische Abwehr und angeborene, unspezifische Abwehr einteilen (Abbildung 1). Die verschiedenen Teile des Immunsystems arbeiten

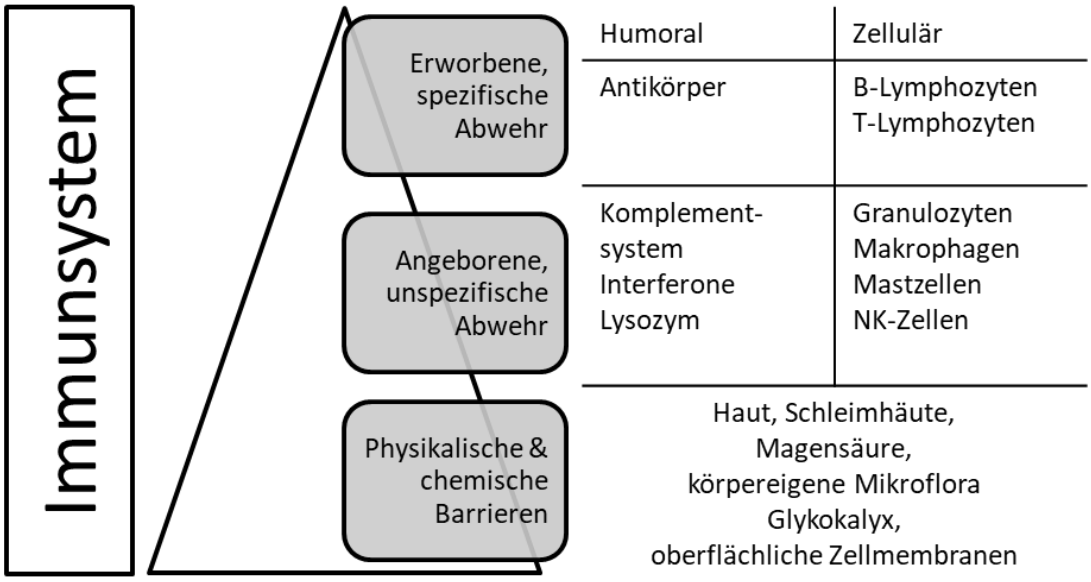

Abbildung 1
Einteilungsmöglichkeiten und verschiedene Bestandteile des Immunsystems: Die meisten für den menschlichen Körper potentiell schädlichen Substanzen scheitern bereits an den Makro- und Mikro-Barrieren des Körpers. Nur einige Gefahrenmoleküle und Pathogene führen zum Eingreifen der unspezifischen Abwehr, und noch weniger Gefahrenmoleküle und Pathogene führen zu einer Aktion der spezifischen Abwehr. Allerdings können durch Trauma oder Sepsis direkt oder indirekt Barrieren wie Haut und Schleimhaut geschädigt werden, was eine zusätzliche Herausforderung für die nachgeschaltete Immunantwort darstellt.

dabei synchron Hand in Hand. Darüber hinaus weist das Immunsystem auch viele Wechselwirkungen mit anderen Organsystemen auf. Beispielsweise kann das Komplementsystem als ein Hauptpfeiler des angeborenen Immunsystems das Gerinnungssystem beeinflussen, aber auch durch dieses aktiviert werden [18, 62].

Das angeborene, unspezifische Immunsystem reagiert auf Gefahren meist sehr rasch und ähnlich, allerdings wird ihm eine umfassende Gedächtnisfunktion abgesprochen (wobei die Literatur sich diesbezüglich im Wandel befindet [35]). Hingegen hat das erworbene, spezifische Immunsystem ein mannigfaltiges Arsenal und verfügt über eine gut beschriebene, ausgeprägte Gedächtnisfunktion. Dabei sind Komponenten des angeborenen Immunsystems evolutionsbiologisch meist älter als die des adaptiven Immunsystems [18]. Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivierung des Immunsystems zeitlich begrenzt und überwiegend vorteilhaft für den Wirt. Bei schweren Schäden (Polytrauma, Schock, Sepsis) geraten die Mechanismen des Immunsystems aus dem Gleichgewicht, was sich negativ auf den Krankheitsverlauf

auswirkt [52, 74]. Eine besondere Rolle dieser anhaltenden und potentiell schädlichen Immunaktivierung kommt hierbei den sogenannten DAMPs und PAMPs (danger associated bzw. pathogen associated molecular patterns) zu. Hierunter versteht man körpereigene bzw. körperfremde Moleküle, welchen das Immunsystem bei ausgeprägten Verletzungen ausgesetzt ist, wie ATP oder Histone als Beispiel für DAMPs oder LPS als Beispiel für ein PAMP [32]. Das Immunsystem reagiert auf die DAMPs und PAMPs mit einer komplexen Antwort [32].

1.3. NEUTROPHILE GRANULOZYTEN

Neutrophile Granulozyten zählen zu der zellulären Fraktion des angeborenen Immunsystems [51, 61]. Sie bilden neben den basophilen und eosinophilen Granulozyten den überwiegenden Bestandteil der sogenannten polymorphkernigen Leukozyten (auch: polymorphkernige Granulozyten, englisch: polymorphonuclear leukocytes, PMNs) und stellen mit circa 60% die quantitativ bedeutsamste Fraktion der rund 25 x 10^9 Leukozyten pro Liter Blut [20, 44, 61]. Sie besitzen eine durchschnittliche Größe von 7-10 µm und entstammen aus der myeloiden Zellreihe des Knochenmarks [44, 61]. Ihre Synthese kann bei Bedarf, wie beispielsweise im Falle einer Entzündung, deutlich gesteigert werden [76].

Bei einer Entzündungsantwort stellen neutrophile Granulozyten regelmäßig eine der ersten Komponenten der „Verteidigungslinie“ des Wirtes dar und finden sich daher auch überwiegend in frischen Wunden und Eiter [32, 61, 76]. Das Fehlen oder eine Dysfunktion der neutrophilen Granulozyten ist daher kritisch für den menschlichen Körper [51, 76]. Ihre Aufgabe besteht zum einen im Aufspüren, Aufnehmen und Fressen (Phagozytose) von Erregern und dem Abtöten von Pathogenen beispielsweise durch die Sezernierung von bakteriziden Granula oder durch Bildung von Sauerstoffradikalen [44, 76]. Zum anderen können sie mit Teilen ihrer DNS Netze bilden, um Bakterien zu fangen [20, 51, 61]. Darüber hinaus kommunizieren neutrophile Granulozyten durch verschiedene Alarmstoffe mit weiteren Teilen des Immunsystems und anderen Organbestandteilen (z.B. Endothel, Leber) [44].

Die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten findet über verschiedene Rezeptoren sowie nachgeschaltete Signalwege statt, die vom Körper streng reguliert werden, da eine (Über-)Stimulation auch negative Nebeneffekte hat [52, 62, 76]. Verschiedene Locksignale, darunter auch das Komplementaktivierungsprodukt C5a, veranlassen die neutrophilen Granulozyten zur zielgerichteten Migration an den Ort des Entzündungsgeschehen [76]. Diesen Vorgang nennt man Chemotaxis, die Lockstoffe Chemotaxine [51]. Das Auswandern von neutrophilen Granulozyten bewirkt nicht nur Inflammationsprozesse im Sinne eines wirksamen Abwehrversuches, sondern auch Gewebeschäden [76]. Die meisten neutrophilen Granulozyten befinden sich außerhalb der Blutbahn und haben dort eine begrenzte Halbwertszeit von maximal 12 h [61, 76]. An ihrem Zielort bekämpfen sie nicht nur Pathogene, sondern setzen verschiedene Signalstoffe frei, welche die Entzündung und die Rekrutierung weiterer neutrophiler Granulozyten und anderer Immunzellen wie Monozyten und dendritischer Zellen fördern und gleichzeitig die ersten Schritte zur Geweberegeneration einleiten [62, 76]. Darüber hinaus befeuern DAMPs und PAMPs das enge Zusammenspiel verschiedener Hauptakteure des Immunsystems, wie nachfolgend für Komplementsystem und neutrophile Granulozyten dargestellt wird.

1.4. KOMPLEMENTSYSTEM

Das Komplementsystem gehört wie die neutrophilen Granulozyten zum angeborenen Immunsystem und bildet somit eine der ersten „Verteidigungslinien“ gegenüber Pathogenen oder Zelltrümmern [18, 21, 89, 52]. Die Komplementkaskade besteht aus über 50 Proteinen, welche überwiegend in der Leber gebildet werden und als inaktive Vorstufen („Pro-Enzyme“, „Zymogene“) im Blut vorhanden sind [18, 21]. Dieser Umstand führt dazu, dass Komplementfaktoren im „Ernstfall“ sofort aktivierungsbereit im Blut vorliegen und nicht erst zeit- und energieaufwendig produziert werden müssen. Die wichtige Rolle des Komplementsystems zeigt sich auch in seinen evolutionsbiologischen Ursprüngen vor mehreren hundert Millionen Jahren und seiner entsprechenden Konservierung [42, 59].

Die Aktivierung des Komplementsystems kann entweder klassisch über Antikörper erfolgen bzw. ähnlich über weitere Proteine (Lektinweg, CRP) oder alternativ durch

den spontanen Zerfall des zentralen Faktors C3, welcher durch im Blut flottierende Pathogene stabilisiert wird [18, 21, 42, 71, 74]. Bei allen Aktivierungswegen wird im „Drehkreuz“ des Komplementsystems C3 zu den Teilen C3a und C3b gespalten [18, 21, 74, 88]. Anschließend wird mit Hilfe weiterer Bestandteile des Komplementsystems der Faktor C5 in C5a und C5b gespalten. C5b bildet nun mit den Faktoren C6, C7, C8 und C9 die gemeinsame Endstrecke des Komplementsystems. Sie besteht aus der Bildung eines membranangreifenden Komplexes - einer Pore, welche sich in der Zellmembran des Pathogens bildet und durch osmotischen Stress dessen Lyse bewirkt [21, 74]. Zu den Hauptaufgaben des Komplementsystems zählt neben der beschriebenen Lyse vor allem die sogenannte Opsonierung („schmackhaft machen“), also das Präsentieren von Pathogenen für Phagozyten, insbesondere über den Faktor C3b. Darüber hinaus vermitteln Komplementspaltprodukte das Anlocken von Immunzellen entlang eines Konzentrationsgradienten, was als Chemotaxis bezeichnet wird. Die Anaphylatoxine C3a und C5a sind potente Chemotaxine, welche neben der zellulären Migration auch die dazugehörigen optimalen Bedingungen wie Steigerung des Gefäßdurchmessers bzw. der Gefäßdurchlässigkeit bewirken [21, 74, 87, 88].

Wie bei allen Bestandteilen des Immunsystems ist eine strikte Kontrolle der Aktivierung des Komplementsystem unerlässlich, da eine Überstimulation negative Folgen haben kann ([21, 71, 73, 87] und Tabelle 1). Ebenso charakteristisch sind die zahlreichen Beziehungen des Komplementsystems mit weiteren Teilen der Immunantwort. C5 kann beispielsweise durch Thrombin aus der Gerinnungskaskade gespalten werden [33, 87]. Allgemein „komplementiert“ das Komplementsystem beispielsweise die Antikörper und interagiert mit Phagozyten [21]. Außerhalb des Immunsystems verstärkt das Komplementsystem Schmerzzustände [69], führt zu Schrankenstörungen mit Ödembildung und kann so klassische Zeichen einer lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion auslösen [32].

1.5. INTERAKTION VON C5A UND NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

Das Komplementaktivierungsprodukt C5a (≈ 11 kDa, 74 Aminosäuren) ist ein Spaltprodukt des Komplementfaktors C5 (≈ 188 kDa, 1676 Aminosäuren) [42, 54, 59]. Zusammen mit C3a und C4a bildet es die Anaphylatoxine, wobei C5a unter ihnen das

chemotaktisch wirksamste ist [88]. Anaphylatoxine bewirken nicht nur die Chemotaxis und weitere Stimulierung verschiedener Zellen wie neutrophiler Granulozyten, sondern bewirken auch alle klassischen Entzündungszeichen wie eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit nachfolgender Rötung, Schwellung und Überwärmung [59, 88].

Tabelle 1: Effekte von C5a = Komplementfaktor 5a auf neutrophile Granulozyten [15, 54, 59, 88, 89]

Begrenzte, regulierte und physiologische Produktion von C5a	Exzessive, systemische, unkontrollierte Produktion von C5a
Aktivierung der NADPH-Oxidase, Generierung von O_2^- und H_2O_2	Unfähigkeit des NADPH-Oxidase-Zusammenbaus sowie der Generierung von Sauerstoffradikalen
Aktivierung der Phospholipase A_2	Stimulierung der Laktatsynthese, dadurch Beitrag zum Entstehen einer Laktatazidose
Synthese von Leukotrien B_4 und Thromboxan	Exzessive Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, welche zur Schädigung von Gefäßwänden und zur Störung von Blut-Organ-Schranken (z.B. Blut-Darm- oder Blut-Hirn-Schranke) beitragen kann
Erhöhung der Apoptose-Resistenz in vitro	
Aktivierung des Endothels mit Hochregulation von Adhäsionsmolekülen,	
Auswanderung von neutrophilen Granulozyten aus der Blutbahn	
Transiente Alkalinisierung des intrazellulären pH-Wertes, Formänderung	Zelluläre „Paralyse“, unter anderem durch Hemmung des MAPK- und ERK1/2-Signalweges

C5a interagiert mit verschiedenen Rezeptoren, darunter C5aR1 (auch C5R1 oder CD88,) und C5aR2 (auch C5L2 oder GPR77) [42, 59, 83, 87, 89]. Diese Rezeptoren befindet sich besonders zahlreich auf neutrophilen Granulozyten - jedoch auch auf Makrophagen, Endothelzellen und Alveolarepithelzellen [59, 87] sowie auf vielen anderen Zelltypen [59, 69].

Die hohe Expressionsrate von C5aR1 auf neutrophilen Granulozyten wird als Erklärungsansatz für mögliche schädliche Nebeneffekte einer C5a-Konzentration über 10 nM besonders auf neutrophile Granulozyten gesehen [88], wobei dies in etwa auch dem Plateau der Bindungskurve entspricht [30]. Unter physiologischen Bedingungen lässt sich weniger als 1 nM C5a im Blut von gesunden Menschen nachweisen [59]. Bei starker Aktivierung des Komplementsystems, z.B. bei Sepsis, sind C5a-Konzentrationen von 10-100 nM beschrieben (vgl. physiologische Konzentration 0,47 nM und EC_{50} C5a an C5aR1 von 1 nM bzw. an C5aR2 von 7 nM) [42, 59, 83, 88]. Bei maximaler Aktivierung der Komplementkaskade, z.B. durch Schlangengift („cobra venom factor"), kann die C5a-Konzentration bis auf circa 285 nM ansteigen [59].

Die Rezeptoren C5aR1 und C5aR2 ähneln sich nicht in Struktur und Funktion - so erhöht beispielsweise C5aR2 bei Stimulation nicht das intrazelluläre Kalzium. Die verschiedenen Rollen der Rezeptoren sind nicht abschließend geklärt - möglicherweise handelt es sich bei C5aR2 sogar nur um einen Köder (sogenannter „decoy receptor") zur Vermeidung einer Überstimulation durch C5a [59, 87]. Bei C5aR1 handelt es sich um einen transmembranären G-Protein-gekoppelten Rezeptor (Gαi2) [30, 42, 59, 88], welcher über verschiedene nachgeschaltete Kaskaden wirkt (Kalzium-Einstrom, ERK1/2-Signalweg und weitere) [42, 59, 89]. Unter physiologischen Bedingungen gelten die Effekte von C5a auf neutrophile Granulozyten allgemein als vorteilhaft und führen zu gezielter Zellmigration sowie zum Klären von Zelltrümmern und zum Abtöten von Pathogenen (siehe Tabelle 1).

Unter pathophysiologischen Bedingungen, welche mit einer überschießenden Komplementaktivierung einhergehen, wie z.B. nach Polytrauma, ist die Antwort von neutrophilen Granulozyten auf C5a jedoch verändert - meist im Sinne einer verminderten Abwehrfunktion (siehe Tabelle 1 und [31, 51, 83, 85, 87, 89]). Dies zeigt sich nicht nur für C5a, sondern auch für andere Aktivierungsstoffe wie fMLP [83, 87, 89]. Die schädlichen, unerwünschten Effekte einer C5a-Überstimulation werden dadurch untermauert, dass die Blockade von C5a in diesen Krankheitsbildern vorteilhaft sein kann [87, 89] und neutrophile Granulozyten die C5aR1- und C5aR2-Expression unter den genannten Umständen herunterregulieren - möglicherweise aus Selbstschutz, möglicherweise aber auch als Zeichen einer hohen Internalisierungsrate von besetzten Rezeptoren [51, 87]. Darüber hinaus ist die C5a-C5aR1-Interaktion an

zahlreichen weiteren Pathologien wie Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis und Morbus Alzheimer beteiligt, was die Rolle des Komplementsystems betont [42, 59, 69].

Zusammenfassend lässt sich postulierend sagen, dass eine übermäßige Immunantwort unter anderem durch Überstimulation von C5a-Rezeptoren die Aktivität neutrophiler Granulozyten schwächt und möglicherweise zu „inkompetenten Populationen neutrophiler Granulozyten“ führt [51]. Hierbei fällt der Gegensatz von deutlicher zellulärer Funktionsstörung bei gleichzeitiger morphologischer Integrität der neutrophilen Granulozyten auf. Theoretisch könnten hier elektrophysiologische Veränderungen mit den entsprechenden Funktionsänderungen relevant sein, wie teilweise bereits beschrieben (Alkalinisierung, Kalziumeinstrom, siehe Tabelle 1). Daher wurde der Fokus dieser Arbeit auf das zelluläre Membranpotential von neutrophilen Granulozyten nach Exposition mit Komplementaktivierungsprodukten gelegt.

1.6. MEMBRANPOTENTIAL

Das Membranpotential einer Zelle kann nach der Goldman- oder Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (GHK-Gleichung) berechnet werden. Diese kann wie folgt dargestellt werden [23, 40, 41, 68, 91]:

$$U = \frac{R\,T}{F}\,ln\frac{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_e}{P_K[K]_e + P_{Na}[Na]_e + P_{Cl}[Cl]_i}$$

U = errechnetes Membranpotential [mV]

R = universale Gaskonstante = 8,314 [J/(K mol)]

T = Temperatur [K]

F = Faraday-Konstante = 96485 [C/mol]

P = Permeabilität, 1 = 100%

$_e$ bzw. $_i$ = extra- bzw. intrazellulär

[x] = Konzentration von Ion x in mM

Setzt man die Konstanten ein und wandelt den natürlichen in einen dekadischen Logarithmus um, so ergibt sich gerundet:

$$U = -61\ log_{10} \frac{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_e}{P_K[K]_e + P_{Na}[Na]_e + P_{Cl}[Cl]_i}$$

1.7. MEMBRANPOTENTIAL DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

Veränderungen des zellulären Membranpotentials und des intrazellulären Kalziumgehalts allgemein sowie der Degranulation und der Radikalgenerierung bei neutrophilen Granulozyten stellen die ersten Reaktionen auf Stimulantien wie Chemotaxine dar [10, 13, 26]. Hierbei wird zunächst Kalzium aus intrazellulären Speichern freigesetzt, anschließend strömt Kalzium von extrazellulär ein [13, 26, 46]. Ebenso findet eine Generierung von Superoxiden statt, was über das Enzym NADPH-Oxidase erfolgt. Hierbei werden Elektronen freigesetzt, welche nach extrazellulär befördert werden [10]. Diese Verschiebung negativer Ladungen nach extrazellulär wird durch einen Protonenfluss ausgeglichen [10, 12, 24]. Dies kann zunächst zu einer intrazellulären Ansäuerung und anschließend zu einer überschießenden intrazellulären Alkalinisierung führen [15, 17, 60].

Aus dem dargestellten Aktivierungsweg der neutrophilen Granulozyten und der beschriebenen Dysfunktion bei übermäßiger Aktivierung des Immunsystems (siehe 1.5.) ergibt sich die Vermutung, dass das Membranpotential und dessen Veränderungen hierbei mechanistisch relevant sind. Der oben genannte

Aktivierungsweg von neutrophilen Granulozyten leitet sich hauptsächlich aus Erkenntnissen ab, welche mit Chemotaxin fMLP oder dem artifiziellen Proteinkinase-C-Stimulator PMA gewonnen wurden [9–12, 24, 24, 29, 36, 46, 66, 67, 78, 84]. Für die Komplementaktivierungsprodukte C3a und C5a fehlen bisher präzise Untersuchungen an neutrophilen Granulozyten.

Bisher publizierte Studien in diesem Zusammenhang unterliegen jedoch deutlichen Einschränkungen: Zum einen ist die klassische Methode zur Messung des Membranpotentials meist die sogenannte „Patch-Clamp"-Technik. Bei neutrophilen Granulozyten gestaltet sich diese Technik ausgesprochen schwierig, unter anderem wegen des mikroskopisch zu beobachtenden Versuchs der Zellen, die Glaspipetten zu phagozytieren (eigene unpublizierte Beobachtungen, [9, 36]). Darüber hinaus können bei dieser Technik naturgemäß nur eine äußerst geringe Anzahl an Zellen je Proband untersucht werden. Weiterhin wurden in elektrophysiologischen Studien oftmals andere Zellen als neutrophile Granulozyten verwendet, beispielsweise eosinophile Granulozyten [66, 67, 78], granulozytäre HL-60-Zellen [12], Makrophagen [84] oder entkernte neutrophile Granulozyten [12, 29]. Alternativ wurden neutrophile Granulozyten durch das Anwenden von Porenbildnern („Ionophore" wie Valinomycin, Gramicidin oder Amphotericin) [9, 11, 24] in ihrem intrazellulären Milieu verändert, wobei dies zu Einschränkungen in der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf native neutrophile Granulozyten führt.

1.8. ZIELSETZUNG

Vorarbeiten untersuchten die Auswirkungen von C5a auf neutrophile Granulozyten, besonders auf die Zellform, den intrazellulären pH-Wert sowie den Zellmetabolismus [15, 16]. Da Veränderungen des pH-Wertes oftmals über nicht elektroneutrale Ionentransportproteine vonstattengehen, untersuchte diese Arbeit mit einem wenig invasiven Ansatz und weitgehend frei von den Limitationen bisheriger Studien (siehe 1.7. und Diskussion ab 4.1.), ob C5a das Membranpotential neutrophiler Granulozyten verändern kann. Daraus ergab sich folgende Hypothese der Arbeit (Abbildung 2):

Hypothese: Komplementaktivierungsprodukte wie das Anaphylatoxin C5a verändern das Membranpotential neutrophiler Granulozyten.

Zum Beweisen oder Verwerfen dieser Hypothese wurden folgende Teilschritte benannt:

1. Entwicklung und Validierung einer wenig invasiven Methode basierend auf Durchflusszytometrie zur Messung des Membranpotentials bzw. dessen Veränderung von intakten neutrophilen Granulozyten in hohem Durchsatz

2. Charakterisierung des Verhaltens des Membranpotentials unter C5a-Stimulation als Beispiel für ein potentes Chemotaxin bei ausgeprägter Entzündung im Vergleich mit den PAMPs fMLP und LPS-Stimulation an menschlichen neutrophilen Granulozyten gesunder Spender

3. Darstellung der Abhängigkeit des Membranpotentials in Abhängigkeit von pH_i, pH_e und des mitochondrialen Membranpotentials

4. Translationale Anwendbarkeit der entwickelten Methode in einem porkinen hämorrhagischen Schockmodell

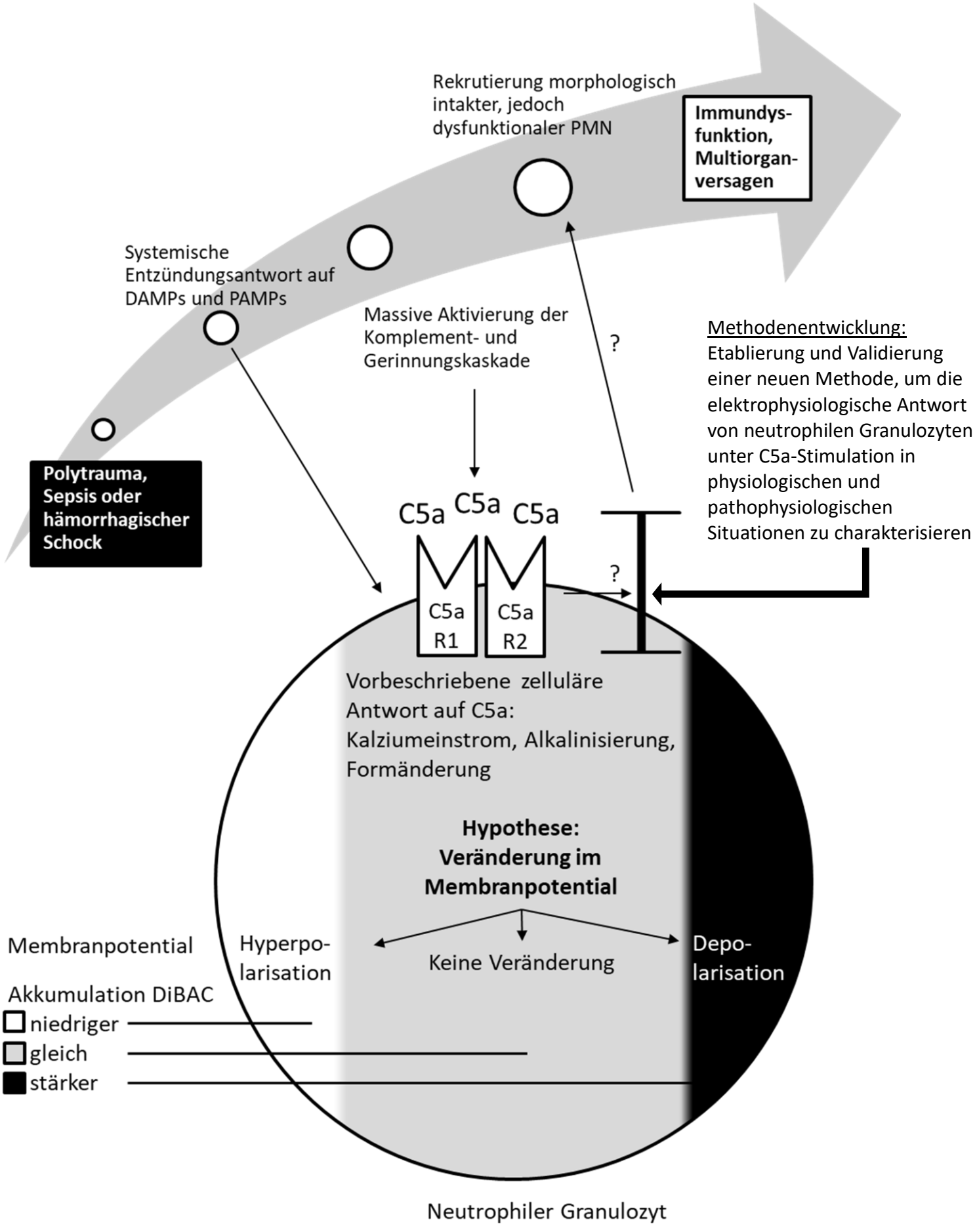

Abbildung 2
Zusammenfassung der Hypothese, Einordnung in den Gesamtkontext und Kurzdarstellung der Funktionsweise des Farbstoffes $DiBAC_4(3)$

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. GERÄTE UND CHEMIKALIEN

Soweit nicht gesondert angegeben, wurden die

- Chemikalien (z. B. C5a, Natrium, Glukose, …) von Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
- Blutentnahmematerialien (Safety-Multifly-Kanüle, S-Monovetten) von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
- Labormaterialien (Stripetten, Falcons, FACS-Tubes, …) von Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg, Deutschland)

bezogen.

Die verwendeten Materialien und Methoden für die Schweineversuche sind dokumentiert in dem genehmigten Antrag zur Durchführung eines Tierversuchsvorhabens (Hauptantragsteller: Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Radermacher, Registrierungsnummer 1087, Regierungspräsidium Tübingen) sowie unter [65].

Name / Abkürzung	**Modell / Firma**
0,9%-NaCl	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
2,7%-NaCl	2,7%-Natriumchlorid-Lösung, hergestellt aus destilliertem Wasser (Apotheke des Universitätsklinikums Ulm) und NaCl
Ampuwa	Sterilwasser, Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Blutgasanalyse (BGA)-Gerät	Modell ABL 700 Series, Radiometer GmbH, Willich, Deutschland
DiBAC$_4$(3)	bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II (Gerät) mit BDFACS Diva Software Version 6.12 (Software), Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Ficoll-Paque	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., USA
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
JC-1	5, 5´,6,6´-tetrachloro-1,1´,3,3´-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Microsoft Office Word, PowerPoint und Excel 2013 und 2016	Microsoft Corporation, USA
Mikroskop	VWR, Leuven, Belgien
Nigericin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NMDG	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Osmometer	Gefrierpunktosmometer Osmomat 030, Gonotec, Berlin, Deutschland
pH-Sonde	Basic Meter PB20, Sartorius, Göttingen, Deutschland
SNARF	Seminaphtharhodafluor (SNARF), Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wasserbad	Wasserbad „Julabo TW8“, Julabo, Seelbach, Deutschland
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm^2, 0,1 mm Tiefe), Brand, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3SR Plus, Thermo Fisher Scientific, Ulm, Deutschland

2.2. HERSTELLUNG DER ZELLPUFFERLÖSUNGEN

Die benötigten Chemikalien wurden einzeln in Sterilwasser gelöst. Hierbei entstand ein Konzentrat der jeweiligen Substanz in einer höheren Osmolarität als letztlich benötigt wurde. Die Osmolarität wurde anschließend mittels Osmometer bestimmt. Je nach gewünschter Zellpufferlösung wurden die benötigten Mengen an Konzentrat vereinigt

und anschließend mit Sterilwasser ergänzt, so dass eine definierte Gesamtosmolarität entstand. Als letzter Schritt wurde der pH-Wert mittels Natronlauge oder Salzsäure eingestellt und dies verifiziert. Die pH-Wert-Einstellung beeinflusste die Osmolarität allenfalls nur gering (<5%). Die Lösungen wurden mindestens alle vier Wochen neu angesetzt und bei sichtbaren Trübungen sowie größeren pH-Sprüngen verworfen. Im Rahmen der Herstellung wurden die ersten Lösungen mittels Blutgasanalysegerät kontrolliert.

Die Lösungen wurden nach dem Kaliumgehalt benannt. So enthielt beispielsweise die Lösung K4,5 entsprechend 4,5 mosmol / l Kalium ≙ Vollelektrolytlösung (vergleiche Tabelle 2).

Tabelle 2: Ionengehalt der Zellpufferlösungen und dazugehöriges berechnetes Membranpotential (MP), K = Kaliumgehalt des Puffers

Lösung	NaCl [mM]	KCl [mM]	$MgCl_2$ [mM]	$CaCl_2$ [mM]	HEPES [mM]	Glukose [mM]	MP [mV]
K3	142	3	1	1	10	5	-68,8
K4,5 (= Kontrolle)	140,5	4,5	1	1	10	5	-65,4
K7	138	7	1	1	10	5	-60,6
K9	136	9	1	1	10	5	-57,3
K15	130	15	1	1	10	5	-49,3
K51	94	51	1	1	10	5	-24,4
K98	47	98	1	1	10	5	-8,9

Final wurde die Gesamtosmolarität der Lösungen überprüft:
Gesamtosmolarität, bevor pH eingestellt wurde ≈ 310
Gesamtosmolarität, nachdem pH eingestellt wurde ≈ 320

In natrium- beziehungsweise kaliumfreien Medien wurde das jeweilige Ion durch NMDG bzw. in chloridfreien Medien Chlorid durch Natrium-Glukonat äquimolar ersetzt.

2.3. AUSWAHL UND BLUTENTNAHME VON GESUNDEN MENSCHLICHEN PROBANDEN

Für die freiwillige Blutentnahme lag ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universität Ulm unter den Antragsnummern 244/11 und 94/14 vor. Es wurden Männer und Frauen zwischen 18 und 35 Jahren herangezogen. Ausschlusskriterien waren eine bestehende Schwangerschaft, chronische sowie akute Erkrankungen (z.B. Störungen des Gerinnungssystems, Fieber, kürzliche Verletzungen, …) sowie Medikamenteneinnahmen, abgesehen von hormonellen Verhütungsmitteln.

Nach zweimaliger 30-sekündiger Desinfektion wurde ein venöser Blutstau an einer Oberarmseite angelegt und zwischen 10 und 20 ml Blut entnommen in Natrium-Zitrat-Monovetten.

2.4. VERSUCHSPROTOKOLL DES PORKINEN HÄMORRHAGISCHEN SCHOCKS

Das Blut für die Experimente entstammte dem Versuchsvorhaben „Hyperoxie und Hypothermie bei hämorrhagischem Schock“ (Hauptantragsteller: Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Radermacher, Registrierungsnummer 1087, Regierungspräsidium Tübingen, sowie [65]) der Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung des Universitätsklinikums Ulm.

Verwendet wurden männliche BMW-Schweine (Kreuzung aus Bretoncelles, Meishan, Willebrand, bezogen vom Laboratoire de Thrombose et d'Athérosclérose, Institut des Vaiseaux et du Sang, Hôpital Lariboisière, Paris, Frankreich), da diese eine für Schweine herabgesetzte Aktivität des Gerinnungssystems (genauer: des von-Willebrand-Faktors) besitzen, welche somit dem menschlichen Gerinnungssystem nahe kommt [14, 63, 70, 86]. Die Schweinepopulation besaß ein medianes Alter von 14,5 Monaten (Interquartilabstand 13 bis 16 Monate) und ein Mediangewicht von 68 kg (Interquartilabstand 61 bis 73) [65]. Der Umgang mit den Tieren erfolgte gemäß den Arrive-Leitlinien [38].

Der Versuch bestand aus vier Phasen: Instrumentierung, Stabilisierungsphase, Hämorrhagie und Reperfusion mit einer maximalen Versuchsdauer von 34 h. Die folgende Darstellung beschränkt sich auf den Abschnitt des Tierversuches, welcher für das Gewinnen der neutrophilen Granulozyten zur Untersuchung des Membranpotentials relevant war. Die Tiere wurden zunächst narkotisiert und anschließend entsprechend instrumentiert. Hierbei wurden diverse Katheter eingebracht (Magensonde, Katheter in beide Aa. femorales, beide Aa. carotes, beide Vv. jugulares, A. und V. renalis dextra, A. pulmonalis, Blasenkatheter). Hierbei wurde auch das Blut „vor Schock" aus einem arteriellen Katheter der A. carotis gewonnen sowie das Untersuchungsmaterial für die Blutgasanalyse. Es folgte eine vierstündige Stabilisierungsphase.

Nun wurde durch Entnahme von 30% des anhand des Körpergewichtes geschätzten Blutvolumens ein hämorrhagischer Schock induziert. Dieser wurde über 3 h beibehalten, wobei ein mittlerer arterieller Blutdruck von 40 ± 5 mmHg durch viertelstündliche Entnahme bzw. Retransfusion angestrebt wurde. Unmittelbar vor der Beendigung dieser Schockphase wurde nach 3 h erneut Blut gewonnen für die Analyse „nach Schock". Der für diese Arbeit relevante Teil des Versuches endete damit. Der Versuch wurde jedoch je nach experimenteller Gruppe weitergeführt bestehend aus einer Reperfusionsphase und gegebenenfalls einer Intervention. Der Versuchsablauf und dessen Fortführung wurde bereits detailliert hier veröffentlicht [43, 65]. Für die Versuche an isolierten porkinen neutrophilen Granulozyten wurde kommerziell erhältliches, humanes, rekombinantes C5a eingesetzt. Porkines C5a ist biologisch aktiver als humanes C5a und durchaus ähnlich in der Zusammensetzung der Aminosäuren (23 von 74 bzw. 31% der Aminosäuren sind verschieden, wobei nur 4 von 74 Aminosäuren bzw. 5% einer Gruppe mit anderen chemischen Eigenschaften angehören) [42, 59].

2.5. ISOLATION VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

Das entnommene Blut von Menschen beziehungsweise von Schweinen wurde im Verhältnis 1:1 mit 0,9%-NaCl vermischt und anschließend über Ficoll-Paque geschichtet (ca. 30 ml Blut-NaCl-Gemisch auf 15 ml Ficoll-Paque). Nach 30-minütiger

Zentrifugation bei 340 g und Raumtemperatur verblieben in der unteren Phase neutrophile Granulozyten und Erythrozyten. Danach erfolgte die Sedimentation der Erythrozyten über 30 min in einer 5%-Dextranlösung. Der Überstand wurde entnommen, im Verhältnis 1:1 mit 0,9%-NaCl vermischt und bei Raumtemperatur und 340g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das verbliebene Pellet wurde in 10 ml Sterilwasser gelöst und dreimal in einer Stripette hinauf und hinunter gesogen, um mittels osmotischer Lyse die verbliebenen Erythrozyten zu zerstören. Nach Normalisierung der Osmolarität durch 5 ml 2,7%-NaCl und 25 ml 0,9%-NaCl erfolge ein letzter Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden in K4,5 resuspendiert und mittels Zählkammer auf die gewünschte Konzentration von 2 x 10^6 pro ml eingestellt.

2.6. ISOLATION VON LEUKOZYTEN AUS VOLLBLUT

Das entnommene Blut von Menschen wurde 5 min bei Raumtemperatur und 340 g zentrifugiert und der Plasmaüberstand verworfen. Die zellulären Blutbestandteile wurden in 1-ml-Einheiten verteilt und einer osmotischen Lyse zur Entfernung der Erythrozyten unterzogen, in dem zunächst 10 ml Sterilwasser dazu gegeben und das Gemisch dreimal in einer Stripette hoch und runter gesogen wurde. Anschließend wurden isotone Verhältnisse durch Zugabe von 5 ml 2,7%-NaCl-Lösung wiederhergestellt sowie weitere 25 ml 0,9%-NaCl-Lösung hinzugegeben. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur für 5 min bei 340 g. Dieser Vorgang wurde drei bis fünf Mal wiederholt, bis makroskopisch keine roten Blutbestandteile im Pellet mehr sichtbar waren. Die Zellen wurden in K4,5 resuspendiert und mittels Zählkammer auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

2.7. FÄRBUNG DER ZELLEN UND MESSUNG MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Durchflusszytometrie beschreibt ein automatisiertes Messverfahren, bei denen Tausende von Zellen innerhalb von Sekunden in einem Flüssigkeitsstrahl verschiedene

Laser passieren. Das Licht der Laser wird dabei verändert, was gemessen werden kann. Das verwendete Durchflusszytometer war ausgerüstet mit einem blauen Laser (488 nm) und einem roten Laser (640nm). Jeweils vor den Einsätzen der Farbstoffe wurde regelmäßig eine Kompensation der Wellenlängen untereinander vorgenommen. Gemessen wurde in den Kanälen FITC, PE, APC und Per-CP. Des Weiteren wurde als näherungsweiser Marker für die Zellgröße der FSC-A und für den Grad der Granulierung der SSC-A-Wert bestimmt. Durch Überprüfen der Proportionalität von FSC-A und FSC-H konnte ausgeschlossen werden, dass Doubletten (nie über 5%) die Messungen beeinflusst haben. SSC-A und FSC-A wurden herangezogen, um sicherzustellen, dass die jeweils gewünschte Zellpopulation gemessen wurde (neutrophile Granulozyten versus Makrophagen versus Lymphozyten). Es wurden zwischen 5 000 und 10 000 Zellen pro Messung ausgewertet.

2.7.1. MEMBRANPOTENTIAL

Die isolierten Zellen wurden als Einheit mit dem Farbstoff $DiBAC_4(3)$ gefärbt und unmittelbar danach auf die entsprechenden FACS-Röhrchen verteilt. In diesen waren bereits die benötigten Kaliumlösungen vorgelegt. Farbstoff und Kalium wurden jeweils höher konzentriert vorgelegt als benötigt, da durch das Vermischen die Konzentration nochmals verändert wurde. Die Konzentration von $DiBAC_4(3)$ betrug nach dem letzten Verdünnungsschritt jeweils 40 µM. Die Zellen wurden über 10 min bei 37°C im abgedunkelten Wasserbad gefärbt, wo sie also bereits Kontakt sowohl zu den Kaliumlösungen hatten als auch zu dem Farbstoff. Weiterhin wurde bei der Inkubation des Farbstoffes berücksichtigt, dass zwischen den Messungen rund 30 s vergehen. Das bedeutet, dass beispielsweise bei einer Messung der Röhrchen K4,5, K15 und C5a 100 ng / ml der Farbstoff bei 0:00, 0:30 und 1:00 min Kontakt zu den Zellen bekam, der 10 min Messzeitpunkt erfolgte also bei 10:00, 10:30 und 11:00.

Der Farbstoff bildet ein Gleichgewicht zwischen intrazellulärem, also zytoplasmatischem, und extrazellulärem Kompartiment. Er reichert sich nur unbedeutend in anderen Zellkompartimenten (zum Beispiel Mitochondrien) an und ist somit ein relativ spezifischer Indikator für das Membranpotential. Zwischen den

Messzeitpunkten wurden die Zellen jeweils in den FACS-Röhrchen im 37°-warmen Wasserbad gelagert.

Wird das Membranpotential negativer (Hyperpolarisation), so vermag weniger Farbstoff in die Zelle einzudringen und die Fluoreszenz der Zelle nimmt ab (Anregung bei 488 nm; Messung bei 519 nm, also im FITC-Kanal). Dies erklärt sich durch die negative Ladung des Farbstoffes, welcher als Anion vorliegt. Eine Zunahme der Fluoreszenz ist im Umkehrschluss gleichbedeutend mit einer Depolarisation (das Membranpotential wird positiver, Abbildung 2).

2.7.2. MITOCHONDRIALES MEMBRANPOTENTIAL

Das Vorgehen fand analog zum Membranpotential statt, wobei die Zellen mit dem Farbstoff JC-1 bei einer Konzentration von 200 nM bei 30 min in K4,5 gefärbt wurden. Der Farbstoff wurde bei 488 nm angeregt. Je nach mitochondrialem Membranpotential liegt der Farbstoff entweder bei sehr negativem Membranpotential überwiegend als Monomer vor und strahlt maximal bei 529 nm (gemessen im FITC-Kanal), oder er liegt bei positiverem Membranpotential als J-Aggregat vor und strahlt maximal bei 590 nm (gemessen im PE-Kanal).

Aus den Fluoreszenzen wurde ein Verhältnis gebildet: PE- / FITC- Fluoreszenz. Ein hoher Wert weist somit auf ein relativ positives, ein negativer Wert auf ein relativ negatives mitochondriales Membranpotential hin.

Als Bezugspunkt wurde CCCP eingesetzt, welches das mitochondriale Membranpotential bekannterweise auf null kollabieren lässt [88]. CCCP wurde hierbei in einer Konzentration von 50 µM eingesetzt und zusammen mit dem Farbstoff 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

2.7.3. PH-INTRAZELLULÄR

Der Farbstoff SNARF wurde über 20 min bei einer Konzentration von 1 µM im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur mit 340 g für

5 min zentrifugiert und in K4,5 resuspendiert, um den überschüssigen Farbstoff zu verwerfen. Je nach Experiment wurde dann gegebenenfalls noch eine Inkubationsphase mit einem anderen Farbstoff angeschlossen (siehe dort).

Das Fluorochrom reichert sich intrazellulär an. Dort verändert es sein Fluoreszenzspektrum in Abhängigkeit von dem intrazellulären pH-Wert. Dieses veränderte Fluoreszenzspektrum wurde in den Kanälen PE und PerCP durchflusszytometrisch bestimmt. Es wurden 2 x 10^6 Zellen / ml für 20 min bei 37 °C unter Lichtabschirmung mit 1 µM SNARF in K4,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmalig gewaschen und resuspendiert. Da das Ziel der Versuche eine „Doppelfärbung" aus Messung des Membranpotentials (siehe 2.7.1.) und des internen pH-Werts war, folgte eine zehnminütige Inkubation mit dem Farbstoff zur Messung des Membranpotentials. Anschließend wurden die Zellen wie beschrieben stimuliert und gemessen.

Das Erstellen der Eichkurve für den intrazellulären pH-Wert erfolgte wie für die Messungen beschrieben, jedoch wurden die gefärbten Zellen in K4,5 mit unterschiedlichen extrazellulären pH-Werten (pH 5,6; 6,2; 6,8; 7,0; 8,0; 8,2) und mit Nigericin inkubiert. Nigericin wurde in einer Konzentration von 10 µg / ml eingesetzt und ist ein Ionophor, welches ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem pH-Wert herstellt.

Die so ermittelte Gleichung lautete:

$$\mathrm{pH_i} = \frac{\frac{\text{Fluoreszenz PE}}{\text{Fluoreszenz PerCP}} - 7{,}20}{-0{,}69}$$

2.7.4. C5A-REZEPTORDICHTE

Die Bestimmung der Oberflächenexpression von C5aR1 wurde mittels Anti-C5a-Antikörper (Anti-CD-88) durchgeführt, welche im FITC-Kanal zu messen waren. Die neutrophilen Granulozyten wurden hierzu 20 min inkubiert und anschließend

gewaschen. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu berücksichtigen, wurde eine passende Immunglobulin-G-Isotypenkontrolle parallel dazu gemessen und entsprechend abgezogen.

2.8. ENTWICKLUNG UND FEINANPASSUNG EINES ALGORITHMUS ZUR BERECHNUNG DES MEMBRANPOTENTIALS

Anhand der GHK-Gleichung (siehe 1.6. und der dort beschriebenen Literatur) wurde je nach externen Ionenkonzentrationen das Membranpotential berechnet. Folgende Werte wurden dabei angenommen:

P_{Na} = 0,05 und P_K = 0,95
$[Na]_i$ = 14 mM und $[K]_i$ = 140 mM
ϑ = 37 °C

Chlorid wurde nicht berücksichtigt, da es stets in gleicher Konzentration in den externen Lösungen vorhanden war. In der Diskussion (siehe 4.1. und 4.4.) werden diese Annahmen weiter kommentiert.

Somit ergab sich für K4,5 ein Membranpotential von -65,4 mV und für K15 ein Membranpotential von -49,3 mV. Folgende Gleichung ließ sich aus den gemessenen Fluoreszenzen aufstellen:

$$\frac{\Delta \text{ Fluoreszenz}}{\Delta \text{ Membranpotential}} = \frac{\text{Fluoreszenz K15} - \text{Fluoreszenz K4,5}}{\text{Membranpotential K15} - \text{Membranpotential K4,5}}$$

Hier eine beispielhafte Darstellung für eine Messung:

$$\frac{187 \text{ AU}}{1 \text{ mV}} = \frac{6312 \text{ AU} - 3301 \text{ AU}}{-49{,}33 \text{ mV} - (-65{,}41 \text{ mV})}$$

Nun war für diese Probe zu diesem Zeitpunkt bekannt, wie eine Abweichung von der Kontrolle zu dem Stimulans zu quantifizieren ist – gleichsam als Steigung der Eichgeraden. In obigem Beispiel wurde für die Kontrolle (K4,5) eine Fluoreszenz von 3301 AU gemessen und für das Stimulans (C5a 100 ng / ml) eine Fluoreszenz von 4328 AU. Es galt:

$$\Delta \text{ Membranpotential} = \frac{\text{Fluoreszenz Stimulans} - \text{Fluoreszenz Kontrolle}}{\text{Steigung}}$$

Setzt man die gegebenen Beispielwerte ein, so ergibt sich:

$$5{,}48 \text{ mV} = \frac{4328 \text{ AU} - 3301 \text{ AU}}{187 \frac{\text{AU}}{\text{mv}}}$$

Mit diesem Rechenvorgehen wurden bei entsprechend definierten Annahmen Abweichungen des Membranpotentials bestimmt.

2.9. ETHIK

Die Blutspenden für die Versuche an gesunden Freiwilligen erfolgten nach Aufklärung und schriftlicher Zustimmung (siehe auch Abschnitt 2.3., Ethikvotum 244/11 und 94/14 der Ethikkommission Ulm).

Die Schweineversuche wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen (Konrad-Adenauer-Straße 20, D-72072 Tübingen) unter der Registrierungsnummer 1097 genehmigt (siehe auch Abschnitt 2.4).

2.10. STATISTISCHE ANALYSE UND UMGEBUNGSVARIABLEN

So nicht explizit anders angegeben, fanden alle Experimente bei Raumluft (circa 20°C) statt. Die Zellen inkubierten mit dem jeweiligen Farbstoff in einem nicht-bewegten, lichtgeschützten Wasserbad bei 37°C und wurden zwischen den Messungen dorthin zurückgebracht. Es wurden jeweils 2 x 10^6 Zellen / ml eingesetzt. Bei den Versuchen mit gesunden Freiwilligen wurden unter einer Versuchspersonenanzahl unter fünf ($n<5$) nie ein gleicher Proband doppelt verwendet, bei höheren Probandenzahlen teilweise schon, wobei jeweils ein anderer Abnahmetag gewählt wurde. Es wurde bei der Messung des Membranpotentials nach 1 min bei C5a = 100 ng / ml überprüft, ob das mehrmalige Nutzen eines Probanden eine Veränderung der Zahlen ergab. Dies war jedoch nicht der Fall.

Fehlerbalken in Diagrammen (außer den Boxplots) sind jeweils als SD (Standard Deviation, Standardabweichung) angegeben. Ausreißer wurden mittels z-score identifiziert und eliminiert. Mittels „D'Agostino & Pearson omnibus normality test" wurden die Daten zunächst auf Normalitätsverteilung geprüft. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde bei normalverteilten Daten der „unparied t-test" beziehungsweise bei nicht normalverteilen Daten der „Mann Whitney U Test" herangezogen. Falls vergleichend mit unstimulierten Kontrollzellen (entspricht 0 mV Abweichung im Membranpotential) getestet wurde, so wurde für normalverteilte Daten der „t-sample-t-test" sowie für nicht normalverteile Daten der „Wilcoxon signed rank test" angewendet. Für Vergleiche zwischen mehreren Gruppen wurde eine ANOVA („analysis of variance") durchgeführt, wobei das „post hoc testing" bei normalverteilten Daten mit einer „Kruskal-Wallis"-Analyse durchgeführt wurde und im Falle nicht normalverteilter Daten mit „Dunn's post hoc testing". Zur Durchführung

der statistischen Berechnungen wurde die Software GraphPad Prism 5 verwendet. Die Grafiken wurden mit Microsoft Office 2013 Excel, Word und PowerPoint erstellt.

Das Signifikanzniveau ist durch * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ ausgedrückt und wird entweder im Vergleich der Gruppen untereinander oder zu Null in Bezug gesetzt.

3. ERGEBNISSE

3.1. EICHKURVE MEMBRANPOTENTIAL

In Vorversuchen zeigte sich, dass der Einsatz des Farbstoffes $DiBAC_4(3)$ bei humanen neutrophilen Granulozyten eine hinreichende Präzision erfordert. Wie zu erwarten war, verhielt sich die Fluoreszenz annähernd proportional zur Zellzahl bzw. der eingesetzten Farbstoffkonzentration. Hingegen verhielt sich die Fluoreszenz zwischen verschiedenen Probanden bzw. Zellisolaten nicht gleich (siehe Abbildung 3, Abbildung 4). Des Weiteren stellte sich keine konstante Fluoreszenz über die Zeit ein (siehe Abbildung 3, Abbildung 4), dies konnte auch durch längeres Inkubieren nicht erreicht werden. Der Unterschied zwischen K4,5 und K15 betrug rund 15 mV.

Da die nachfolgend gemessenen Unterschiede des Membranpotentials eine hohe Messgenauigkeit der Methode erforderten, wurde zu jedem Probanden bei jedem Messzeitpunkt eine Eichkurve bestehend aus den Punkten K4,5 und K15 angefertigt.

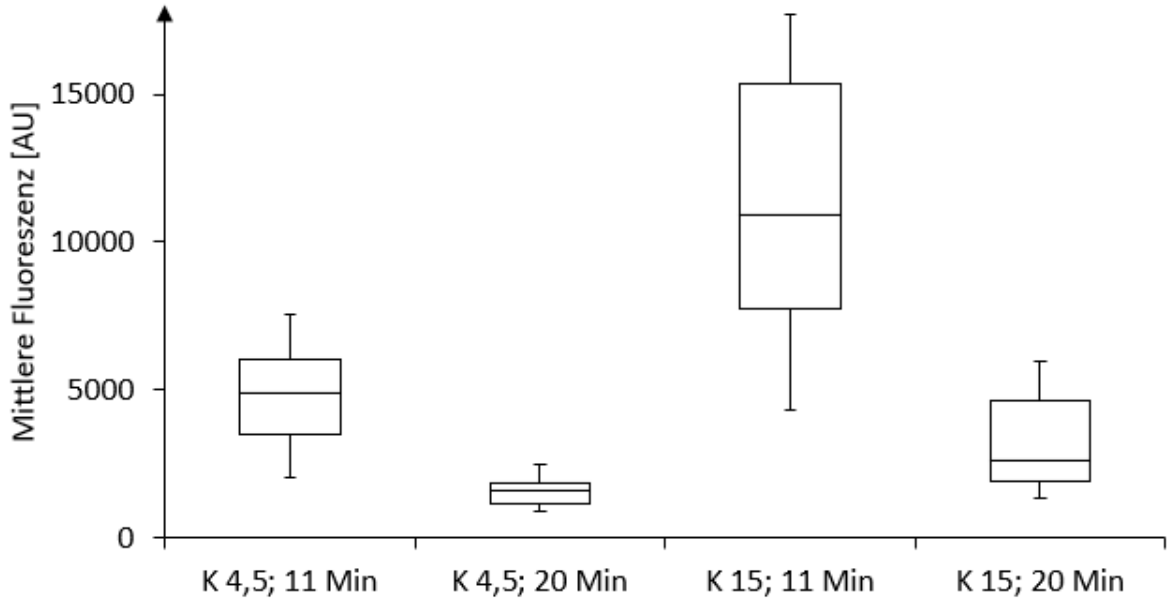

Abbildung 3
Fluoreszenzwerte des Farbstoffes $DiBAC_4(3)$ in Abhängigkeit von Kalium-Konzentration und Zeit (n = 15-19 Probanden).
11 min bedeutet, dass die humanen neutrophilen Granulozyten für 11 min Kontakt zum Farbstoff gehabt haben. In den folgenden Experimenten wurde dann bei 10:00 min C5a etc. dazugegeben, so dass bei 11:00 min die betreffende Substanz schon 1 min Kontakt zu den Zellen hatte. Achse vertikal: durchschnittliche Fluoreszenz in AU = Arbitrary Units. PMN = polymorphkernige Granulozyten, K = Kaliumgehalt der Puffer, siehe 2.2., C5a = Komplementfaktor 5a

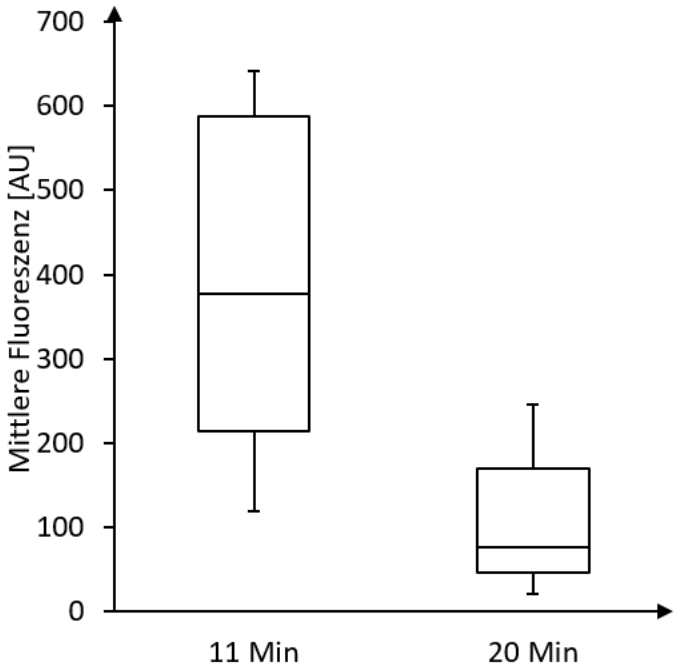

Abbildung 4
Steigung der Eichkurve (n = 15): Veränderung der Fluoreszenz / mV. Lesebeispiel: Bei 11 min Vorinkubationszeit galt (median, gerundet): Pro 400 AU Fluoreszenz stieg das Membranpotential um 1 mV.
Achse vertikal: durchschnittliche Fluoreszenz in AU = Arbitrary Units

Abbildung 4 zeigt die Streuung der Steigungen nach unterschiedlichen Proben und Zeit. Die verbliebene Fluoreszenz von K4,5 20 min betrug im Vergleich zu K4,5 11 min 34,2% (± 6,4%). Auch bei Inkubationszeiten von bis zu 60 min stellte sich kein stabiles Fluoreszenzniveau ein.

Als letzter Punkt wurde überprüft, ob das Anfertigen einer Eichkurve bestehend aus zwei Punkten ausreichend genau ist, und ob gleichzeitig die Methode nicht nur eine Depolarisation (z.B. K4,5 → K15) abbilden kann, sondern auch eine Hyperpolarisation (z.B. K4,5 → K3).

Abbildung 5 zeigt, dass die Steigung bei einer Eichkurve mit fünf Punkten nicht wesentlich von einer Eichkurve mit zwei Punkten abwich. Der Vergleich fand mit fünf Probanden statt. Weiterhin ließ sich damit zeigen, dass der Versuchsaufbau schon kleine Abweichungen des Membranpotentials darstellen kann. So entsprach eine Veränderung des extrazellulären Kaliums von 4,5 mM auf 7 mM einer Verschiebung des Membranpotentials von -65,4 mV auf -60,6 mV (siehe Abbildung 5, gleiche Umgebungsvariablen und Leitfähigkeiten vorausgesetzt).

Bei allen anderen Messungen wurden nur die Eichpunkte K4,5 und K15 zugrunde gelegt. Hierbei ergab sich eine Steigung von circa 6% (siehe Abbildung 5). Um

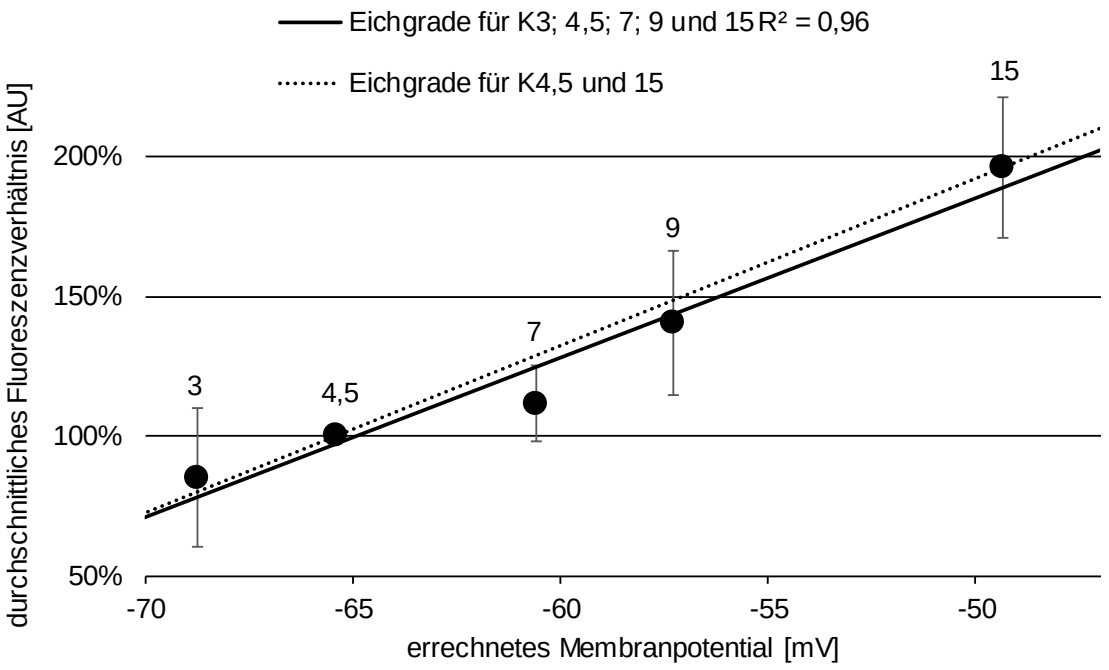

Abbildung 5
Eichgrade (n = 5) bei einer unterschiedlichen Anzahl an Bezugspunkten. Die Steigung bei fünf Punkten beträgt 5,7%, bei zwei Punkten 6,0%. Lesebeispiel: Pro 1 mV Membranpotential nimmt die Fluoreszenz um 5,7% zu. Da K 4,5 den physiologischen Verhältnissen am nächsten ist, wurde es auf 100% gesetzt.
Achse vertikal: Berechnetes Membranpotential in mV in Abhängigkeit von Kalium in mM (Zahlen im Diagramm). Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

maximale Genauigkeit zu erzielen, wurde jedes Mal - also je Proband und je Messzeitpunkt - eine Eichkurve bestehend aus zwei Punkten erstellt, und die jeweilige Probe anhand ihrer individuellen Eichkurve ausgewertet. Das Vergleichen der Eichkurven fand jeweils bei 11 min Vorinkubationszeit mit dem Farbstoff statt (entspricht 10 min Vorinkubation plus in den Experimenten mit Stimulans 1 min Stimulationszeit).

3.2. VERÄNDERUNGEN DES MEMBRANPOTENTIALS AUF STIMULATION MIT C5A UND LPS BEIM GESUNDEN MENSCHEN

3.2.1. MEMBRANPOTENTIAL

Neutrophile Granulozyten von gesunden menschlichen Spendern reagieren auf Stimulation durch den Komplementfaktor C5a mit einer Depolarisation. Die Stimulation zeigt eine Konzentrations-Wirkungs-Abhängigkeit (Abbildung 6). Es existieren keine signifikanten Unterschiede nach Geschlecht (♂: n = 15, MW = 4,3 mV, ± 2,6 vs. ♀: n = 7, MW 5,5 mV, ± 2,4; p = 0,32). Die Depolarisation nimmt im Laufe der folgenden 10 min ab und nähert sich dem Ruhemembranpotential (Abbildung 7).

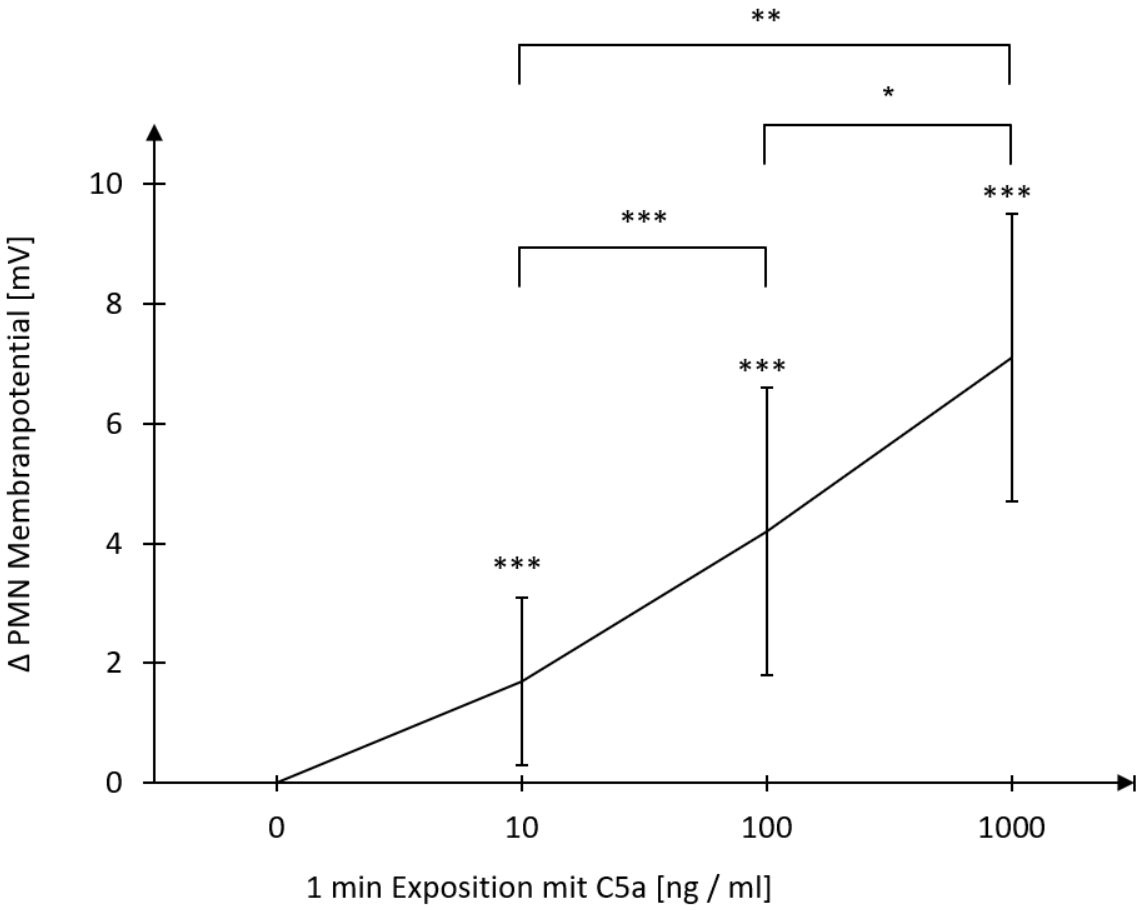

Abbildung 6
Reaktion des Membranpotentials von neutrophilen Granulozyten unter C5a-Stimulation: Jeweils nach 10 min Vorinkubationszeit Farbstoff plus 1 min Inkubation mit den angegebenen C5a-Konzentrationen wurde das Membranpotential gemessen. n = 11; 45; 6; für C5a 10; 100; 1000 ng / ml, dies entspricht rund 0,91; 9,1; 91 nM. Signifikanzniveaus: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$, ausgedrückt entweder im Vergleich der Gruppen untereinander oder zu Null. C5a = Komplementfaktor 5a, PMN = polymorphkernige Granulozyten. Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

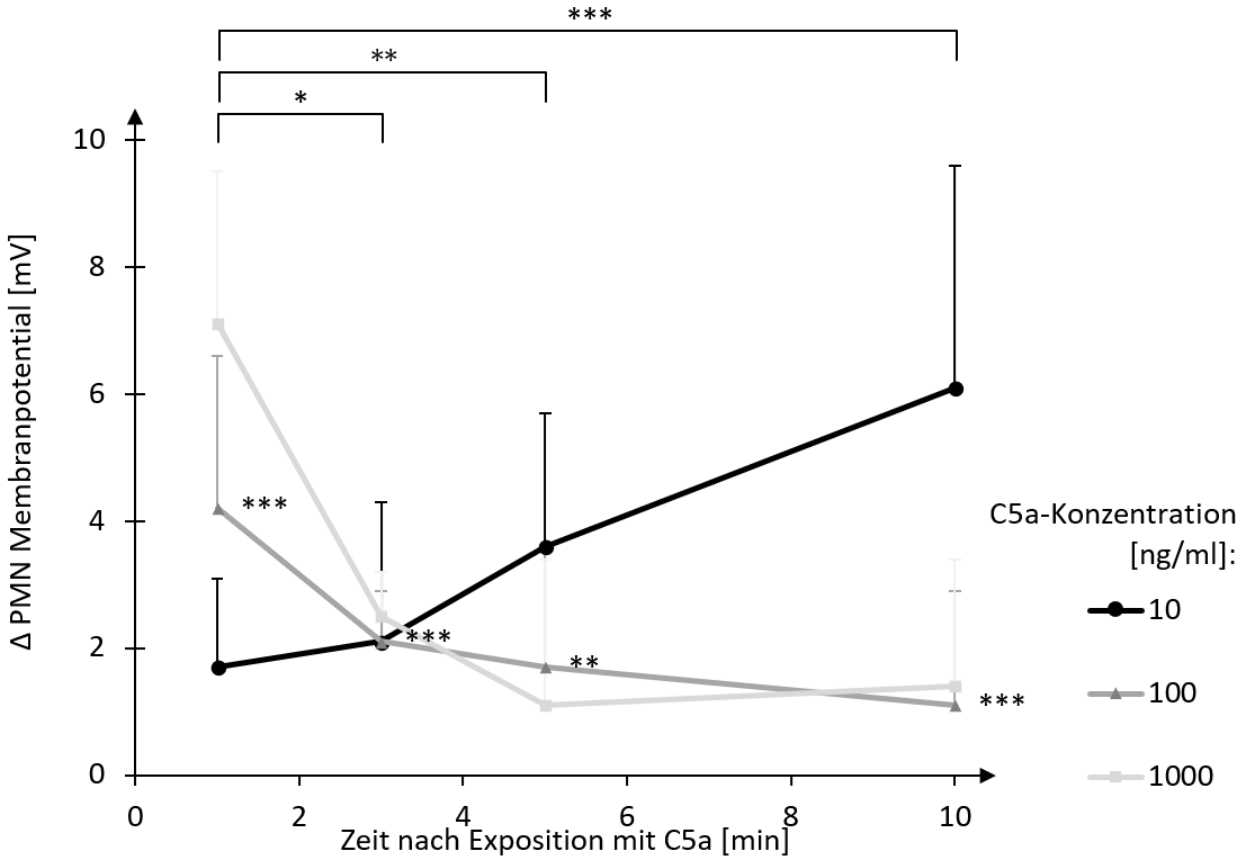

Abbildung 7
Analog zu Abbildung 6 ist die Abweichung des Ruhemembranpotentials unter Komplementstimluation gezeigt, hier im zeitlichen Verlauf (n = 10-23)
Das höhere Signifikanzniveau 1 min vs. 10 min ergab sich möglicherweise aus der höheren Probandenanzahl für diese Zeitpunkte. Signifikanzen im Bild unter den Zeitpunkten sind für C5a 100 ng / ml gegen die Kontrollgruppe angegeben.
Signifikanzen für 10 min: 100 vs. 10 ***, 100 vs. Ctrl ***, 10 vs. Ctrl ***, 1000 vs. Ctrl p = 0,18.
Signifikanzniveaus: * = p < 0,05, ** = p < 0,01 und *** = p <0,001, ausgedrückt entweder im Vergleich der Gruppen untereinander oder zu Null. C5a = Komplementfaktor 5a, PMN = polymorphkernige Granulozyten. Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

Der Verlauf der Änderungen im Membranpotential von neutrophilen Granulozyten verhält sich für C5a 100 ng / ml ähnlich wie für 1000 ng / ml. Im Gegensatz dazu verhält sich die Reaktion von neutrophilen Granulozyten auf C5a 10 ng / ml: Hier zeigt sich zunächst eine deutlich stärkere Depolarisation, welche mit der Zeit abnimmt (Abbildung 7).

Stimuliert man die Zellen mit LPS, so findet sich nahezu keine Veränderung des Ruhemembranpotentials (Abbildung 8). Waren die Zellen bereits vordepolarisiert

durch Zugabe eines höheren Kaliumgehaltes (K15, entspricht ca. 16 mV weniger negativem Membranpotential als K4,5), so reagieren die Zellen nahezu nicht mehr auf eine C5a-Stimulation (Abbildung 8). Das chemotaktische Peptid fMLP ruft verglichen mit C5a eine noch stärkere Depolarisation hervor. Der Komplementfaktor C3a vermag im Gegensatz zu C5a keine Depolarisation hervorzurufen (beides Abbildung 8).

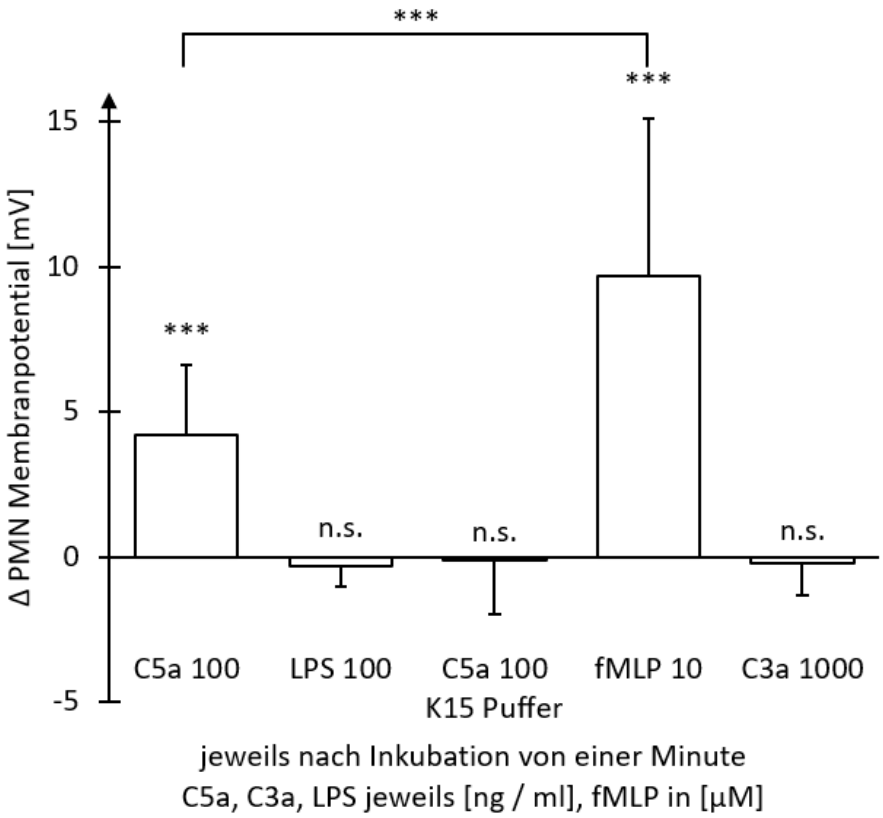

Abbildung 8
Veränderung des Membranpotentials neutrophiler Granulozyten bei Einsatz verschiedener Stimulantien, jeweils nach 1 min Inkubationszzeit für n = 45;6;8;10;3. Signifikanzen jeweils gegen unstimulierte Kontrollzellen. Bei C5a 100 ng / ml bei K15 wurde mit der K15-Lösung verglichen, sonst wie immer mit K4,5. Signifikanzniveau *** = p <0,001, ausgedrückt entweder im Vergleich der Gruppen untereinander oder zu Null. C3a/C5a = Komplementfaktor 3a/5a, PMN = polymorphkernige Granulozyten, LPS = Lipopolysaccharid, K = Kaliumgehalt des Puffers, siehe 2.2. Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

3.2.2. ANALYSE DER POPULATION NEUTROPHILER GRANULOZYTEN

Es wurde eine Analyse der Population der neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Dies erfolgte zum einen, um zu analysieren, ob die Veränderungen des Membranpotentials unter C5a-Stimulation durch eine kleine Gruppe stark depolarisierter Zellen hervorgerufen wurde oder durch eine kleine Änderung nahezu aller Zellen. Des Weiteren wurde damit überprüft, ob die durch C5a hervorgerufene Veränderung der Zellform mit dem Fluoreszenzsignal des Farbstoffes interagiert.

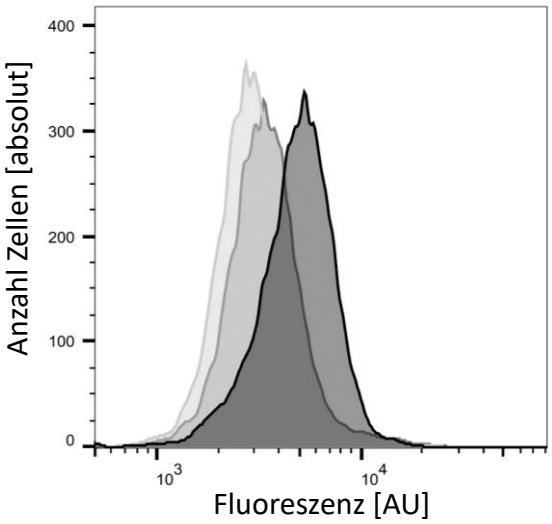

Abbildung 9
Exemplarische Darstellung der Neutrophilenpopulationen: Hellgrau = Kontrolle in K4,5, Mittelgrau = Einminütige Stimulation mit C5a 100 ng / ml in K4,5, Dunkelgrau = K15. AU = Arbitrary Units, K = Kaliumgehalt des Puffers, siehe 2.2., C5a = Komplementfaktor 5a Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

Abbildung 9 stellt Kontrollzellen, mit C5a stimulierte Zellen sowie depolarisierte Zellen in K15 gegenüber. In allen drei Populationen findet sich eine Veränderung des Durchschnittswertes der Fluoreszenz, welche nicht durch Ausreißer von kleinen Zelluntergruppen, sondern durch eine Änderung in nahezu der kompletten Zellpopulation bedingt sind.

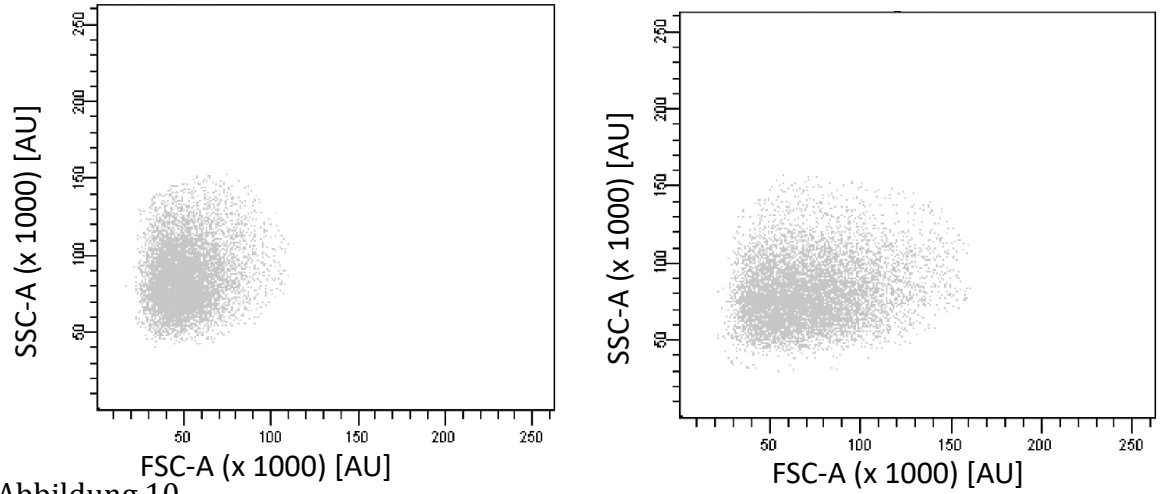

Abbildung 10
Exemplarische Darstellung im sogenannten Scatter Plot der Zellpopulation, bestehend aus neutrophilen Granulozyten vor Stimulation mit C5a 100 ng / ml (links) und nach einminütiger Stimulation (rechts). AU = Arbitrary Units, SSC/FSC = Seitwärts-/Vorwärtsstreulicht, C5a = Komplementfaktor 5a. Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

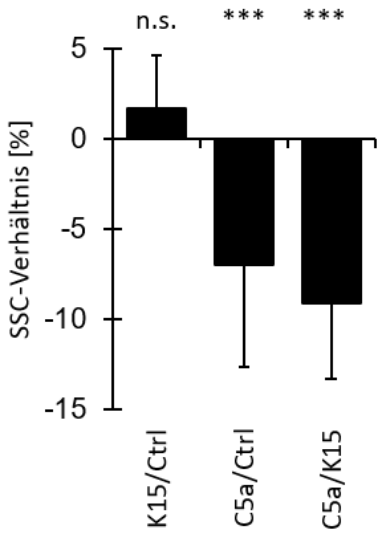

Abbildung 11
Änderung des SSC-Wertes von neutrophilen Granulozyten nach zehnminütiger Exposition in den jeweiligen Puffern plus gegebenenfalls einminütiger Stimulation mit C5a 100 ng / ml, n = 10-12. Signifikanzniveau: *** = p <0,001, ausgedrückt gegen Null. C5a = Komplementfaktor 5a, SSC = Seitwärtsstreulicht, K = Kaliumgehalt des Puffers, siehe 2.2. Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

Als nächstes wurde untersucht, ob C5a die Form der Zellen verändert und wenn ja, ob dies mit den Eigenschaften des Farbstoffes zur Messung des Membranpotentials interferiert. Abbildung 10 zeigt exemplarisch die Auswirkungen einer einminütigen Stimulation mit C5a 100 ng / ml auf neutrophile Granulozyten.

Bezogen auf den SSC-A-Wert als Näherung für die Granularität der Zellen zeigt sich eine geringe, aber signifikante Abnahme unter C5a-Stimulation (Abbildung 11). Eine Depolarisation, unabhängig von C5a, hervorgerufen durch einen höheren extrazellulären Kaliumgehalt, bewirkt hingegen keine signifikante Änderung der Granularität.

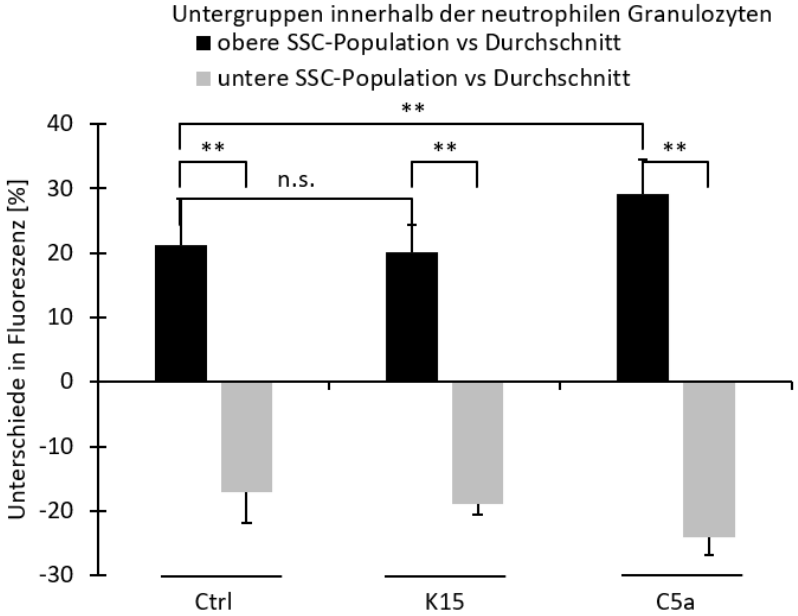

Abbildung 12
Analyse von Untergruppen der neutrophilen Granulozyten, definiert durch die jeweilig oberen bzw. unteren 25% des SSC-Wertes innerhalb der Population, verglichen mit dem Durchschnitts-SSC-Wert aller Zellen, n = 10-12, C5a 100 ng / ml. Signifikanzniveaus ** = p <0,01. C5a = Komplementfaktor 5a, SSC = Seitwärtsstreulicht, K = Kaliumgehalt des Puffers, siehe 2.2. Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

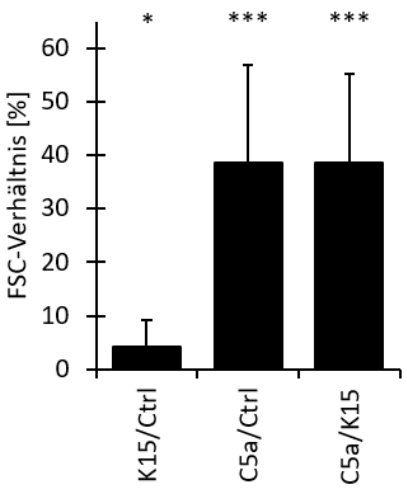

Abbildung 13
Änderung des FSC-Wertes von der Population neutrophiler Granulozyten nach zehnminütiger Lagerung in den jeweiligen Puffern plus gegebenenfalls einminütiger Inkubation mit C5a 100 ng / ml, n = 10-12. Signifikanzniveaus: * = p <0,05 und *** = p <0,001, ausgedrückt gegen Null. C5a = Komplementfaktor 5a, FSC = Vorwärtsstreulicht, K = Kaliumgehalt des Puffers, siehe 2.2. Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

Analysiert man, ob es innerhalb der neutrophilen Granulozyten Untergruppen gibt, die durch ihre relative Granularität definiert werden, so zeigt sich, dass sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch in K15-Puffer sowie nach einminütiger Stimulation mit C5a 100 ng / ml die Zelluntergruppe mit den oberen 25% der SSC-Werte einen höheren Fluoreszenzwert als der Durchschnitt aufweist und umgekehrt (Abbildung 12). Dabei fällt unter C5a-Stimulation der Unterschied signifikant höher aus als bei den Kontrollzellen (Abbildung 12). Der FSC-Wert als Maß für die Zellform und Näherungswert für die Zellgröße wird analog dem SSC-Wert betrachtet (Abbildung 13). Hierbei zeigt sich

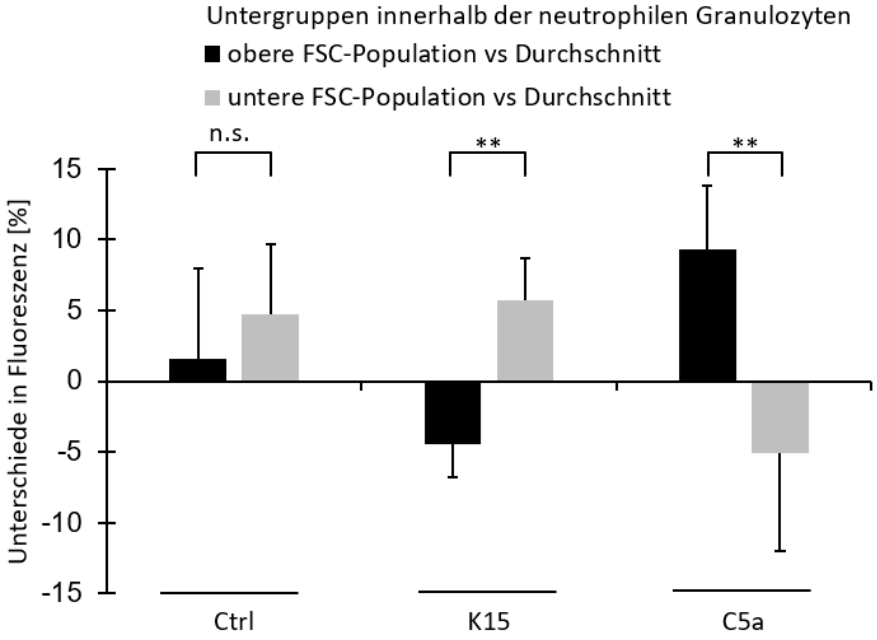

Abbildung 14
Analyse von Untergruppen der neutrophilen Granulozyten, definiert durch die jeweilig oberen bzw. unteren 25% des FSC-Wertes innerhalb der Population, verglichen mit dem Durchschnitts-FSC-Wert aller neutrophilen Granulozyten n = 10-12. C5a = 100 ng / ml. Signifikanzniveaus ** = p <0,01. C5a = Komplementfaktor 5a, FSC = Vorwärtsstreulicht, K = Kaliumgehalt des Puffers, siehe 2.2. Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

zunächst, dass sich durch eine forcierte Depolarisation mittels K15 eine leichte Zunahme des FSC-Wertes erzielen lässt. Eine einminütige Stimulation mit C5a führt zu einer knapp vierzigprozentigen Erhöhung des FSC-Wertes. Innerhalb der PMN-Gesamtpopulation ergibt sich unter Kontrollbedingungen kein Unterschied der Fluoreszenz, wenn man die neutrophilen Granulozyten in Zellen mit hohem und mit niedrigem FSC-Wert unterteilt (Abbildung 14). Unter C5a-Stimulation zeigt sich, dass die Zellen mit höherem FSC-Wert eine signifikant höhere Fluoreszenzwert vorweisen als die Zellen mit dem niedrigen FSC-Wert.

3.3. IONENAUSTAUSCHEXPERIMENTE

Um den Mechanismus der C5a-induzierten Depolarisation weiter zu charakterisieren, wurden verschiedene Ionen extrazellulär ersetzt. Da hierbei das Erstellen einer Eichkurve teilweise nicht möglich war, ist in Tabelle 3 jeweils das Verhältnis Kontrolllösung zu C5a angegeben. Es zeigte sich, dass das Ersetzen und der osmolare Ausgleich von Ionen (Na^+, K^+, Cl^-) bzw. das Weglassen (Ca^{++}, Mg^{++}) keinen ausgeprägten Einfluss auf die relative Fluoreszenzzunahme hat.

Tabelle 3: Inkubation von Neutrophilen in Puffern, bei denen jeweils das genannte Ion ersetzt worden ist. Dargestellt ist die durchschnittliche Veränderung der Fluoreszenz nach Inkubation mit C5a = Komplementfaktor 5a 100 ng / ml für 1 min.

Ersetztes Ion	Durchschnitt der C5a-induzierten Depolarisation vs. unstimulierte Zellen	vs. unstimulierte Zellen p =	n =
Kontrolle	33 %	0,01	9
K^+	20 %	0,02	7
Na^+	16 %	0,06	5
Ca^{++}	27 %	0,03	6
Mg^{++}	38 %	0,06	5
Cl^-	46 %	0,13	4

3.4. ZUSAMMENHANG MEMBRANPOTENTIAL UND INTRAZELLULÄRER PH-WERT

Das Membranpotential beeinflusst die Triebkraft für den Einstrom von Protonen nach intrazellulär. Es wurden zunächst die jeweils am stärksten fluoreszierenden Zellen

(„obere 25%“), also die Zellen mit dem innerhalb der Population am stärksten depolarisierten Membranpotential und der größten $DiBAC_4(3)$-Anreicherung, mit den am schwächsten fluoreszierenden Zellen verglichen („untere 25%“), bezogen auf ihren intrazellulären pH-Wert.

Tabelle 4 stellt dar, dass weder bei K4,5 noch K15 oder C5a in K4,5 ein signifikanter Unterschied zwischen den Populationen hinsichtlich des intrazellulären pH-Wertes besteht und somit das Membranpotential (oder zumindest dessen Indikator) nicht mit dem intrazellulären pH-Wert zusammenzuhängen scheint.

Tabelle 4: Gegenüberstellung des intrazellulären pH-Werts (pH_i) von Neutrophilen-Untergruppen mit relativ kleiner bzw. großer Fluoreszenz des Farbstoffes für das Membranpotential, n = 9. Die Unterschiede innerhalb der gleichen Kondition sind in keinem der Fälle signifikant. C5a = Komplementfaktor 5a, PMN = polymorphkernige Granulozyten, K = Kaliumgehalt des Puffers, siehe 2.2.

	pH_i Untergruppe PMN obere 25%	pH_i Untergruppe PMN untere 25%
K4,5	7,59	7,54
K15	7,68	7,56
C5a	7,69	7,54

Ergänzend wurde untersucht, ob die Depolarisierung in K15 im Vergleich zu K4,5 eine Veränderung des intrazellulären pH-Wertes bewirkt. Diese Versuche wurden mit verschiedenen extrazellulären pH-Werten durchgeführt.

Tabelle 5 stellt dar, dass allenfalls ein geringer Trend zu einer Alkalinisierung unter Depolarisation bestand, der jedoch bei der Fallzahl (n = 5) zu keiner Zeit signifikant war.

Tabelle 5: Gegenüberstellung des intrazellulären pH-Wertes von neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit des extrazellulären pH-Wertes in K4,5- und K15-Puffer (n = 5). C5a = Komplementfaktor 5a, K = Kaliumgehalt des Puffers, siehe 2.2. Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

pH extrazellulär	K4,5, pH intrazellulär	K15, pH intrazellulär
7,0	7,31	7,34
7,4	7,51	7,58
7,8	7,70	7,74

Das Milieu, in welchem sich neutrophile Granulozyten unter pathophysiologischen Bedingungen befinden, unterliegt teilweise erheblichen Schwankungen hinsichtlich des extrazellulären pH-Wertes. Daher wurde untersucht, ob der extrazelluläre pH-Wert den intrazellulären pH-Wert beeinflusst und ob der extrazelluläre pH-Wert die Veränderung des Membranpotentiales auf C5a-Stimulation beeinflusst. Abbildung 15 zeigt, dass der intra- und extrazelluläre pH-Wert in einem proportionalen Zusammenhang zueinanderstanden.

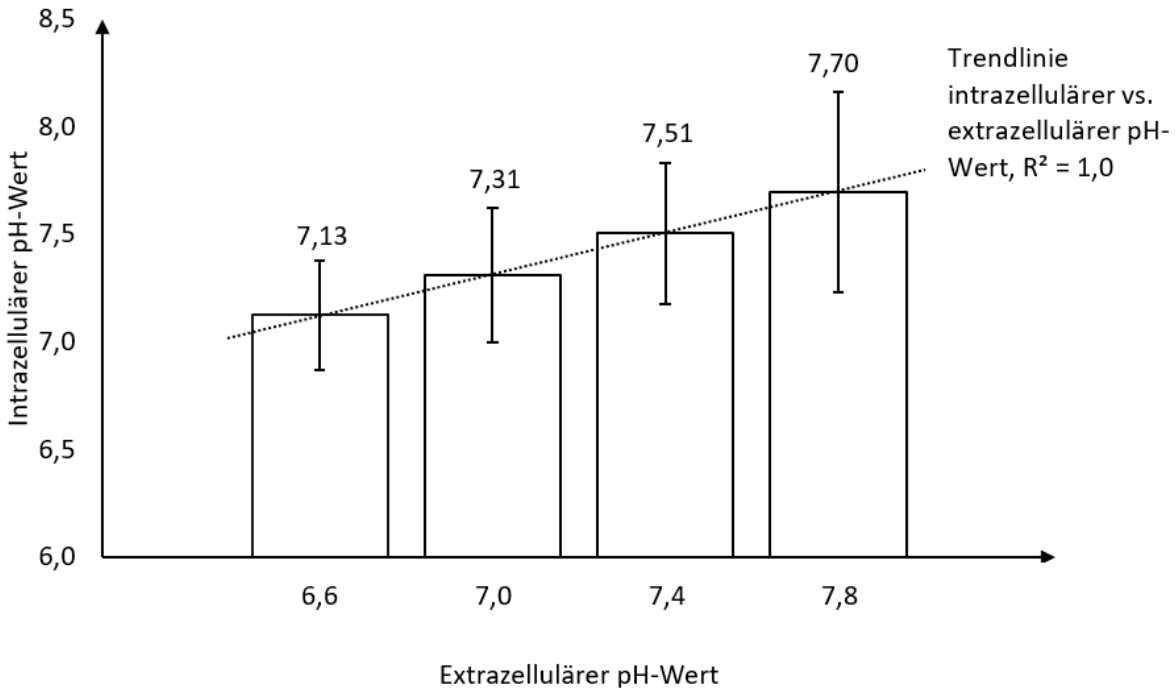

Abbildung 15
Abhängigkeit des intra- von dem extrazellulären pH-Wertes von neutrophilen Granulozyten je bei K4,5 (n = 5-9).
Achse vertikal: intrazellulärer pH-Wert nach elfminütiger Vorinkubation in den jeweiligen Lösungen. K = Kaliumgehalt des Puffers, siehe 2.2.

In einem weiteren Schritt wurde gezeigt, dass eine extrazelluläre Ansäuerung des pH-Wertes die Antwort des Membranpotentials der neutrophilen Granulozyten verstärkt, während eine Alkalinisierung diese abschwächt (Abbildung 16).

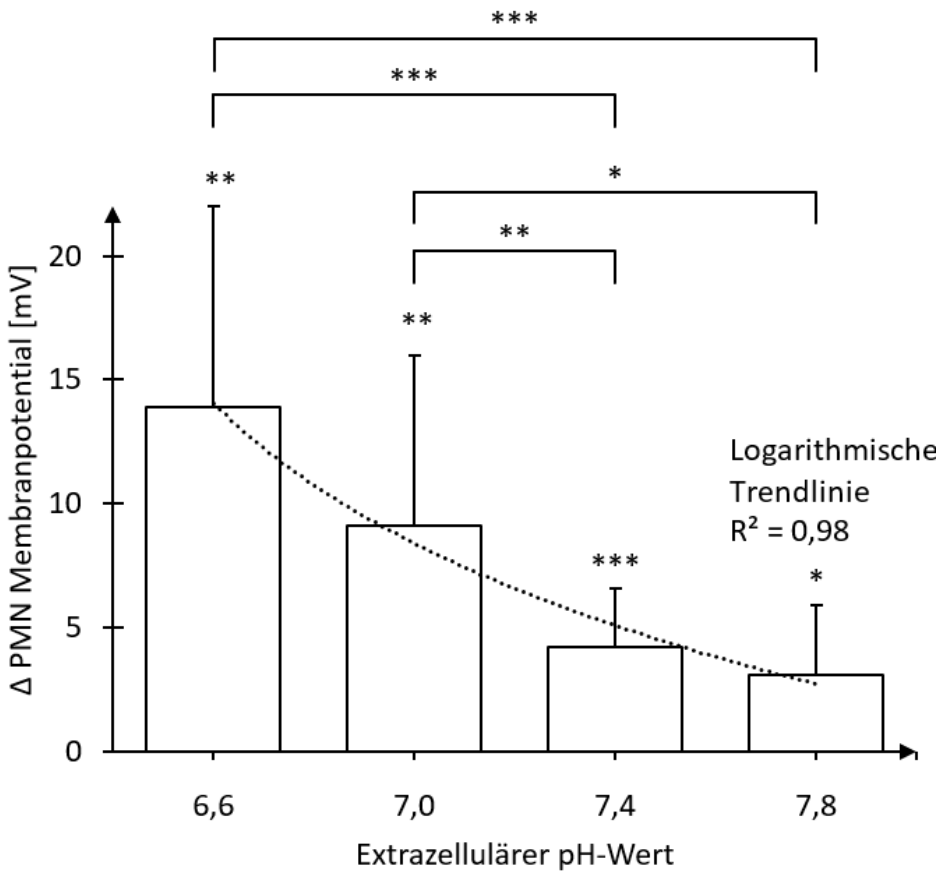

Abbildung 16
Abweichung des Ruhemembranpotentials von neutrophilen Granulozyten bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten. Nach zehnminütiger Vorinkubation in der entsprechenden Lösung wurde nach einminütiger Exposition von C5a 100 ng / ml gemessen (n = 5). In Punkten eingezeichnet ist eine logarithmische Trendlinie. PMN = polymorphkernige Granulozyten, C5a = Komplementfaktor 5a. Das Signifikanzniveau ist durch * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ ausgedrückt und wird entweder im Vergleich der Gruppen untereinander oder zu Null in Bezug gesetzt.
Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

3.6. C5AR1

C5a interagiert mit neutrophilen Granulozyten über C5aR1-Rezeptoren (CD88), welche mit einem entsprechenden Antikörper gemessen wurden. Um mögliche Untergruppen innerhalb der neutrophilen Granulozyten durch FSC und SSC-Werte zu charakterisieren und die Auswirkung einer Kalium-induzierten Depolarisation auf die C5aR1-Rezeptoren zu ermitteln, wurde die Rezeptorendichte bestimmt. Die SSC-Werte hängen nicht mit der Rezeptorendichte zusammen (Tabelle 6). Im Gegensatz dazu zeigt

die Untergruppe mit einem hohen FSC-Wert eine höhere Rezeptordichte und umgekehrt.

Eine zehnminütige Depolarisation mittels K15 ändert die Rezeptordichte von neutrophilen Granulozyten nicht signifikant innerhalb des Beobachtungsintervalls.

Tabelle 6: Zusammenhang von SSC, FSC, und extrazellulärem Kaliumgehalt mit der C5aR1-Rezeptordichte auf neutrophilen Granulozyten (n=5). Signifikanzniveau ** = p < 0,01. FSC/SSC: Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht, K = Kaliumgehalt des Puffers, siehe 2.2. Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

	C5aR1-Expression der links genannten Teilpopulation vs. Gesamtpopulation (SD)	Signifikanz
Obere 25% SSC	0,0% (4,5%)	n.s.
Untere 25% SSC	-3,5% (4,3%)	
Obere 25% FSC	9,5% (4,0%)	**
Unter 25% FSC	-9,1% (5,2%)	
K15 vs. Ctrl	-5,9% (5,3%) (K15 Abnahme um 5,9%)	n.s.

3.7. MONOZYTEN UND LYMPHOZYTEN

In den Vollblut-Experimenten von gesunden Spendern konnten durch das Wählen einer passenden Begrenzung von FSC und SSC (“gate”) Monozyten- und Lymphozytenpopulationen identifiziert werden. Bei drei Spendern wurden bei einem externen pH von 7,4 folgende Messwerte für das Membranpotential erhoben:

Bei den Monozyten beträgt die Fluoreszenzzunahme 1,8 % pro mV (SD ± 0,9 %). Nach einminütiger Inkubation mit C5a = 100 ng / ml ergab sich eine Abweichung des Membranpotentiales von 4,4 mV (SD ± 1,8).

Bei den Lymphozyten konnte keine brauchbare Eichkurve generiert werden.

3.8. MITOCHONDRIALES MEMBRANPOTENTIAL

Ferner wurde untersucht, ob eine Stimulation durch C5a neben dem Einfluss auf das Membranpotential auch einen Einfluss auf das mitochondriale Membranpotential hat.

Während der mitochondriale Entkoppler CCCP das mitochondriale Membranpotential deutlich beeinflusst, hat C5a keinen Effekt innerhalb des Beobachtungszeitraums von 10 min (Abbildung 17).

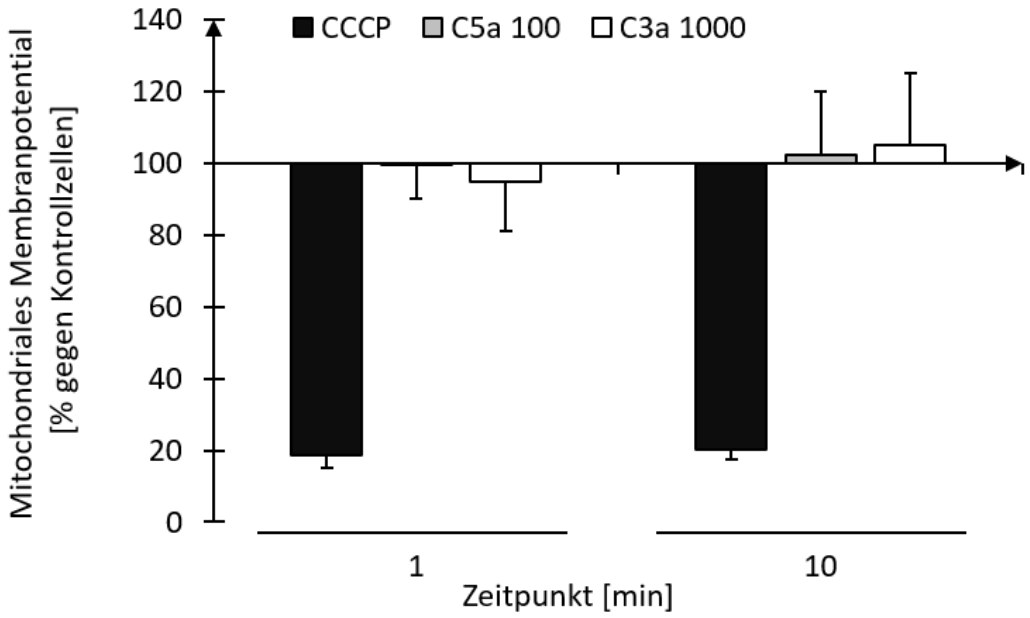

Abbildung 17
Mitochondriales Membranpotential von neutrophilen Granulozyten unter Anaphylatoxinstimulation (n = 4-6), jeweils normiert auf Kontrolle = 100%. Während der Entkoppler CCCP das mitochondriale Membranpotential deutlich senken konnte, blieb es unter C5a- und C3a-Stimulation [ng / ml] nahezu unverändert. C3a/C5a = Komplementfaktor 3a/5a, CCCP = Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon. Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

3.9. MEMBRANPOTENTIAL VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN IM PORKINEN HÄMORRHAGISCHEN SCHOCK

Die bisherigen Experimente wurden an gesunden, freiwilligen Spendern durchgeführt. Um die Relevanz der C5a-induzierten Depolarisation unter pathophysiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden in einem Versuchsaufbau des hämorrhagischen Schocks an Schweinen die Abweichung des Membranpotentials von im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten unter C5a-Stimulation vor und nach dreistündigem Schock bestimmt (Abbildung 18). Vor

dem Schock reagieren die Zellen noch deutlich auf C5a. Dagegen geht diese Reaktion nach dem Schockgeschehen deutlich zurück. LPS 100 ng / ml verursacht weder vor noch nach der Schockphase eine Änderung des Membranpotentials.

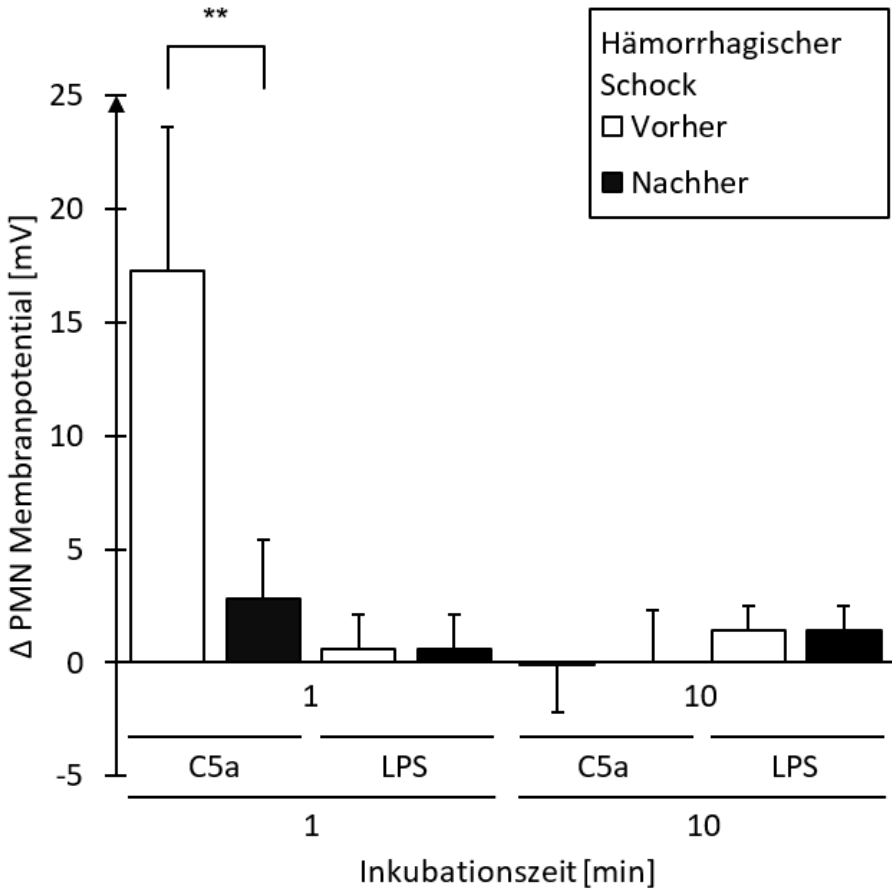

Abbildung 18
Vergleich der C5a-induzierten Depolarisation vor und nach dem dreistündigen hämorrhagischen Schock, n = 4 - 5. C5a = Komplementfaktor 5a, LPS = Lipopolysaccharid, PMN = polymorphkernige Granulozyten, Signifikanzniveau ** = $p < 0,01$ Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

Tabelle 7 zeigt die Messwerte der arteriellen Blutgasanalysen. Besondere Beachtung kommt der konstanten Ionenkonzentration und dem damit zu errechnenden Ruhemembranpotential der Zellen zu, welches sich – konstante Leitfähigkeiten vorausgesetzt – vor und nach dem Schock nahezu nicht verändert hat.

Tabelle 7: Messwerte der arteriellen Blutgasanalyse vor und nach dreistündigem hämorrhagischem Schock im Schwein (n = 4-5). Verändert nach [58], Erstveröffentlichung in Mediators of Inflammation.

	Einheit	Vor Schock / SD		Nach Schock / SD		Abweichung vor / nach [%]
pH		7,38	0,04	7,30	0,2	-1
pCO_2	mmHg	39,9	4,2	34,3	3,9	-13
pO_2	mmHg	126,8	15,9	89	20,5	-27
Hb	g/dl	7,3	0,5	12,2	3,23	69
Hämatokrit	%	22,8	1,5	37,3	9,8	66
sO_2	%	99,0	0,8	95,1	2,7	-4
K^+	mM	3,2	0,2	4,2	0,8	29
Na^+	mM	141,2	1,1	139,4	2,9	-1
Ca^{++}	mM	0,6	0,2	0,6	0,1	2
Cl^-	mM	94,6	2,1	100,4	3,8	6
Anionenlücke	mM	26,7	3,1	25,7	2,3	-3
Errechnetes Membran-potential	**mV**	**-68,3**	**0,6**	**-66,4**	**1,5**	**-3**
Glukose	mM	90,8	12,8	94,2	24,8	5
Laktat	mM	1,9	0,7	5,1	5,3	272
Thrombozyten	/ µl	240 800	71 304	184 600	60 443	-23
Leukozyten	/ µl	11 511	3 655	19 892	55 71	75

3.10. ABGLEICH MIT DER FRAGESTELLUNG

Die Ergebnisse sollen abschließend den formulierten Zielen der Arbeit (siehe 1.8.) gegenübergestellt werden.

Ausgangshypothese: Komplementaktivierungsprodukte wie das Anaphylatoxin C5a verändern das Membranpotential neutrophiler Granulozyten.

Die Hypothese konnte nach Adaptierung und Validierung einer geeigneten, die Zellen nicht übermäßig verändernden Methode verifiziert werden.

Neben den Ergebnissen stellt das Etablieren und die Validierung einer wenig invasiven Messmethode mit hohem Durchsatz für das intrazelluläre Membranpotential von neutrophilen Granulozyten sowie die Entwicklung einer „Doppelfärbung" (intrazellulärer pH und Membranpotential gleichzeitig) die Hauptleistung dieser Arbeit dar.

Teilschritte:

Ad 1: Wie in Abbildung 3 und Abbildung 4 gezeigt, wurden zwischen den einzelnen Spendern und zwischen verschiedenen Inkubationszeiten große Unterschiede gemessen. Durch Erstellung eines präzisen Ablaufplans der Experimente und durch das Anfertigen von individuellen Eichkurven zu jedem Zeitpunkt gelang es jedoch, verlässliche Eichkurven zu generieren – ohne dabei die neutrophilen Granulozyten übermäßig zu beeinflussen, beispielsweise durch Ionophore oder „Patch-Clamp"-Methoden. Die Zuverlässigkeit der Methode, kleine Veränderungen des Membranpotentials zu erfassen, zeigt Abbildung 5. Das Etablieren einer Methode zur nicht-invasiven Messung des Membranpotentials ist die Hauptleistung dieser Arbeit, da, wie in 4.1. und Abbildung 2 ausgeführt, dies in der bisherigen Literatur nur mit starken Einschränkungen erreicht werden konnte. Während sich die vorliegende Arbeit als neuer Beitrag mit C5a beschäftigt, wurde fMLP als Kontrolle herangezogen, da hierfür bereits eine Depolarisation beschrieben wurde.

Das Ziel kann als erreicht angesehen werden.

Ad 2: Für die Komplementfaktoren C3a und C5a gab es bisher keine oder nur eingeschränkt verwertbare Literatur hinsichtlich der Auswirkung auf das Membranpotential neutrophiler Granulozyten. Anhand isolierter neutrophiler Granulozyten von gesunden Menschen konnte gezeigt werden, wie C3a, C5a und LPS mit neutrophilen Granulozyten hinsichtlich des Membranpotentials interagieren (Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8). Um mögliche Untergruppen innerhalb der

Neutrophilenpopulation zu identifizieren, um Messartefakte auszuschließen und um zusätzlich eine Einflussnahme von C5a auf die Zellgröße und Zellgranularität zu analysieren, wurden darüber hinaus weitergehende Analysen durchgeführt (Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14, Tabelle 3).

Das Ziel kann als erreicht angesehen werden. Insbesondere aus Teilschritt 2 ergaben sich jedoch weitere Hypothesen, welche in 4.5. und 4.6. aufgegriffen werden.

Ad 3: Wie in 1.5 beschrieben und in 4.1. und 4.2.5. weiter diskutiert wird, liegt es nahe, dass eine Veränderung des Membranpotentials Konsequenzen auf weitere elektrophysiologische Parameter der Zelle hat, insbesondere auf den intrazellulären pH und das mitochondriale Membranpotential. Tabelle 5, Abbildung 15 und Abbildung 17 zeigen diesbezüglich die Messergebnisse. Es wurden mittels weiterer Farbstoffe der intrazelluläre pH sowie das mitochondriale Membranpotential gemessen. Ein Novum in Abgleich mit der bisherigen Literatur ist dabei, dass die Farbstoffe zur Messung des Membranpotentials und des pH-Wertes gleichzeitig eingesetzt wurden. Damit konnte gezeigt werden, dass das Membranpotential und der intrazelluläre pH-Wert nicht voneinander abhängen (Tabelle 4). In Abbildung 16 wird nun eine weitere Hypothese beantwortet: Der extrazelluläre pH-Wert beeinflusst das Ausmaß der Reaktion von neutrophilen Granulozyten auf C5a-Stimulation.
Das Ziel kann als erreicht angesehen werden.

Ad 4: Die neu etablierte Methode zur Messung von Änderungen des Membranpotentials neutrophiler Granulozyten wurde in einem translationalen porkinen hämorrhagischen Schockmodell angewandt. Dabei zeigte sich (Abbildung 18), dass die Zellen nach der Schockphase nahezu nicht mehr auf C5a reagieren.

Das Ziel kann als erreicht angesehen werden.

Die aus den Ergebnissen sich ableitenden Fragestellungen werden unter 4.6. dargestellt.

4. DISKUSSION

4.1. METHODENDISKUSSION

In dieser Arbeit wurden mittels des Fluoreszenzfarbstoffs $DiBAC_4(3)$ durchflusszytometrisch Veränderungen des Membranpotentials von neutrophilen Granulozyten messbar gemacht (siehe 3.1.). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Methode sowohl zum Darstellen einer Hyper- als auch einer Depolarisation geeignet ist und auch kleine Millivoltsprünge erfassen kann (Abbildung 5). Die Messschwierigkeit der großen Schwankungen in der absoluten Fluoreszenz (Abbildung 3, Abbildung 4) konnte durch das Erstellen von individuellen Eichkurven mit ausgewählten Kaliumkonzentrationen behoben werden, was durch die geringe Standardabweichung in Abbildung 5 gezeigt wird. Um das Membranpotential näherungsweise zu berechnen, mussten verschiedene Annahmen vorgenommen werden. Diese ergaben sich aus der GHK-Gleichung (siehe 2.8.): Intrazelluläre Konzentration sowie Leitfähigkeiten von Natrium und Kalium.

Intrazelluläre Natriumkonzentration zwischen 16 mM [7], 25 mM [82] bis 34 mM [3] sind beschrieben, wobei das Ergebnis stark abhängig von der Messmethode war. Unterschiede zwischen extra- und intrazellulären Ionen sind jedoch für das Membranpotential nur dann besonders relevant, wenn sie sich in logarithmischen Maßstäben unterscheiden (tatsächliche intrazelluläre Natriumkonzentration vs. 140 mM Natrium extrazellulär, wie hier verwendet). Diese Tatsache führt im Zusammenspiel mit der Dominanz der Kalium- gegenüber der Natriumleitfähigkeit dazu (siehe unten), dass der genaue intrazelluläre Natriumgehalt vernachlässigbare Auswirkungen auf das berechnete Membranpotential hat.

Die intrazelluläre Kaliumkonzentration ist in der Literatur zwischen 100 mM [4], 120 mM [82] und 137 mM [3] angegeben. Wie bei Natrium gilt auch für Kalium, dass durch den dekadischen Logarithmus in der GHK-Gleichung die genaue Zahl der intrazellulären Kaliumkonzentration nur begrenzte Auswirkungen auf das errechnete Membranpotential hat. Dies ergibt sich erneut aus der GHK-Gleichung [23] und kann im Detail unter [68] nachvollzogen werden. Für beide Ionen konnten insgesamt nur wenige und schon einige Zeit zurückliegende Quellen gefunden werden.

Eine hohe Bedeutung in der GHK-Gleichung kommt der Leitfähigkeit für die einzelnen Ionen zu. In der Literatur finden sich auch hier nur begrenzte Angaben, beispielsweise wurde das Leitfähigkeitenverhältnis von P_{Na} / P_K mit 0,10 beschrieben [82]. In dieser Arbeit wurden leicht veränderte Annahmen angewendet (siehe 2.8.), um eine Gleichheit zu den Publikationen herzustellen, welche für die Etablierung des verwendeten Farbstoffes an einer anderen Zellart verwendet wurde [40, 41]. Kleine Abweichungen der Leitfähigkeit würden jedoch auf das absolute Ruhemembranpotential relativ deutliche, aber auf die gemessenen Abweichungen des Membranpotentials nur relativ geringe Auswirkung haben: Wäre beispielsweise P_K 0,8 und P_{Na} 0,2 (statt wie in dieser Arbeit angenommen 0,95 bzw. 0,05), so wäre das kalkulierte Membranpotential für K4,5 -34,0 mV (statt -65,4 mV) bzw. für K15 -29,2 mV (statt -49,3 mV). Für die Abweichung des Membranpotentials beispielsweise für C5a 100 ng / ml nach 1 min ergäbe sich unter den veränderten Annahmen eine Abweichung von 3,0 mV (statt 4,2 mV).

Dass die getroffenen Annahmen und das errechnete Membranpotential mit -65,4 mV in etwa zutreffend sind, zeigen Literaturangaben, bei denen teilweise in neutrophilen Granulozyten zur Bestimmung eines Absolutwertes ein Ionophor herangezogen wurde (siehe unten).

Als Alternativen zu der in dieser Arbeit verwendeten Methode gibt es weitere Vorgehensweisen. Zum einen kann die „Patch-Clamp“-Technik verwendet werden, wobei sich dies bei neutrophilen Granulozyten als schwierig gestaltet und nur über Umwege funktioniert [9, 36]. Eine Studie mit dieser Methodik schätzt das Membranpotential ruhender neutrophiler Granulozyten zwischen -50 und -60 mV ein [47]. Des Weiteren können Zellen herangezogen werden, die den neutrophilen Granulozyten ähneln. In der Literatur finden sich beispielsweise die Verwendung von Eosinophilen [66, 67, 78], der granuloiden Zelllinie HL-60 [12, 27], Makrophagen [84] oder entnukleierten neutrophilen Granulozyten [28, 29]. Dieser Weg wurde meist gewählt, um die Elektrogenität der NADPH-Oxidase zu charakterisieren, wobei die offensichtliche Einschränkung, nicht native neutrophilen Granulozyten zu messen, dadurch nicht umgangen werden kann. Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Einsatz sogenannter Ionophore, welche beispielsweise den intra- und extrazellulären

Kaliumwert angleichen und somit durch das Anfertigen verschiedener Kaliumpuffer das Erstellen einer Eichgerade ermöglichen. Auch diese Möglichkeit ist in der Literatur beschrieben, teilweise in Kombination mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen. Hierbei wurden Werte für das Ruhemembranpotential von neutrophilen Granulozyten von -53 mV [81], -54 mV [80], -73 mV [55], -75 mV [5] gemessen. Bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 2,7 mM wurde sogar ein Wert bis zu -102 mV gemessen [37]. Insgesamt kann daher anhand der bisherigen Literatur bei physiologischen Kaliumkonzentrationen ein Ruhemembranpotential zwischen -55 mV und -75 mV als realistisch angenommen werden.

Besonders überzeugend dafür, dass die in dieser Arbeit getroffenen Annahmen gültig sind, ist das beschriebene Ruhemembranpotential von -59 mV bei 5 mM extrazellulärem Kalium, wobei hier die Zellen durch Zugabe des kaliumspezifischen Ionophors Valinomycin 1 µM um weitere 11 mV depolarisierten [82]. Dies legt nahe – wie in der vorliegenden Arbeit angenommen – dass das Membranpotential ruhender neutrophiler Granulozyten maßgeblich von der Kaliumleitfähigkeit abhängig ist. Weiterhin wurde ohne den Einsatz von Ionophoren gezeigt, dass die extrazelluläre Kaliumkonzentration maßgeblich das Membranpotential bestimmt [79].

Sowohl die Vor- als auch die Nachteile der hier verwendeten Methodik werden unter 4.3. und 4.4. weiter diskutiert.

4.2. ERGEBNISDISKUSSION

4.2.1. NEUTROPHILE GRANULOZYTEN VON GESUNDEN MENSCHLICHEN SPENDERN

Die Veränderungen des Membranpotentials neutrophiler Granulozyten unter C5a-Stimulation zeigte nach einminütiger Exposition eine Konzentrations-Wirkungs-Abhängigkeit (Abbildung 6) Betrachtet man die Reaktion der neutrophilen Granulozyten im weiteren Verlauf über 10 min, so nimmt unter C5a 100 und 1000 ng / ml die Veränderung des Membranpotentials ab, während unter C5a 10 ng / ml die

Depolarisation zunimmt und nach 10 min das Niveau der Abweichung von C5a 1000 ng / ml nach einminütiger Stimulation erreicht (Abbildung 7).

Zunächst sollen die verwendeten C5a-Konzentrationen diskutiert werden. Um diese in Kontext zu setzen, werden folgende Zahlen aus der Literatur angeführt (siehe auch 1.5. und [42, 59, 83, 83, 88]):

- physiologische Konzentration zwischen 0-20 ng / ml ≈ 0-1,82 nmol / l
- maximale C5a-Produktion durch höchste Komplementkaskadenaktivierung mittels Schlangengifts ergibt 3130 ng / ml ≈ 285 nmol / l
- EC_{50} C5a
    - C5aR1 von 10,9 ng / ml ≈ 1 nmol / l
    - C5aR2 von 76,9 ng / ml ≈ 7 nmol / l

Die C5a-Konzentrationen 100 bzw. 1000 ng / ml liegen also über der EC_{50} für C5aR1 und C5aR2, wohingegen bei 10 ng /ml vornehmlich C5aR1 stimuliert wird. Dies könnte ein Erklärungsansatz dafür sein, dass der zeitliche Verlauf der Depolarisation (Abbildung 7) von 10 ng / ml (spätes Maximum) sich anders darstellt als der von 100 und 1000 ng / ml (frühes Maximum). Dass C5a sich 10 ng / ml anders verhält als C5a 100 und 1000 ng / ml, wurde bereits für die Chemotaxis beschrieben [30] – möglicherweise spielen auch hier die Konzentration und / oder die konzentrationsabhängige Stimulation von C5aR1 und zusätzlich C5aR2 eine Rolle.

Insgesamt bewegt sich die Abweichung des Membranpotentials innerhalb weniger mV, was jedoch die Methode erfassen kann (weitere Diskussion hierzu unter 4.1., 4.3. und 4.4.). Allerdings ist es auch möglich, dass sehr frühe, starke Depolarisationen nicht erfasst wurden, wenn sie vor einminütiger Stimulation stattgefunden haben – dies trifft besonders auf C5a 100 und 1000 ng / ml zu. Letztlich kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass das Isolieren an sich oder die Durchflusszytometrie als Messmethode die Zellen voraktiviert, so dass die gemessene Veränderung des Membranpotentials kleiner ausfällt als sie tatsächlich ist. Die Methode kann prinzipiell stärkere Abweichungen des Membranpotentials erfassen als die von C5a hervorgerufenen, was mittels fMLP-Stimulation nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 8 und 4.2.2.).

Werden neutrophile Granulozyten mit K15 vorbehandelt, so reagierten sie nahezu nicht mehr auf C5a (Abbildung 8). K15 verursacht eine quantitativ bedeutsamere

Depolarisation als C5a 1000 ng / ml. Dies legt die Hypothese nahe, dass eine einmalig starke Stimulation die Zellen nicht mehr antworten lässt. Ob dies vermittelt wird durch gleichzeitige Stimulation von C5aR1 und C5aR2, oder durch eine Verschiebung des Membranpotentials (egal ob durch C5a oder andere Stimulantien verursacht), oder durch eine Kombination des Genannten, muss weiter untersucht werden (siehe 4.6.).

Um zu untersuchen, ob die verminderte Reaktion von neutrophilen Granulozyten bei schwerer Entzündung daher rührt, dass vorhergehende Stimulation und Depolarisation die Expression von C5aR1 herunterreguliert, wurde mittels eines CD88-Antikörpers die Expression nach zehnminütiger Stimulation gemessen. Hierbei zeigte sich keine Abnahme der C5aR1-Expression (Tabelle 6). Um zu analysieren, ob innerhalb der Neutrophilenpopulation Untergruppen existieren, wurden neben der in 4.2.3. beschriebenen Analyse die Zellen nach einer relativ hohen FSC- bzw. SSC-Zahl charakterisiert. Bezogen auf C5aR1 zeigte sich hierbei, dass zwischen Zellen mit hohem und niedrigem SSC-Wert (als Näherungsmaß für die Granularität, gegebenenfalls auch Alter der Zelle) keine Unterschiede bestehen. Bei FSC (als Näherungsmaß für die Zellgröße) bestand, wie zu erwarten, ein Unterschied: Größere Zellen exprimieren mehr C5aR1 als kleinere. Ob dies Auswirkungen auf das Membranpotential hat, wird in 4.2.3. besprochen.

Um den verantwortlichen Ionenstrom zu identifizieren, der die C5a-induzierte Depolarisation verursacht, wurden einzelne Ionen aus den Puffern äquimolar ausgetauscht (Tabelle 3). Dabei zeigte sich, dass egal, welches Ion man ersetzt, C5a eine Depolarisation hervorruft. Diese Daten sind nicht einfach zu interpretieren, allerdings unterstützen sie zwei Hypothesen: Erstens ist es wahrscheinlich, dass eine Veränderung des Membranpotentials durch eine Änderung der Kaliumleitfähigkeit hervorgerufen wird. Das ergibt sich aus der Nernst-Gleichung für Kalium bzw. der GHK-Gleichung (siehe 1.6.), da es in der logarithmischen Beziehung von extra- zu intrazellulärem Kalium nur eine kleine Rolle spielt, ob das extrazelluläre Kalium Null oder 4,5 beträgt (versus intrazelluläres Kalium von circa 140 mM).

Alternativ könnte eine massive Aktivierung der NADPH-Oxidase, die für C5a in anderem Zusammenhang für neutrophile Granulozyten gezeigt wurde [31], zumindest

für den initialen Anstieg der Depolarisation verantwortlich sein, welcher durch die Ionenaustauschexperimente nicht erfasst wurde.

Eine der Hypothesen oder auch beide könnten zutreffend sein (siehe auch 4.6.).

4.2.2. C3A, LPS UND FMLP

In dieser Arbeit ging es vorrangig um das Komplementspaltprodukt C5a. Um die Auswirkung von C5a auf das Membranpotential neutrophiler Granulozyten zu vergleichen, wurden neutrophile Granulozyten sowohl mit dem Anaphylatoxin C3a und C5a als auch mit den PAMPs LPS und fMLP stimuliert. Im weiteren Sinne könnte C5a auch als DAMP bezeichnet werden, da sein Erscheinen auch eine weitere Gefahrenantwort auslöst.

C3a ist wie C5a ein Spaltprodukt des Komplementsystems, welches sowohl im klassischen als auch im alternativen Signalweg generiert wird. Die Rolle von C3a im Zusammenspiel mit neutrophilen Granulozyten ist nicht abschließend geklärt: An seiner Wirkung sind ähnliche Signalwege wie bei C5a beteiligt (ERK1/2); darüber hinaus ist für die Wirkung von C3a auch der Rezeptor C5aR2 relevant [8]. Bei akuter Entzündung – im Gegensatz zur chronischen Entzündung – mehren sich die Hinweise, dass C3a jedoch nur bedingt als proinflammatorisch gesehen werden kann, da es beispielsweise die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten hemmen kann [8]. Bezogen auf das Membranpotential zeigt sich unter C3a-Stimulation in hohen Konzentrationen (Abbildung 8), dass keine vergleichbare Reaktion auf das Membranpotential wie durch C5a hervorgerufen wird. Ob dies an dem Rezeptorverhalten von C3aR liegt oder an der Kostimulation von C5Ra2, muss weiter untersucht werden.

Das PAMP fMLP spielt wie C5a eine große Rolle im Entzündungsgeschehen, beispielsweise auch in der Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten [30]. Für fMLP wurden bereits Verschiebungen des Membranpotentials von neutrophilen Granulozyten beschrieben, wobei hier meist eine Depolarisation gezeigt wurde [5, 39, 48, 50, 55, 79, 80]. Aber auch Hyperpolarisation [75] bei neutrophilen

Granulozyten von Erwachsenen und keine Reaktion bei neutrophilen Granulozyten von Neonaten wurden postuliert, wobei neutrophile Granulozyten unter ständigem Umrühren gemessen wurden. Unter Einsatz von fMLP in Konzentration von 10 µM (Konzentration, bei der ein maximaler Effekt auf die Chemotaxis beschrieben wurde [30]), fand sich eine Änderung des Membranpotentials, welche die von C5a quantitativ nach einminütiger Stimulation deutlich überstieg (Abbildung 8). Somit konnte gezeigt werden, dass es neben C5a Substanzen gibt, die neutrophile Granulozyten stärker stimulieren. Diese könnten zur Neutrophilendysfunktion (siehe 1.5.) bei ausgeprägter Inflammation beitragen, möglicherweise durch eine kumulative Veränderung des Membranpotentials. Eine Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit komplexeren Gemischen an DAMPs und PAMPs und weiteren Entzündungsmediatoren wäre ein logischer nächster Schritt zur Evaluierung der Auswirkungen auf das Membranpotential der neutrophilen Granulozyten.

LPS ist ebenso ein PAMP, welches auf gramnegativen Bakterien vorkommt und in schweren Entzündungsreaktionen vermehrt freigesetzt wird. LPS wird dabei durch Toll-Like-Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten erkannt und führt zu einer nachfolgenden Aktivierung mit Produktion von Interleukin 6 und Interleukin 8 [25, 72], wobei sich diese Effekte erst nach Stunden zeigen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass LPS im Gegensatz zu fMLP keine Veränderung des Membranpotentials hervorruft (Abbildung 8), besonders nicht in einem zeitlich vergleichbar frühen Kontext.

Insgesamt konnte im Vergleich der Substanzen gezeigt werden, dass es sowohl Vertreter von DAMPs bzw. PAMPs gibt, welche die Zelle depolarisieren (C5a, fMLP), als auch solche, die keine Auswirkung auf das Membranpotential haben (C3a, LPS). Da Veränderungen im Membranpotential meist einen sehr frühen Reaktionsschritt innerhalb einer Kettenreaktion auf einen Stimulus darstellen, kann hypothetisiert werden, dass depolarisierende Stimulantien besonders relevant sind bei der Dysfunktion neutrophiler Granulozyten während einer ausgeprägten Entzündung.

4.2.3. ZELLGRÖßE UND ZELLGRANULARITÄT

C5a aktiviert neutrophile Granulozyten und führt dabei unter anderem zu Formänderungen [16]. In dieser Arbeit wurden daher die jeweils größten und kleinsten 25% Zellen (gemäß FSC-A, siehe 2.7.) und die jeweils am stärksten und am schwächsten granulierten 25% Zellen (gemäß SSC-A, siehe 2.7.) näher beschrieben. Genauer ging es um drei Fragestellungen: Hat die Veränderung der Zellgröße oder Granularität eine Auswirkung auf den Farbstoff? Gibt es innerhalb der neutrophilen Granulozyten Untergruppen, definiert über FSC oder SSC, welche abweichend reagieren? Reagiert die Population der neutrophilen Granulozyten einheitlich, oder kommt die Abweichung des Membranpotentials durch eine starke Fluoreszenzschwankung einiger weniger Zellen zustande?

Abbildung 9 zeigt die Gesamtheit der neutrophilen Granulozyten exemplarisch an einem Spender. Dabei sieht man, dass die Fluoreszenzverteilung eingipflig ist, sowohl unter Kontrollbedingungen als auch in durch K15 depolarisierten Zellen und durch C5a stimulierten neutrophilen Granulozyten. Dies legt nahe, dass die C5a-induzierte Depolarisierung bei nahezu allen Zellen in vergleichbarem Maße stattfindet – eine Alternativhypothese, dass einige wenige Zellen (z.B. besonders alte oder junge neutrophile Granulozyten) extrem reagieren, ist damit unwahrscheinlich. Dies ist jedoch insofern relevant, als dass bei ausgeprägter Inflammation junge, teils naive Neutrophile, teils Vorstufen im Sinne der Linksverschiebung freigesetzt werden – möglicherweise reagieren diese anders. Zumindest beim gesunden Spender fanden sich hierfür keine Hinweise.

In Abbildung 10 ist die Auswirkung einer C5a-Stimulation exemplarisch dargestellt. Zum Maximum der Depolarisation (für C5a 100 ng / ml nach 1 min) fand sich für den SSC-Wert eine Abnahme von circa 7% (Abbildung 11), für den FSC-Wert eine Zunahme von rund 40 % (Abbildung 13). Damit zeigt sich, dass die Zellen nach C5a-Stimulation ihre Form rasch und deutlich und teilweise ihre Granularität ändern. Eine C5a-induzierte FSC-Zunahme wurde durch Denk et al. [16] kürzlich gezeigt, nicht im Sinne einer ausgeprägten absoluten Volumenzunahme, sondern eher im Sinne einer Streckung entlang der Längsachse der neutrophilen Granulozyten.

Diese Änderungen haben wahrscheinlich keine Auswirkungen auf das Messergebnis: Wie in Abbildung 12 gezeigt, reicherte sich der Farbstoff unter Kontrollbedingungen, bei Inkubation in K15 und unter C5a-Stimulation eher in Zellen hoher Granularität an. Da neutrophile Granulozyten unter C5a-Stimulation als Gesamtpopulation einen niedrigeren SSC-Wert als unter Kontrollbedingungen aufwiesen, führte dieser Effekt – falls überhaupt relevant – zu einer kleinen Unterschätzung der Auswirkung von C5a auf das Membranpotential. Möglicherweise repräsentieren neutrophile Granulozyten mit unterschiedlichen SSC-Werten Zellen unterschiedlichen Alters oder unterschiedlicher Voraktivierung.

Für den FSC-Wert als Näherungsmaß für die Zellgröße bzw. Zellform (genauere Beschreibung in [16]) gab es unter Kontrollbedingungen und im K15-Puffer keine Unterschiede zwischen besonders großen und kleinen Zellen (Abbildung 14). Allerdings fand sich ein kleiner, aber signifikanter Unterschied bei C5a-Stimulation, welcher möglicherweise durch das vermehrte Vorhandensein von C5aR1 auf Zellen mit hohem FSC-Wert erklärt werden kann (siehe auch Tabelle 6).

Vergleicht man K15 versus Kontrollzellen, so zeigte sich in beiden Fällen eine kleine Zunahme des SSC- und FSC-Wertes (für FSC signifikant, siehe Abbildung 11 und Abbildung 13). Ob diese Veränderungen relevant sind, ist schwierig zu bewerten – jedenfalls stehen sie für FSC deutlich der quantitativen Veränderungen verglichen mit C5a hinterher (circa 5 vs. 40%). Es ist daher zu vermuten, dass die K15-induzierte Depolarisation per se nicht wesentlich zu einer Längsstreckung der neutrophilen Granulozyten führt.

Obwohl das Konzept der Untergruppen innerhalb der neutrophilen Granulozyten in der Literatur mehr und mehr diskutiert wird [22], konnten mittels Differenzierung über FSC und SSC sowie $DiBAC_4(3)$-assoziierter Fluoreszenz keine verschiedenen Untergruppen innerhalb der neutrophilen Granulozyten definiert werden. Entweder hat diese Heterogenität keine Relevanz für die Reaktion des Membranpotentials auf C5a, oder sie konnte mit den Methoden nicht erfasst werden und benötigt detailliertere Untersuchungen.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass C5a die Zellform und Granularität der neutrophilen Granulozyten beeinflusst, dies jedoch wahrscheinlich keine Auswirkung

auf die hier durchgeführte Messmethodik hat. Ebenso gab es hinsichtlich der Membranpotentialveränderungen auf C5a-Stimulation keine Hinweise auf Bildung von funktionellen Untergruppen in der Population der neutrophilen Granulozyten.

4.2.4. MITOCHONDRIALES MEMBRANPOTENTIAL

Mitochondrien als Zellorganellen spielen eine Rolle bei der Bereitstellung von Energie in Form von ATP sowie bei dem programmierten Zelltod, der Apoptose. Neutrophile Granulozyten nutzen Mitochondrien nicht primär zu Energiegewinnung, sondern zur Regulierung der Apoptose [53] und generieren den Großteil ihres ATPs über anaerobe Glykolyse [45]. Darüber hinaus sind Mitochondrien jedoch beschrieben als Quelle für ATP zur autokrinen Aktivierung von neutrophilen Granulozyten [2] als auch für sogenannte „neutrophil extracellular traps“ (etwa: Extrazelluläre Fallen von neutrophilen Granulozyten), welche aus mitochondrialer DNA geformt werden [56, 92]. Daher liegt es nahe zu spekulieren, dass eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten mittels C5a das mitochondriale Membranpotential beeinflusst. Um dies zu beantworten sowie um zu untersuchen, ob zelluläres und mitochondriales Membranpotential sich gegenseitig beeinflussen, wurde zusätzlich in dieser Arbeit das mitochondriale Membranpotential gemessen.

Zunächst konnte übereinstimmend mit der Literatur [53] gezeigt werden, dass unstimulierte neutrophile Granulozyten ein mitochondriales Membranpotential aufrecht erhalten, welches entkoppelt werden kann (Abbildung 17) – obwohl neutrophile Granulozyten das mitochondriale Membranpotential nahezu nicht für die Atmungskette zur ATP-Generierung verwenden. Für C3a und C5a wurde eine zehnminütige Beobachtungsperiode gewählt, da sich hier für C5a das zelluläre Membranpotential ändert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass sich das mitochondriale Membranpotential auf C3a- oder C5a-Stimulation in dieser frühen Zeitperiode nicht ändert.

Somit konnte ausgeschlossen werden, dass sich das Membranpotential der Zelle aufgrund einer starken Änderung im mitochondrialen Membranpotential verschiebt. Gleichzeitig stellt sich die Frage, warum die Stimulation mit Komplementfaktoren

keine Änderung des mitochondrialen Membranpotentials hervorruft. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet. Ein alternativer Erklärungsansatz könnte darin liegen, dass C5a das mitochondriale Membranpotential eher stabilisiert, da C5a teils anti-apoptotische Eigenschaften aufweist [64].

4.2.5. INTRAZELLULÄRER UND EXTRAZELLULÄRER PH-WERT

C5a verändert den intrazellulären pH-Wert von neutrophilen Granulozyten, gleichzeitig herrscht in inflammatorischem Makro- und Mikro-Milieu oft eine extrazelluläre Azidose [1, 15, 49]. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Veränderung des intra- bzw. extrazellulären pH-Wertes Auswirkungen auf das Membranpotential hat.

Zunächst soll die Hypothese diskutiert werden, dass das Membranpotential und der intrazelluläre pH-Wert zusammenhängen. Diese Hypothese ergibt sich aus der Literatur (Übersichtsarbeit in [6]) und folgenden Rechenbeispielen:

Allgemein:

$$pH = -\log_{10} [H^+] \text{ bzw. } [H^+] = 10^{-pH}$$

$$-61 \times \log_{10} ([H]_i / [H]_e) = -61 \times (pH_e - pH_i)$$

Wenn der extrazelluläre pH-Wert (pH_e) 7,4 und der intrazelluläre pH-Wert (pH_i) 7,2 beträgt, so ergibt sich folgende Nernst-Gleichung für das elektrochemische Gleichgewichtspotential für Protonen:

$$-61 \text{ mV} \times (7{,}4 - 7{,}2) \approx -12 \text{ mV}$$

Im nächsten Schritt gilt es, das deutlich negativere Membranpotential der neutrophilen Granulozyten zu betrachten. Somit ergibt sich eine protonentreibende Kraft, welche mit dem Ruhemembranpotential der neutrophilen Granulozyten interagiert, was folgende Überlegungen zeigen (weiterhin für $pH_e = 7{,}4$ und $pH_i = 7{,}2$):

Für K4,5: -65 mV - (- 12 mV) = -53 mV

Für K15: -47 mV - (- 12 mV) = -35 mV

Berücksichtigt man nun, dass unter C5a-Stimulation neutrophile Granulozyten transient bis zu einem pH-Wert von 7,5 alkalinisieren [15], so gilt analog für pH_e = 7,4 und pH_i = 7,5:

- 61 mV x (7,4 - 7,5) ≈ + 6 mV

Für K4,5: -65 mV - (+ 6 mV) = -71 mV

Für K15: -47 mV - (+ 6 mV) = -53 mV

Wie dargestellt, wird die protonentreibende Kraft geringer, je stärker die Zellen depolarisieren und / oder intrazellulär azidifizieren. Umgekehrt wird sie größer bei Hyperpolarisation oder intrazellulärer Alkalinisierung. Daher wurde in dieser Arbeit die Hypothese untersucht, dass eine Depolarisierung mit einer Verschiebung des pH-Wertes einhergeht, gemäß obigen Überlegungen in Richtung einer Alkalinisierung. Abbildung 15 und Tabelle 5 zeigen zunächst, dass der intrazelluläre pH-Wert sich dem extrazellulären pH-Wert annähert. Dies könnte einen Erklärungsansatz dafür bieten, dass eine extrazelluläre pH-Wert-Verschiebung über die Beeinflussung des intrazellulären pH-Wertes die Aktivität von neutrophilen Granulozyten mindert [1].

Als nächstes wurde untersucht, ob das Membranpotential den intrazellulären pH-Wert beeinflusst. Hierfür wurden zunächst Untergruppen (siehe Tabelle 4) innerhalb der neutrophilen Granulozyten gebildet, welche jeweils gemäß dem Farbstoff für das Membranpotential am stärksten innerhalb der Gesamtpopulation depolarisierten bzw. hyperpolarisierten (jeweils 25% innerhalb der Gesamtpopulation). Des Weiteren wurden unstimulierte neutrophile Granulozyten mit K15 depolarisiert und anschließend die Veränderung des intrazellulären pH-Wertes gemessen (siehe Tabelle 5). In beiden Experimenten zeigte sich eine trendweise Bestätigung der Hypothese (Depolarisierung führt zur Alkalinisierung), deren Umfang jedoch quantitativ gering und insgesamt nicht signifikant ausfiel. Allerdings ist zu beachten, dass bereits kleine

pH-Wert-Veränderungen auf bedeutsame Verschiebungen in der Protonenkonzentration hindeuten, da gilt:

$$pH = -\log_{10}(H^+) \text{ bzw. } [H^+] = 10^{-pH}$$

Folgendes Rechenbeispiel verdeutlicht die quantitative Verschiebung von Protonen bei nur geringen Schwankungen des pH-Wertes (entnommen aus Tabelle 5 für pH_e 7,4):

K4,5: pH_i = 7,51; $[H^+]$ = 30,90 nM
K15: pH_i = 7,58; $[H^+]$ = 26,30 nM;
15,3% weniger Protonen als in K4,5

Bei diesen kleinen Schwankungen des pH-Wertes ist kritisch zu hinterfragen, ob die gezeigten Abweichungen durch die Messmethode zuverlässig erfasst werden können, was hier nicht überprüft werden konnte. Da sich der Trend jedoch in allen Messungen zeigte, erscheint es wahrscheinlich, dass es eine leichte Alkalinisierung gab. Neutrophile Granulozyten alkalinisieren zeitweise unter C5a-Stimulation [15], wobei ein kleiner Anteil wahrscheinlich auf die Depolarisierung zurückzuführen ist und ein größerer Teil auf spezielle Ionentransporter, wie beispielsweise den Na^+/H^+-Austauscher [16]. Alternativ könnte die Alkalinisierung durch einen starken Anstieg der Laktatgenerierung erklärt werden, welches im Symport mit einem Proton die Zelle verlässt [6].

Neben dem intrazellulären pH-Wert wurde auch der extrazelluläre pH-Wert untersucht. Hierbei wurde der extrazelluläre pH-Wert schrittweise verändert und gemessen, ob bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten sich die Antwort des Membranpotentials auf C5a ändert. Neutrophile Granulozyten zeigen im sauren Milieu eine geringere Aktivität hinsichtlich Chemotaxis, Abtötungsvermögen von Pathogenen und insgesamt eine Abnahme des Sauerstoffverbrauches von 80-90% [49]. Wie in Abbildung 16 darstellt, ist die initiale Depolarisierung in saurem Milieu jedoch erhöht.

Über die Ursachen und Auswirkungen lässt sich spekulieren: Möglicherweise signalisiert eine saure Umgebung den Immunzellen eine besondere Gefahrensituation.

Andererseits könnte eine Überaktivierung im Sinne einer starken Depolarisierung des Membranpotentials zu einer Erschöpfung oder Desensitisierung mit reduzierter Aktivität von neutrophilen Granulozyten im entzündlichen Milieu führen.

4.2.6. PORKINER HÄMORRHAGISCHER SCHOCK

Nach Etablierung der Methode und Charakterisierung der Veränderungen des Membranpotentials unter C5a-Stimulation wurde untersucht, ob eine starke systemische Entzündung [65] eine Auswirkung auf die Antwort des Membranpotentials der neutrophilen Granulozyten hat. Abbildung 18 zeigt wie erwartet, dass vor der dreistündigen Schockphase eine signifikante Depolarisation unter C5a-Stimulation stattfindet. Diese fiel quantitativ deutlich stärker aus als im Blut von gesunden Menschen. Hierfür gibt es verschiedene Gründe: Zum einen wurde weiterhin menschliches C5a eingesetzt, da dies standardisiert rekombinant kommerziell erhältlich war. Zum anderen könnte die Instrumentierung bereits eine gewisse Inflammation und somit Voraktivierung, ein sogenanntes „Priming“, der neutrophilen Granulozyten verursacht haben.

Bemerkenswerterweise verschwand am Ende der dreistündigen Schockphase diese Reaktion auf C5a-Stimulation weitgehend, wobei gemäß BGA weder eine zum Messzeitpunkt vorherrschende starke Ansäuerung noch eine Verschiebung der extrazellulären Ionen gemessen wurde (siehe Tabelle 7). Dies zeigt, dass unter ausgeprägter, systemischer Entzündungsreaktion die Antwort des Membranpotentials auf Komplementstimulation sich verändert, was möglicherweise die Neutrophilendysfunktion bis hin zur beschriebenen Neutrophilenparalyse in diesen Szenarien erklärt. Es ist zu spekulieren, ob dieser Mechanismus daher rührt, dass das absolute Ruhemembranpotential der Zelle sich verändert hat. Alternativ wäre denkbar, dass die neutrophilen Granulozyten nach einer Zeit der Überstimulation (welche hier nicht gemessen wurde und an der Auswahl der Messzeitpunkte liegen könnte) anerg werden.

Der relativ niedrige Hämatokrit, besonders vor der Schockphase, erklärte sich durch die komplexen Instrumentierungsmethoden und das periinterventionelle Flüssigkeitsregime [65].

4.3. STÄRKEN DER ARBEIT

In dieser Arbeit wurde eine valide und zuverlässige Methode entwickelt zum Messen kleiner Membranpotentialunterschiede bei neutrophilen Granulozyten. Diese Zellen sind elektrophysiologischen Messungen nur schwer zugänglich, besitzen allerdings eine hohe Relevanz für das menschliche Immunsystem (siehe 1.1., 1.7.).

Durch die Technik der Durchflusszytometrie konnten dabei in kurzer Zeit eine hohe Zahl an Zellen gemessen werden (Tausende in Sekunden), was bei der sonst üblichen „Patch-Clamp"-Technik nicht möglich ist (maximal 1 Zelle in 5 bis 10 min). Weiterhin, bedingt durch die Technik, wurden Zellen gemessen, welche nicht durch ein Ionophor, durch das Beschädigen der Zellmembran oder durch den Austausch des intrazellulären Ionenmillieus in ihrer Homöostase gestört wurden. Darüber hinaus wurden die neutrophilen Granulozyten in Lösung und nicht adhärent gemessen, was den Verhältnissen im menschlichen Blut näherkommt. Bezüglich des verwendeten Farbstoffes wurde in der Arbeit gezeigt, dass Zelleigenschaften (Größe, Granularität, intrazellulärer pH-Wert) keinen Einfluss auf die Messergebnisse haben.

Die Hauptaussage der Arbeit, dass C5a eine Depolarisation von neutrophilen Granulozyten hervorruft, wurde an insgesamt 45 Messungen (C5a 100 ng / ml nach einminütiger Stimulation) bestätigt. Schließlich wurde die Methodik erfolgreich auf ein translationales Modell des porkinen hämorrhagischen Schocks übertragen. Dabei konnte gezeigt werden, dass mutmaßlich der starke Entzündungsreiz relevante Änderungen der Antwort des Membranpotentials von neutrophilen Granulozyten unter Komplementstimulation nach sich zieht. Dies legt den Grundstein zu weiteren Untersuchungen, welche langfristig Methodik und Fragestellung von der Laborbank hin zum Patientenbett transferieren könnte. Des Weiteren könnte die etablierte Methode grundlegende Erklärungsmechanismen der frühen (Immun-) Zelldysfunktion

bei schwerem Trauma, hämorrhagischen Schock, fataler Sepsis, Multiorganversagen und anderen Erkrankungen leisten.

Darüber hinaus ist diese farbstoffbasierte Methode mit den oben genannten Vorteilen zwanglos auf andere Zellen übertragbar, wie in Ansätzen für Makrophagen gezeigt werden konnte.

4.4. LIMITATIONEN DER ARBEIT

Zunächst ist die begrenzte zeitliche Auflösung zu nennen, besonders im Vergleich zur „Patch-Clamp"-Technik. Dies könnte dazu führen, dass schnelle Änderungen (0-59 s) und Änderungen jenseits von 10 min nach Stimulation nicht erfasst wurden.

Des Weiteren mussten zur Errechnung des Membranpotentials verschiedene Annahmen getroffen werden. Diese konnten zwar gut begründet werden, decken sich mit der Literatur und haben nur geringe Auswirkungen auf die gemessenen Änderungen des tatsächlichen Membranpotentials, konnten jedoch nicht mit letzter Sicherheit belegt werden. In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass die Temperatur der Zellen während der Inkubation zwar mittels Wasserbades kontrolliert wurde, jedoch während der Messung im Durchflusszytometer eine unbekannte Temperaturänderung zwischen Wasserbad (37°C) und Raumluft (ca. 20°C) stattgefunden hat, welche nicht bestimmt werden konnte und möglicherweise das Ergebnis beeinflusste. Allerdings gilt dies auch für die Kontrollzellen und die Eichkurven, so dass das Endergebnis wahrscheinlich nur bedingt beeinflusst wurde.

Abschließend muss die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen diskutiert und kritisch mit den Variablen des Blutes verglichen werden. Die meisten Ionen, der Glukosegehalt, der pH-Wert und die Osmolarität konnten den physiologischen Bedingungen des Blutes angeglichen werden. Aus Gründen der schwierigen Zubereitung und aufwendigen Kontrolle enthielten die in dieser Arbeit verwendeten Zelllösungen kein Bikarbonat. Wie in vielen anderen Messungen (u.a. bei denen zitiert in 4.1.) wurde hier das Anion Bikarbonat durch Chlorid ersetzt. Dieser Kompromiss wurde getroffen, da Bikarbonat in einem offenen System nicht stabil ist, wobei in dieser

Arbeit eine präzise Kontrolle des pH-Wertes und der Osmolarität dem Angleichen von Bikarbonat- und dem Chloridgehalt vorgezogen wurde.

4.5. RELEVANZ DER ERGEBNISSE

Wie eingangs dargestellt (siehe 1.1.), benötigt der menschliche Körper für die Abwehr von Pathogenen bei schwerer Entzündung als erste „Verteidigungslinie“ die neutrophilen Granulozyten. Diese ausgeprägte Inflammation spielt eine bedeutende Rolle bei verschiedenen Krankheitsbildern (Sepsis, Polytrauma, hämorrhagischer Schock usw.), wobei eine Dysfunktion verschiedener Komponenten der Immunantwort an der Entstehung eines Multiorganversagens mitbeteiligt ist, was wiederum die Überlebensaussichten deutlich senkt.

In dieser Arbeit wurde erfolgreich dargestellt, dass eine frühe Veränderung des Membranpotentials für das „Alarmsignal“ C5a eine Rolle bei gesunden Individuen spielt, jedoch nicht für C3a oder LPS.

Die Veränderung des Membranpotentials steht dabei in Zusammenhang mit den in Tabelle 1 dargestellten Antworten von neutrophilen Granulozyten auf C5a-Stimulation. Ob in der Gesamtheit Depolarisierung, Kalziumeinstrom, Alkalinisierung, Laktatproduktion und NADPH-Oxidase-Aktivität sich jeweils gegenseitig nacheinander auslösen, eine definierte Reihenfolge besteht oder sie (zumindest teilweise) Folgen von sonstigen C5aR1/2-vermittelten Reaktionen sind, muss weiter untersucht werden. Es ist beispielsweise denkbar, dass C5a eine initiale Depolarisation verursacht, beispielsweise über NADPH-Oxidase-Aktivität, welche einen Kalziumeinstrom verursacht (oder dieser parallel über Phospholipide-C-Aktivität mitverursacht wird), welcher dann wiederum die intrazelluläre Alkalinisierung, die Laktatproduktion und die weiteren Antworten des C5a-Signalweges verursacht.

Diese Arbeit fügt den dargestellten elektrophysiologischen Veränderungen der neutrophilen Granulozyten schwerpunktmäßig neue Aussagen zum Membranpotential hinzu unter physiologischen Bedingungen am menschlichen Spender und unter pathophysiologischen Bedingungen im porkinen hämorrhagischen Schock. Dies vervollständigt nicht nur das Bild der physiologischen C5a-Antwort von

neutrophilen Granulozyten, sondern bietet auch Ausgangspunkte für das Entwickeln von therapeutischen Strategien, welche am Membranpotential von neutrophilen Granulozyten ansetzen.

4.6. AUSBLICK

Diese Arbeit beantwortet einige Fragen, wirft jedoch gleichzeitig viele neue auf. Abgeleitet aus den Ergebnissen sind die folgenden weitergehenden Untersuchungen denkbar:

Bezogen auf die Methodik

- Einsatz eines weiteren Fluoreszenzfarbstoffes zur Verifizierung der Ergebnisse
- Einsatz eines Ionophors (z.B. Valinomycin) zur Erstellung einer Eichkurve mit absoluten Messpunkten
- Einsatz der Patch-Clamp-Methode, gegebenenfalls unter Lähmung von Teilen des Zytoskelettes

Bezogen auf die Ergebnisse:

- Identifizierung der verantwortlichen Ionenströme, beispielsweise durch Hemmung der NADPH-Oxidase [28, 57]
- Gezielte Depolarisation um 4-5 mV (dem Maximum einer einminütigen Stimulation von C5a 100 ng / ml) mittels Kalium mit Kontrolle, ob dies den intrazellulären Metabolismus verändert und langfristig (im Sinne von Stunden) die C5aR1/2-Expression verändert
- Entwicklung eines Vollblutmodells, bei dem die verschiedenen Blutzellen gemeinsam gemessen werden
- Weitergehende Untersuchung der Hypothese, dass C3a antiinflammatorisch wirkt, z.B. via C5aR2-Stimlation
- Kombination von PAMPs und DAMPs
- Feingliedrige Untersuchung der PMN-Population hinsichtlich Heterogenität [22] mit besonderem Augenmerk auf die Untergruppen, welche bei starker Entzündung vorherrschen (z.B. junge, naive neutrophile Granulozyten) oder

den jüngst in den Focus gerückten „neutrophilen Granulozyten geringer Dichte“ [77]

Bezogen auf die klinische Relevanz:

- Blockade von C5aR1 und / oder C5aR2 bzw. singuläre Stimulierung von C5aR1 und / oder C5aR2
- Entwicklung eines „Double-Hit-Modells“, bei dem beispielsweise ein initiales Polytrauma mit erneutem Gewebetrauma (z.B. durch eine Operation) simuliert wird – dies könnte z.B. durch zwei zeitlich hintereinanderliegende Stimulationen mittels C5a erfolgen oder einer Kombination von fMLP und C5a
- Übertragung auf andere Zellen, welche ebenso anerg bzw. paralysiert sind bei gleichzeitiger morphologischer Intaktheit
- Messung des absoluten Membranpotentials von neutrophilen Granulozyten sowie dessen Veränderung bei Multiorganversagen und Polytrauma

Übergeordnetes, langfristiges Ziel ist eine pharmakologische Modulierung der Immunzellen, so dass mögliche Veränderungen im Membranpotential nicht deren Dysfunktion bewirken oder verschlimmern.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Immunsystem schützt den Körper, wobei eine genaue Äquilibrierung der beteiligten Mediatoren, Zellen und Organsysteme unabdingbar ist. Beim angeborenen Immunsystem kommt der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch Warnsignale wie dem Komplementaktivierungsprodukt C5a eine besondere Bedeutung zu. Im Falle einer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion des Körpers wie beispielsweise im Rahmen von Sepsis oder hämorrhagischem Schock führt eine Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden zu einer Lähmung der neutrophilen Granulozyten. Vorbeschrieben sind hierbei Kalziumeinstrom, eine transiente Alkalinisierung und eine Formveränderung.

Hiervon leitete sich die Hypothese ab, dass C5a auch das zelluläre Membranpotential von neutrophilen Granulozyten verändert.

Um diese elektrophysiologischen Änderungen zu messen, wurde in dieser Arbeit eine durchflusszytometrische Methode an neutrophilen Granulozyten etabliert sowie validiert, da sonst gängige Messmethoden wie die „Patch-Clamp“-Technik an diesen Zellen nicht oder nur mit Limitationen anwendbar sind. Darüber hinaus wurden weitere elektrophysiologische Zellparameter wie der intrazelluläre pH-Wert und das mitochondriale Membranpotential untersucht. Für das Untersuchen der Abhängigkeit vom intrazellulären pH wurde eigens eine Doppelfärbung mit den Farbstoffen $DiBAC_4(3)$ bzw. SNARF entwickelt. Für die so entwickelte Methode zur Messung des Membranpotentials wurden Zellen freiwilliger, gesunder, menschlicher Probanden sowie Zellen entnommen aus einem Modell porkinen hämorrhagischen Schocks.

Als Ergebnis zeigte sich, dass neutrophile Granulozyten bei gesunden Spendern mit einer Depolarisation von rund 5 mV auf eine Stimulation durch C5a 100 ng / ml nach einer Minute reagierten, wobei diese Depolarisation nach zehn Minuten stark rückläufig war. Das mitochondriale Membranpotential veränderte sich durch C5a nicht. Die Depolarisation lässt sich dabei durch den Austausch extrazellulärer Ionen nicht verändern, jedoch nimmt sie zu mit sinkendem extrazellulärem pH-Wert.

Im hämorrhagischen Schock an Schweinen konnte die C5a-induzierte Depolarisation bei gesunden Schweinen nachvollzogen werden, jedoch nicht mehr nach der dreistündigen Schockphase. Hier waren die neutrophilen Granulozyten auf C5a elektrophysiologisch nahezu reaktionslos.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass C5a eine Veränderung des Membranpotentials im Sinne einer Depolarisation bewirkt, diese jedoch unter ausgeprägter systemischer Aktivierung des Immunsystems aufgehoben ist. Zukünftig bleibt zu klären, ob die vorhandene bzw. nicht vorhandene Veränderung des Membranpotentials Auswirkungen auf die Zellphysiologie der neutrophilen Granulozyten hat.

Die entwickelte Methode eignet sich zu Charakterisierungen weiterer Zellen wie beispielsweise von Makrophagen oder weiterer Stimulantien, welche ebenso zur Immundysfunktion von neutrophilen Granulozyten bei entsprechenden Krankheiten beitragen könnten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allen D B, Maguire J J, Mahdavian M, Wicke C, Marcocci L, Scheuenstuhl H, Chang M, Le A X, Hopf H W, Hunt T K: Wound hypoxia and acidosis limit neutrophil bacterial killing mechanisms. Arch Surg Chic Ill: S. 991–996 (1997)
2. Bao Y, Ledderose C, Seier T, Graf A F, Brix B, Chong E, Junger W G: Mitochondria Regulate Neutrophil Activation by Generating ATP for Autocrine Purinergic Signaling. J Biol Chem: S. 26794–26803 (2014)
3. Baron D N, Ahmed S A: Intracellular concentrations of water and of the principal electrolytes determined by analysis of isolated human leucocytes. Clin Sci: S. 205–219 (1969)
4. Baron D N, Roberts P M: The sodium, potassium and water content of isolated normal human leucocytes. J Physiol: S. 219-226.1 (1963)
5. Bashford C L, Pasternak C A: Plasma membrane potential of neutrophils generated by the Na+ pump. Biochim Biophys Acta: S. 174–180 (1985)
6. Casey J R, Grinstein S, Orlowski J: Sensors and regulators of intracellular pH. Nat Rev Mol Cell Biol: S. 50–61 (2010)
7. Cividalli G, Nathan D G: Sodium and Potassium Concentration and Transmembrane Fluxes in Leukocytes. Blood S. 861–869 (1973)
8. Coulthard L G, Woodruff T M: Is the Complement Activation Product C3a a Proinflammatory Molecule? Re-evaluating the Evidence and the Myth. J Immunol: S. 3542–3548 (2015)
9. DeCoursey T E, Cherny V V, Zhou W, Thomas L L: Simultaneous activation of NADPH oxidase-related proton and electron currents in human neutrophils. Proc Natl Acad Sci: S. 6885–6889 (2000)
10. DeCoursey T E: The intimate and controversial relationship between voltage-gated proton channels and the phagocyte NADPH oxidase. Immunol Rev: S. 194–218 (2016)
11. DeCoursey T E, Morgan D, Cherny V V: The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. Nature: S. 531–534 (2003)
12. Demaurex N, Grinstein S, Jaconi M, Schlegel W, Lew D P, Krause K H: Proton currents in human granulocytes: regulation by membrane potential and intracellular pH. J Physiol: S. 329–344 (1993)
13. Demaurex N, Monod A, Lew D P, Krause K H: Characterization of receptor-mediated and store-regulated Ca2+ influx in human neutrophils. Biochem J: S. 595–601 (1994)
14. Denis C V, Wagner D D: Insights from von Willebrand disease animal models. Cell Mol Life Sci CMLS: S. 977–990 (1999)
15. Denk S, Neher M D, Messerer D A C, Wiegner R, Nilsson B, Rittirsch D, Nilsson-Ekdahl K, Weckbach S, Ignatius A, Kalbitz M, Gebhard F, Weiss M E, Vogt J, Radermacher P, Köhl J, Lambris J D, Huber-Lang M S: Complement C5a Functions as a Master Switch for the pH Balance in Neutrophils Exerting Fundamental Immunometabolic Effects. J Immunol Baltim Md (1950)
16. Denk S, Taylor R P, Wiegner R, Cook E M, Lindorfer M A, Pfeiffer K, Paschke S, Eiseler T, Weiss M, Barth E, Lambris J D, Kalbitz M, Martin T, Barth H, Messerer D A C, Gebhard F, Huber-Lang M S: Complement C5a-induced changes in neutrophil morphology during inflammation. Scand J Immunol (2017)

17. El Chemaly A, Okochi Y, Sasaki M, Arnaudeau S, Okamura Y, Demaurex N: VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification. J Exp Med: S. 129–139 (2010)
18. Elvington M, Liszewski M K, Atkinson J P: Evolution of the complement system: from defense of the single cell to guardian of the intravascular space. Immunol Rev: S. 9–15 (2016)
19. Fleischmann C, Thomas-Rueddel D O, Hartmann M, Hartog C S, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K: Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-Patienten im Krankenhaus. Dtsch Arztebl Int: S. 159–166 (2016)
20. Fournier B M, Parkos C A: The role of neutrophils during intestinal inflammation. Mucosal Immunol: S. 354–366 (2012)
21. Freeley S, Kemper C, Le Friec G: The “ins and outs” of complement-driven immune responses. Immunol Rev: S. 16–32 (2016)
22. Garley M, Jabłońska E: Heterogeneity Among Neutrophils. Arch Immunol Ther Exp: S. 21–30 (2018)
23. Goldman D E: POTENTIAL, IMPEDANCE, AND RECTIFICATION IN MEMBRANES. J Gen Physiol: S. 37–60 (1943)
24. Grinstein S, Furuya W, Biggar W D: Cytoplasmic pH regulation in normal and abnormal neutrophils. Role of superoxide generation and Na+/H+ exchange. J Biol Chem: S. 512–514 (1986)
25. Hayashi F: Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. Blood: S. 2660–2669 (2003)
26. Heiner I, Eisfeld J, Lückhoff A: Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. Cell Calcium: S. 533–540 (2003)
27. Henderson L M, Banting G, Chappell J B: The arachidonate-activable, NADPH oxidase-associated H+ channel. Evidence that gp91-phox functions as an essential part of the channel. J Biol Chem: S. 5909–5916 (1995)
28. Henderson L M, Chappell J B, Jones O T: Internal pH changes associated with the activity of NADPH oxidase of human neutrophils. Further evidence for the presence of an H+ conducting channel. Biochem J: S. 563–567 (1988)
29. Henderson L M, Chappell J B, Jones O T: The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H+ channel. Biochem J: S. 325–329 (1987)
30. Huber-Lang M S, Sarma J V, McGuire S R, Lu K T, Padgaonkar V A, Younkin E M, Guo R F, Weber C H, Zuiderweg E R, Zetoune F S, Ward P A: Structure-Function Relationships of Human C5a and C5aR. J Immunol: S. 6115–6124 (2003)
31. Huber-Lang M S, Younkin E M, Sarma J V, McGuire S R, Lu K T, Guo R F, Padgaonkar V A, Curnutte J T, Erickson R, Ward P A: Complement-Induced Impairment of Innate Immunity During Sepsis. J Immunol: S. 3223–3231 (2002)
32. Huber-Lang M, Lambris J D, Ward P A: Innate immune responses to trauma. Nat Immunol (2018)
33. Huber-Lang M, Sarma J V, Zetoune F S, Rittirsch D, Neff T A, McGuire S R, Lambris J D, Warner R L, Flierl M A, Hoesel L M, Gebhard F, Younger J G, Drouin S M, Wetsel R A, Ward P A: Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. Nat Med: S. 682–687 (2006)
34. Iskander K N, Osuchowski M F, Stearns-Kurosawa D J, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, Remick D G: Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding. Physiol Rev: S. 1247–1288 (2013)

35. Italiani P, Boraschi D: Induction of Innate Immune Memory by Engineered Nanoparticles: A Hypothesis That May Become True. Front Immunol: (2017)
36. Jankowski A, Grinstein S: A noninvasive fluorimetric procedure for measurement of membrane potential. Quantification of the NADPH oxidase-induced depolarization in activated neutrophils. J Biol Chem: S. 26098–26104 (1999)
37. Jones G S, Van Dyke K, Castranova V: Purification of human granulocytes by centrifugal elutriation and measurement of transmembrane potential. J Cell Physiol: S. 425–431 (1980)
38. Kilkenny C, Browne W J, Cuthill I C, Emerson M, Altman D G: Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. PLoS Biol: S. e1000412 (2010)
39. Kitagawa S, Ohta M, Nojiri H, Kakinuma K, Saito M, Takaku F, Miura Y: Functional maturation of membrane potential changes and superoxide-producing capacity during differentiation of human granulocytes. J Clin Invest: S. 1062–1071 (1984)
40. Klapperstück T, Glanz D, Hanitsch S, Klapperstück M, Markwardt F, Wohlrab J: Calibration procedures for the quantitative determination of membrane potential in human cells using anionic dyes: Calibration in Membrane Potential Measurement. Cytometry: S. 612–626 (2013)
41. Klapperstück T, Glanz D, Klapperstück M, Wohlrab J: Methodological aspects of measuring absolute values of membrane potential in human cells by flow cytometry. Cytometry: S. 593–608 (2009)
42. Klos A, Wende E, Wareham K J, Monk P N: International Union of Pharmacology. LXXXVII. Complement Peptide C5a, C4a, and C3a Receptors. Pharmacol Rev: S. 500–543 (2013)
43. Knöller E, Stenzel T, Broeskamp F, Hornung R, Scheuerle A, McCook O, Wachter U, Vogt J A, Matallo J, Wepler M, Gässler H, Gröger M, Matejovic M, Calzia E, Lampl L, Georgieff M, Möller P, Asfar P, Radermacher P, Hafner S: Effects of Hyperoxia and Mild Therapeutic Hypothermia During Resuscitation From Porcine Hemorrhagic Shock. Crit Care Med: S. e264-277 (2016)
44. Kolaczkowska E, Kubes P: Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat Rev Immunol: S. 159–175 (2013)
45. Kramer P A, Ravi S, Chacko B, Johnson M S, Darley-Usmar V M: A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: Implications for their use as bioenergetic biomarkers. Redox Biol: S. 206–210 (2014)
46. Krause K H, Demaurex N, Jaconi M, Lew D P: Ion channels and receptor-mediated Ca2+ influx in neutrophil granulocytes. Blood Cells: S. 165–175 (1993)
47. Krause K H, Welsh M J: Voltage-dependent and Ca2(+)-activated ion channels in human neutrophils. J Clin Invest: S. 491–498 (1990)
48. Kuroki M, Kamo N, Kobatake Y, Okimasu E, Utsumi K: Measurement of membrane potential in polymorphonuclear leukocytes and its changes during surface stimulation. Biochim Biophys Acta 693: S. 326–334 (1982)
49. Lardner A: The effects of extracellular pH on immune function. J Leukoc Biol: S. 522–530 (2001)
50. Lazzari K G, Proto P J, Simons E R: Simultaneous measurement of stimulus-induced changes in cytoplasmic Ca2+ and in membrane potential of human neutrophils. J Biol Chem: S. 9710–9713 (1986)
51. Leliefeld P H C, Wessels C M, Leenen L P H, Koenderman L, Pillay J: The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. Crit Care: (2016)

52. Lord J M, Midwinter M J, Chen Y-F, Belli A, Brohi K, Kovacs E J, Koenderman L, Kubes P, Lilford R J: The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. The Lancet: S. 1455–1465 (2014)
53. Maianski N A, Geissler J, Srinivasula S M, Alnemri E S, Roos D, Kuijpers T W: Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. Cell Death Differ: S. 143–153 (2004)
54. Manthey H D, Woodruff T M, Taylor S M, Monk P N: Complement component 5a (C5a). Int J Biochem Cell Biol: S. 2114–2117 (2009)
55. Martin M A, Nauseef W M, Clark R A: Depolarization blunts the oxidative burst of human neutrophils. Parallel effects of monoclonal antibodies, depolarizing buffers, and glycolytic inhibitors. J Immunol Baltim Md: S. 3928–3935 (1950)
56. McIlroy D J, Jarnicki A G, Au G G, Lott N, Smith D W, Hansbro P M, Balogh Z J: Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery. J Crit Care: S. 1133.e1-1133.e5 (2014)
57. McPhail L C, Snyderman R: Activation of the respiratory burst enzyme in human polymorphonuclear leukocytes by chemoattractants and other soluble stimuli. Evidence that the same oxidase is activated by different transductional mechanisms. J Clin Invest: S. 192–200 (1983)
58. Messerer D A C, Denk S, Föhr K J, Halbgebauer R, Braun C K, Hönes F, Harant J, Fauler M, Frick M, Nußbaum B L, Radermacher P, Hafner S, Huber-Lang M S: Complement C5a Alters the Membrane Potential of Neutrophils during Hemorrhagic Shock. Mediators Inflamm (2018), veröffentlicht unter der Lizenz CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
59. Monk P N, Scola A-M, Madala P, Fairlie D P: Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. Br J Pharmacol: S. 429–448 (2007)
60. Morgan D, Capasso M, Musset B, Cherny V V, Rios E, Dyer M J S, DeCoursey T E: Voltage-gated proton channels maintain pH in human neutrophils during phagocytosis. Proc Natl Acad Sci: S. 18022–18027 (2009)
61. Morriello F: Neutrophils and Inflammation: Unraveling a New Connection. Biol Med: (2016)
62. Nathan C: Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat Rev Immunol: S. 173–182 (2006)
63. Nichols T C, Bellinger D A, Merricks E P, Raymer R A, Kloos M T, DeFriess N, Ragni M V, Griggs T R: Porcine and Canine von Willebrand Factor and von Willebrand Disease: Hemostasis, Thrombosis, and Atherosclerosis Studies. Thrombosis: S. 1–11 (2010)
64. Nishiura H, Nonaka H, Revollo I S, Semba U, Li Y, Ota Y, Irie A, Harada K, Kehrl J H, Yamamoto T: Pro- and anti-apoptotic dual functions of the C5a receptor: involvement of regulator of G protein signaling 3 and extracellular signal-regulated kinase. Lab Invest: S. 676–694 (2009)
65. Nußbaum B L, Stenzel T, Merz T, Scheuerle A, McCook O, Wachter U, Vogt J A, Matallo J, Gässler H, Gröger M, Matejovic M, Calzia E, Lampl L, Georgieff M, Möller P, Asfar P, Radermacher P, Hafner S: Hyperoxia or Therapeutic Hypothermia During Resuscitation from Non-Lethal Hemorrhagic Shock in Swine: SHOCK S. 1 (2017)
66. Petheö G L, Maturana A, Spät A, Demaurex N: Interactions between Electron and Proton Currents in Excised Patches from Human Eosinophils. J Gen Physiol: S. 713–726 (2003)
67. Petheő G L, Demaurex N: Voltage- and NADPH-dependence of electron currents generated by the phagocytic NADPH oxidase. Biochem J: S. 485–491 (2005)

68. PhysiologyWeb: Goldman-Hodgkin-Katz Equation Calculator. *PhysiologyWeb-Team*, abgerufen am 10.10.2016, http://www.physiologyweb.com/calculators/
69. Quadros A U, Cunha T M: C5a and pain development: An old molecule, a new target. Pharmacol Res: S. 58–67 (2016)
70. Read M S, Potter J Y, Brinkhous K M: Venom coagglutinin for detection of von Willebrand factor activity in animal plasmas. J Lab Clin Med: S. 74–82 (1983)
71. Ricklin D, Lambris J D: Complement in Immune and Inflammatory Disorders: Pathophysiological Mechanisms. J Immunol: S. 3831–3838 (2013)
72. Riedemann N C, Guo R-F, Hollmann T J, Gao H, Neff T A, Reuben J S, Speyer C L, Sarma J V, Wetsel R A, Zetoune F S, Ward P A: Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. FASEB J: S. 370–372 (2004)
73. Rittirsch D, Flierl M A, Nadeau B A, Day D E, Huber-Lang M, Mackay C R, Zetoune F S, Gerard N P, Cianflone K, Köhl J, Gerard C, Sarma J V, Ward P A: Functional roles for C5a receptors in sepsis. Nat Med: S. 551–557 (2008)
74. Rittirsch D, Redl H, Huber-Lang M: Role of Complement in Multiorgan Failure. Clin Dev Immunol: S. 1–10 (2012)
75. Sacchi F: Defective membrane potential changes in neutrophils from human neonates. J Exp Med: S. 1247–1252 (1984)
76. Sadik C D, Kim N D, Luster A D: Neutrophils cascading their way to inflammation. Trends Immunol: S. 452–460 (2011)
77. Scapini P, Marini O, Tecchio C, Cassatella M A: Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. Immunol Rev: S. 48–60 (2016)
78. Schrenzel J, Serrander L, Bánfi B, Nüße O, Fouyouzi R, Lew D P, Demaurex N, Krause K-H: Electron currents generated by the human phagocyte NADPH oxidase. Nature: S. 734–737 (1998)
79. Seligmann B E, Gallin E K, Martin D L, Shain W, Gallin J I: Interaction of chemotactic factors with human polymorphonuclear leukocytes: Studies using a membrane potential-sensitive cyanine dye. J Membr Biol: S. 257–272 (1980)
80. Seligmann B E, Gallin J I: Comparison of indirect probes of membrane potential utilized in studies of human neutrophils. J Cell Physiol: S. 105–115 (1983)
81. Simchowitz L: Chloride movements in human neutrophils. Diffusion, exchange, and active transport. J Gen Physiol: S. 167–194 (1986)
82. Simchowitz L, Spilberg I, De Weer P: Sodium and potassium fluxes and membrane potential of human neutrophils: evidence for an electrogenic sodium pump. J Gen Physiol: S. 453–479 (1982)
83. Solomkin J S, Jenkins M K, Nelson R D, Chenoweth D, Simmons R L: Neutrophil dysfunction in sepsis. II. Evidence for the role of complement activation products in cellular deactivation. Surgery: S. 319–327 (1981)
84. SusztáK K, MóCsai A, Ligeti E, Kapus A: Electrogenic H+ pathway contributes to stimulus-induced changes of internal pH and membrane potential in intact neutrophils: role of cytoplasmic phospholipase A2. Biochem J: S. 501–510 (1997)
85. Unnewehr H, Rittirsch D, Sarma J V, Zetoune F, Flierl M A, Perl M, Denk S, Weiss M, Schneider M E, Monk P N, Neff T, Mihlan M, Barth H, Gebhard F, Ward P A, Huber-Lang M: Changes and Regulation of the C5a Receptor on Neutrophils during Septic Shock in Humans. J Immunol: S. 4215–4225 (2013)
86. Velik-Salchner C, Schnürer C, Fries D, Müssigang P R, Moser P L, Streif W, Kolbitsch C, Lorenz I H: Normal values for thrombelastography (ROTEM®) and

selected coagulation parameters in porcine blood. Thromb Res: S. 597–602 (2006)
87. Ward P A: Role of C5 Activation Products in Sepsis. Sci World J: S. 2395–2402 (2010)
88. Ward P A: The dark side of C5a in sepsis. Nat Rev Immunol: S. 133–142 (2004)
89. Ward P A: The Harmful Role of C5a on Innate Immunity in Sepsis. J Innate Immun: S. 439–445 (2010)
90. World Health Organization (WHO): Health statistics and information systems, Estimates for 2000–2012, abgerufen am 05.10.2016, http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/
91. Wright S H: Generation of resting membrane potential. AJP Adv Physiol Educ: S. 139–142 (2004)
92. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon H U: Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. Cell Death Differ: S. 1438–1444 (2009)

7. DANKSAGUNG

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

8. LEBENSLAUF

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.