Institut für Klinische und Experimentelle Trauma-Immunologie,
Universitätsklinikum Ulm

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

Interleukin 8 induzierte Veränderungen des intrazellulären pH-Werts neutrophiler Granulozyten

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

von Stefan Bernhard

Schwabmünchen

2022

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. med. David Alexander Christian Messerer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Manfred Frick

Tag der Promotion: 15.06.2023

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Bernhard S, Hug S, Stratmann AEP, Erber M, Vidoni L, Knapp CL, Thomaß BD, Fauler M, Nilsson B, Nilsson Ekdahl K, Föhr K, Braun CK, Wohlgemuth L, Huber-Lang M, Messerer DAC: Interleukin 8 Elicts Rapid Physiological Changes in Neutrophils That Are Altered by Inflammatory Conditions. Journal of Innate Immunity (2021), veröffentlicht unter der Lizenz CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.
https://doi.org/10.1159/000514885

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht in:

Messerer D A C, Vidoni L, Erber M, Stratmann A E P, Bauer J M, Braun C K, Hug S, Adler A, Nilsson Ekdahl K, Nilsson B, Barth E, Radermacher P, Huber-Lang M: Animal-free human whole blood sepsis model to study changes in innate immunity. Frontiers in Immunology (2020) veröffentlicht unter der Lizenz CC BY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.
https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.571992

Hug S, **Bernhard S**, Stratmann AEPS, Erber M, Wohlgemuth L, Knapp C, Bauer JM, Vidoni L, Fauler M, Föhr KJ, Radermacher P, Hoffmann A, Huber-Lang M, Messerer DAC: Activation of Neutrophil Granulocytes by Platelet-Activating Factor is impaired during Sepsis. Frontiers in Immunology (2021) veröffentlicht unter der Lizenz CC BY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.
https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.642867

Stratmann AEP, Wohlgemuth L, Erber M, **Bernhard S**, Hug S, Fauler M, Vidoni L, Mohamed AOK, Thomaß BD, Münnich F, Stukan L, Föhr KJ, Mannes M, Huber-Lang M, Messerer DAC: Simultaneous measurement of changes in neutrophil granulocyte membrane potential, intracellular pH, and cell size by multiparametric flow cytometry. Biomedicines (2021) veröffentlicht unter der Lizenz CC BY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0.
https://doi.org/10.3390/biomedicines9111504

Des Weiteren wurden Teile dieser Arbeit im Rahmen folgender Fachkongresse vorgestellt:

Bernhard S, Hug S, Fauler M, Huber-Lang M, Messerer DAC: Interleukin 8 alters the intracellular pH and glucose uptake of neutrophil granulocytes. 7th Symposium of the Young Physiologists, Nürnberg, Deutschland, 2019

Bernhard S, Hug S, Stratmann AEP, Huber-Lang MS, Fauler M, Messerer. DAC: Activation of PMN by Interleukin 8 evokes a shift in intracellular pH and glucose metabolism challengeable by LPS. 23. Chirurgische Forschungstage, Aachen, Deutschland, 2019

Messerer DAC, **Bernhard S**, Hug S, Stratmann AEP, Fauler M, Föhr K, Huber-Lang MS: Interleukin 8 evokes an alkalization of neutrophils in dependence of NHE1, P2Y and AE-1. 98. Jahrestagung der DPG, Ulm, Deutschland, 2019

Abkürzungsverzeichnis……III-V

1. EINLEITUNG.....1

1.1. SYSTEMISCHE ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN UND SEPSIS BEIM MENSCHEN 1
1.2. DAS IMMUNSYSTEM 1
1.3. NEUTROPHILE GRANULOZYTEN 2
1.4. ZYTOKINE.....3
1.5. INTERLEUKIN 8 4
1.6. PHYSIOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN NEUTROPHILER GRANULOZYTEN DURCH CHEMOTAXINE UND WÄHREND SYSTEMISCHER INFLAMMATION.....7
1.7. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT 8

2. MATERIAL UND METHODEN.....10

2.1. LÖSUNGEN UND PUFFER.....10
2.2. FLUORESZENZFARBSTOFFE 10
2.3. STIMULANZIEN.....11
2.4. CHEMIKALIEN 11
2.5. ANTIKÖRPER 11
2.6. HEMMSTOFFE.....12
2.7. GERÄTE 12
2.8. VERBRAUCHSMATERIAL 13
2.9. SOFTWARE.....14
2.10. ISOLATION VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN.....15
2.11. ISOLATION VON LEUKOZYTEN 15
2.12. STIMULATION NEUTROPHILER GRANULOZYTEN 16
2.13. HEMMUNG VON IONENTRANSPORTPROTEINEN / -KANÄLEN UND INTRAZELLULÄREN SIGNALMOLEKÜLEN 16
2.14. DURCHFLUSSZYTOMETRIE UND ZELLGRÖßENBESTIMMUNG.....17
2.15. MESSUNG DES INTRAZELLULÄREN PH-WERTS 18
2.16. MESSUNG DES MEMBRANPOTENTIALS.....20
2.17. MESSUNG DER GLUKOSEAUFNAHME 20

2.18. Chemotaxis 21
2.19. Veränderung des extrazellulären pH-Werts 21
2.20. Vorinkubationsexperimente 21
2.21. Ex-vivo-Vollblutmodell 22
2.22. Sekundengenaue durchflusszytometrische Messungen 23
2.23. Ethikvotum 24
2.24. Statistik 24

3. ERGEBNISSE 25

3.1. IL-8-induzierte Leukozytenantwort im Vergleich zu anderen Stimulanzien 25
3.2. Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf die IL-8-induzierte Neutrophilenantwort 30
3.3. Veränderung der IL-8-induzierten Neutrophilenantwort durch experimentelle inflammatorische Bedingungen 33
3.4. Abgleich mit der Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit 38

4. DISKUSSION 41

4.1. IL-8-vermittelte Reaktion neutrophiler Granulozyten unter physiologischen Umständen 41
4.2. Pharmakologische Modulation der IL-8-induzierten Effekte 43
4.3. LPS als Modulator IL-8-vermittelter Reaktionen 45
4.4. Limitationen und Stärken der Arbeit 47
4.5. Schlussfolgerung 49

5. ZUSAMMENFASSUNG 51

6. LITERATURVERZEICHNIS 53

7. DANKSAGUNG 67

8. LEBENSLAUF 68

Abkürzungsverzeichnis:

Abkürzung	Bedeutung
2NBDG	2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose, Farbstoff zur Bestimmung der Glukoseaufnahme
AU	Arbitary unit, künstliche Einheit
BAPTA-AM	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N′,N′-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester), intrazellulärer Ca^{2+}-Chelator
BCECF	2′,7′-bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxyfluorescein, Farbstoff zur Zellerkennung bei Chemotaxis
C5a	Komplementfaktor 5a
Ca^{2+}	Calciumionen
Cl^-	Chloridionen
Ctrl	Kontrolle
CXCR1 (CD181)	Interleukin 8 Rezeptor 1 (auch: Cluster of differentiation 181)
CXCR2 (CD182)	Interleukin 8 Rezeptor 2 (auch: Cluster of differentiation 182)
DAMP	Damage-associated molecular pattern, Schadensassoziierte molekulare Muster
Dibac	Bis(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol, Fluoreszenzfarbstoff zur Ermittlung des Membranpotentials
DMOG	Dimethyloxalylglycine, HIF-1α-Stabilisator
$DPBS^{+/+}$	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline + Ca^{2+} + Mg^{2+}, phosphatgepufferte Salzlösung
DPI	Diphenyleneiodonium chloride, Hemmer von Flavoenzymen, NADPH-Oxidase
EC_{50}	Mittlere effective Konzentration
ERK1/2	Extracellular-signal regulated kinases, extrazellulär regulierte Kinasen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff
fMLF	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GLUT-1	Glukosetransporter 1

H^+	Wasserstoffionen, Protonen
$HBSS^{+/+}$	Hank´s Balanced Salt Solution + Ca^{2+} + Mg^{2+}, bicarbonathaltiges Puffermedium
HIF-1α	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 alpha
IL-1β, -6, -8, -10, -13, -17, -23	Interleukin 1β, 6, 8, 10, 13, 17, 23
K^+	Kaliumionen
Kd	Dissoziationskonstante
LBP	Lipopolysaccharid-Bindeprotein
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
LTB4	Leukotrien B4
Mg^{2+}	Magnesiumionen
MP	Membranpotential
MPC	Mitochondrialer Pyruvattransporter
Na^+	Natriumionen
NaCl 0,9%, 2,7%	Natriumchlorid-Lösung mit 0,9% bzw. 2,7%
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NHE1	Na^+/H^+-Austauscher 1
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid, Hemmer Cl^- Kanäle
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern, Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PE	Phycoerythrin, Fluoreszenzfarbstoff
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein, Fluoreszenzfarbstoff
pH_e	Extrazellulärer pH-Wert
pH_i	Intrazellulärer pH-Wert
PKC	Proteinkinase C
PMN	Polymorphonuclear Leukocytes, polymorphkernige Granulozyten
PRR	Pattern Recognition Receptor, Mustererkennungsrezeptor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

rpm	revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, Nährmedium
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler
SKF-96365	1-[2-(4-Methoxyphenyl)-2-[3-(4 methoxyphenylpropoxy]ethyl] imidazole, Hemmer Rezeptor- und Spannungs-abhängige Ca^{2+}-Aufnahme
SNARF	5-(and-6)-Carboxy SNARF™-1, Acetoxymethyl Ester, Acetate, Farbstoff zur Ermittlung des pH_i
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
SOFA-Score	Sepsis-related organ failure assessment score, Punktewert zur Beurteilung des Organversagens bei Sepsis
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
UK5099	2-Cyano-3-(1-phenyl-1H-indol-3-yl)-2-propenoic acid, Hemmer mitochondrialer Pyruvattransporter
W7	N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide Hydrochloride, Hemmer von Calmodulin

1. EINLEITUNG

1.1. Systemische Entzündungsreaktionen und Sepsis beim Menschen

Unterschiedliche pathologische Zustände bedingen eine systemische Entzündungsantwort des menschlichen Körpers, beispielsweise schwere Traumata, ausgedehten Blutungen oder während einer Sepsis [72, 109, 135]. Mit einer Inzidenz von 677 Erkrankungsfällen pro 100.000 Personen verursacht die Sepsis 19,7% aller Todesfälle weltweit und zählt damit zu den häufigsten und tödlichsten Erkrankungen [98]. Sepsis ist dabei definiert als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, welche durch eine irreguläre Immunantwort auf eine Infektion zustande kommt [109]. Die facettenreiche Pathophysiologie der Sepsis ergibt sich aus der Herausforderung des Immunsystems durch pathogen assoziierte molekulare Muster (englisch: Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMPs), aber auch durch körpereigene Stoffe, welche als Gefahren assoziierte molekulare Muster (englisch: Danger Associated Molecular Pattern, DAMPs) bezeichnet werden und durch zelluläre Schäden freigesetzt werden. Weitere Bestandteile der systemischen Entzündung sind Zytokine wie das Interleukin 8. Diese regulatorischen Mediatoren sind zentrale Immunmodulatoren, aber unter pathologischen Zuständen auch starke Treiber der inflammatorischen Reaktionen [10, 34, 46, 123, 130]. Besonders eine langanhaltende Exposition in hohen Konzentrationen mit diesen Substanzen kann für eine Überstimulation und damit einhergehender Dysregulation des Immunsystems sorgen [3, 10, 88, 130]. Die überschießende Immunzellaktivität kann zu einer Schädigung körpereigener Zellen und Organen führen [3, 95]. Trotz intensiver Forschung und zahlreicher neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze bleibt die Sepsis eine schwerwiegende und häufig tödlich verlaufende Erkrankung, deren Pathophysiologie immer noch nicht vollständig verstanden ist [3, 20, 67].

1.2. Das Immunsystem

Das Immunsystem gliedert sich in zelluläre bzw. feste und humorale bzw. lösliche Anteile. Beide Anteile können ihrerseits noch in einen angeborenen, unspezifischen und einen adaptiven, spezifischen Teil unterschieden werden. Zum angeborenen

Immunsystem werden zusätzlich anatomische, physikalische und chemische Barrieren der Haut und Schleimhäute gezählt, die ein Eindringen pathogener Erreger verhindern sollen. Dringen dennoch Pathogene, aber auch andere schädliche Substanzen in den Körper ein, ist es die Aufgabe des Immunsystems, diese zu erkennen, zu beseitigen und eventuell entstandenen Schaden zu reparieren [17, 23, 36, 73]. Das angeborene Immunsystem ist die vorderste Verteidigungslinie des Körpers gegen Infektionen und zeichnet sich durch eine unverzügliche Reaktion (innerhalb von Minuten bis Stunden) auf Gefahren aus. Diese schnelle Antwort wird durch ein ganzes Arsenal an Zytokinen und Chemokinen erzeugt, welche eine zügige Mobilisation von Immunzellen an den Ort der Entzündung hervorrufen [17, 73]. Die Immunzellen sind dabei ausgestattet mit Mustererkennungsrezeptoren (englisch: Pattern Recognition Receptors, PRRs) zur Erkennung von bestimmten und wiederkehrenden molekularen Strukturen auf Pathogenen, aber auch auf beschädigten körpereigenen Zellen, den PAMPs bzw. DAMPs [63, 69, 73]. Dem gegenüber steht das adaptive Immunsystem. Dieses reagiert mit einer gewissen Latenzzeit auf eine Bedrohnung, begegnet dieser aber mit einer hoch spefizischen Immunantwort, beispielsweise durch die Bildung antigenspefizischer Antikörper. Eine weitere Besonderheit des adaptiven Immunsystems ist die Bildung von Gedächtniszellen, wodurch das Immunsystem bei erneutem Kontakt mit einem Pathogen schneller und effektiver reagieren kann [17, 73]. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass die Bildung einer Gedächtnisfunktion nicht nur eine Fähigkeit der adaptiven Immunität ist, sondern dass dazu auch natürliche Killerzellen, eine der angeborenen Immunität zugehörigen Zellart, fähig sind [115]. Die Immunantwort ist ein komplexes Zusammenspiel aller Komponenten sowie auch die Interaktion mit anderen Organsystemen [16, 17, 73, 112].

1.3. Neutrophile Granulozyten

Die erste zelluläre Verteidigungslinie des Immunsystems bilden die neutrophilen Granulozyten, auch bekannt als polymorphkernige Granulozyten (englisch Polymorphonuclear Leukocytes, PMN). Der Lebenszyklus der Neutrophilen beginnt im Knochenmark mit einer kontinuierlichen Bildung neuer Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen. Nach abgeschlossener Ausreifung wird die Freisetzung der Neutrophilen aus dem Knochenmark durch zahlreiche Signalstoffe,

wie beispielsweise Interleukin 8 (IL-8), G-CSF, IL-17 und IL-23 bewirkt. Durch Entzündungsmediatoren aktivierte Endothelzellen lösen die Adhäsionskaskade zirkulierender Neutrophiler aus und sorgen damit für eine gezielte Mobilisation der Zellen an den Ort der Entzündung [66, 96]. Die Bewegung der Neutrophilen im Gewebe wird koordiniert durch Chemotaxine, einerseits bakterielle Substanzen wie fMLF, aber auch körpereigene Moleküle, wie IL-8, dem Komplementfaktor 5a (C5a) und Leukotrien B4 (LTB4) [62]. An ihrem Zielort werden die Neutrophilen aktiviert und erfüllen ihre Aufgabe, Erreger und Gewebedebris durch Phagozytose aufzunehmen und mittels intrazellulärer Enzyme und Sauerstoffradikale zu beseitigen. Des Weiteren können die Zellen durch eine kontrollierte Apoptose Teile ihrer DNA freisetzen und damit Netze bilden, in denen Erreger gefangen werden können (englisch: Neutrophil Extracellular Traps, NETs). Damit beteiligen sich die Neutrophilen auch an der Reparatur eventuell entstandener Gewebeschäden [66, 76]. All diese komplexen Mechanismen werden unter anhaltender und schwerer Entzündung gestört. Dies äußert sich beispielsweise in der verminderten Expression wichtiger Rezeptoren, gestörter Chemotaxis, vermehrter Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (englisch: Reactive Oxygen Species, ROS) und damit einhergehender Gewebezerstörung und der Suppression des adaptiven Immunsystems. Die Folgen sind Schäden an verschiedenen Organsystemen und eine negative Wirkung auf den Krankheitsverlauf [32, 66].

1.4. Zytokine

Zytokine stellen einen bedeutenden Teil der löslichen Faktoren des Immunsystems dar [2, 123]. Zytokine werden von einer Vielzahl verschiedener Zellen sezerniert und entfalten ihre Hauptwirkung an den Zellen des Immunsystems bereits im picomolaren Bereich [5, 59]. Neben der Zellkommunikation umfassen die pleiotropen Effekte der Zytokine unter Anderem die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Immunzellen, aber auch die Regulation der Zytokinproduktion selbst [29, 123, 139]. Aus funktioneller Sicht gliedern die Zytokine sich orientierend in Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktoren, kolonie-stimulierende Faktoren, Chemokine und Wachstumsfaktoren, wobei manche Moleküle mehreren Gruppen zugeordnet werden können [120, 123]. Für eine zielgerichtete und ausreichende Immunantwort ist ein kritisches Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen notwendig. Dieses Gleichgewicht wird jedoch

durch zahlreiche pathologische Zustände gestört. Beispielsweise durch eine Sepsis, aber auch iatrogen durch Immuntherapien, wie der CAR-T-Zell-Therapie bei Kolonkarzinomen [83, 103]. Auch das Aufkommen der SARS-CoV-2 Pandemie rückte unter Anderem die Aufmerksamkeit auf ein dysreguliertes Zytokinprofil als ein treibender Faktor der Pathophysiologie bei einer Infektion mit dem Virus. Dieses als „Zytokinsturm“ bezeichnetes Phänomen zeichnet sich durch eine Fehlregulation der Mediatoren aus, wodurch es zu einem sprunghaften Anstieg der Zytokine im Patienten kommt, verbunden mit nachfolgender systemischer Inflammation bis hin zu sekundär entstehenden Organschäden [34, 121].

1.5. Interleukin 8

Der Begriff „Interleukin“ wurde 1979 eingeführt und dient zur genaueren Beschreibung von Mediatoren, die für die Kommunikation zwischen Leukozyten untereinander verantwortlich sind [4]. Darüber hinaus besitzen Interleukine eine Reihe weiterer Funktionen. Zu der Familie der Interleukine zählen auch zentrale proinflammatorische Zytokine, wie das Interleukin 1β und das Interleukin 6 [30, 60, 123]. Interleukin 8 ist ein bedeutendes proinflammatorisches Zytokin, dessen Auswirkung auf Neutrophile ein zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit darstellt [47, 123]. IL-8 ist darüber hinaus nicht nur ein Interleukin, sondern vor allem auch ein Chemokin [47, 123]. Die Chemokine definieren sich über ihre Struktur. Entscheidend für die Funktion und Rezeptorbindung sind dabei Cysteinreste, welche als Kennzeichen für die Einteilung der Chemokine in die entsprechenden Untergruppen maßgeblich sind. Die zwei größten Untergruppen werden durch die CC- (Cysteinreste, direkt miteinander verbunden) und CXC-Chemokine (Cysteinreste, getrennt durch eine weitere variable Aminosäure) gebildet; zu Letzteren zählt auch IL-8. Die Hauptaufgabe der Chemokine ist die Induktion der Chemotaxis, d.h. der zielgerichteten Bewegung der Leukozyten auf einen bestimmten Stimulus. Darüber hinaus zeigen die Chemokine zahlreiche weitere Effekte im Bereich der Immunmodulation und Zellhomöostase [55, 71, 80, 99].

IL-8 ist ein meist aus 72 Aminosäuren (≈ 8,4 kDa) oder 77 Aminosäuren (≈ 8,9 kDa) bestehendes proinflammatorisches Molekül [6, 14, 47], dessen zentrale Aufgabe die Induktion der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten ist. IL-8 bewirkt auch eine Erhöhung des zytosolischen Calciums, die Freisetzung lysosomaler Enzyme und

ROS, eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und die Initiierung der Netose [15, 28, 39, 46, 49, 53, 118]. Neben diesen immunmodulatorischen Effekten zeigt IL-8 noch eine angiogenetische Wirkung [14]. Vermittelt werden die biologischen Funktionen von IL-8 über die zwei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR1 (CD181) und CXCR2 (CD182). Nach der Rezeptorstimulation werden zahlreiche nachgeschaltete Signalwege, wie beispielsweise die Phosphatidylinositol-3-Kinase, die Phospholipase Cβ2 und ERK1/2 aktiviert und rufen dadurch die biologischen Wirkungen hervor. Beide Rezeptoren werden vor allem von hämatopoetischen Zellen exprimiert, finden sich aber auch auf Endothel- und Epithelzellen. [43, 113]. Da diese strukturell eng verwandt sind, zeigen beide Rezeptoren eine ähnliche Affinität zu IL-8 (Kd ≈ 1-3 nM), unterscheiden sich jedoch geringfügig in ihrer Funktion. Über beide Rezeptoren können die Chemotaxis, Phagozytose und intrazellulären Calciumsignalwege aktiviert werden. CXCR2 reagiert dabei auf geringere Konzentrationen IL-8, was als Indiz dafür angesehen wird, dass dieser Rezeptor bei niedrigeren IL-8 Konzentrationen für die initiale Chemotaxis im Blut verantwortlich ist.

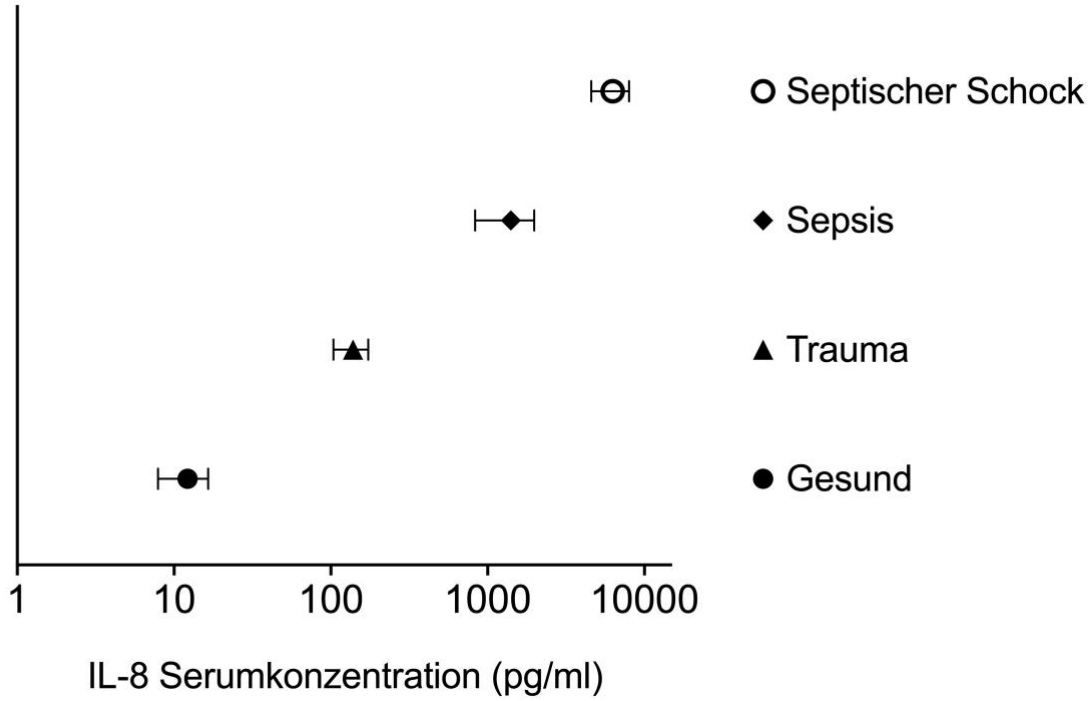

Abb. 1: Vergleich von IL-8 Konzentrationen im Serum verschiedener Pathologika mit den in dieser Arbeit errmittelten EC_{50}-Werten für den pH_i und FSC [31, 74, 127]. Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler.

Dies wird untermauert durch den Umstand, dass CXCR2 neben IL-8 zahlreiche andere chemotaktisch wirkende Liganden binden kann, während CXCR1 nur einen weiteren Liganden binden kann. CXCR1 scheint seine Hauptwirkung am Ort des Entzündungsgeschehens bei hohen IL-8 Konzentrationen zu entfalten und dort Einfluss auf die Bildung von ROS zu haben. [18, 43, 58, 65, 91, 113]. Unter physiologischen Bedingungen lassen sich weniger als 15 pg / ml IL-8 im menschlichen Serum feststellen [127, 138]. Eine starke Aktivierung des Immunsystems durch verschiedene Pathologika, wie schwere Traumata oder septische Zustände, führt zu einer deutlichen Zunahme der Serum IL-8-Werte von 1,4 ng / ml in Sepsis bis hin zu 6,3 ng / ml im septischen Schock [31, 74, 127] (Abb. 1).

Pathologische Zustände ändern die Rolle von IL-8. Begleitumstände einer Inflammation, wie Hypoxie, oxidativer Stress, die Ausschüttung anderer proinflammatorischer Mediatoren (wie IL-1β, TNF-α) oder pathogener Bestandteile führen zu einer deutlichen Induktion der IL-8 Produktion [38, 51, 84]. Diese Überstimulation führt zu einem Anstieg von ROS, einer Suppression der Apopotose Neutrophiler und einer vermehrten Ansammlung von Neutrophilen am Ort der Entzündung. [46, 61, 81, 92]. Zusätzlich hat IL-8 eine erhöhte kapilläre Permeabilität zur Folge und verursacht einen prokoagulatorischen Effekt des Gerinnungssystems [9, 102]. All diese Faktoren zusammen führen zu einer konsekutiven Zerstörung von Gewebe und einer Steigerung der Inflammation. Dies macht sich klinisch bemerkbar durch eine deutliche Korrelation zwischen IL-8 Serumkonzentrationen und der Schwere systemischer Entzündungsreaktionen, wie beispielsweise bei Trauma, während der Sepsis und des aktuen Lungenversagens [1, 40, 44, 108]. Die Bedeutung von IL-8 im systemischen Inflammationsgeschehen wird unterstrichen durch den Umstand, dass es als diagnostischer und prognostischer Marker für z.B. die Sepsis verwendet werden kann, und dabei auch mit klinischen Messinstrumenten, wie dem SOFA-Score korreliert [13]. Daher wurden schon erste Versuche unternommen durch eine Blockade der IL-8 Rezeptoren therapeutisch in schwere systemische Entzündungen einzugreifen [11, 128]. Zusammenfassend stellt sich IL-8 als ein wichtiges Molekül in der komplexen Regulation neutrophiler Granulozyten dar.

1.6. Physiologische Veränderungen neutrophiler Granulozyten durch Chemotaxine und während systemischer Inflammation

Die Dysfunktion neutrophiler Granulozyten während der systemischen Inflammation ist immer noch Gegenstand intensiver Forschung [66]. Als mögliche Ursache werden Veränderungen physiologischer Abläufe gesehen. Die Exposition gegenüber körpereigenen Chemotaxinen wie z.B. C5a oder körperfremden Stoffen wie fMLF führt zu einer definierten Abfolge physiologischer Reaktionen der Neutrophilen [26, 27, 77, 94]. Diese Reaktionen beginnen mit einer Depolarisation des Membranpotentials, gefolgt von einer intrazellulären Alkalinisierung und einer Veränderung der zellulären Morphologie. Zustätzlich zeigt sich eine Aktivierung des zellulären Stoffwechsels durch eine zunehmende Glukoseaufnahme [26, 27, 54, 77, 94]. Die Bedeutung dieser physiologischen Vorgänge zeigt sich aufgrund einer Verknüpfung mit zahlreichen Effektorfunktionen der Neutrophilen. Beispielsweise führen Veränderungen des intrazellulären pH-Werts Neutrophiler zu Veränderungen der Apoptoserate, Chemotaxis und Phagozytose [19, 42, 94]. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass diese physiologischen Parameter während systemischer Inflammation verändert sind. So ließ sich ein alkalischer intrazellulärer pH-Wert, ein erhöhtes Zellvolumen und eine verminderte Fähigkeit zur Depolarisation des Membranpotentials darstellen [26, 27, 77]. Dies führte zu ersten Ansätzen, diese Veränderungen als diagnostische und/oder prognostische Marker während entzündlicher Prozesse zu nutzen [50, 52, 126]. Eine frühere Studie beschrieb für IL-8 einen Einfluss auf das Membranpotential und den intrazellulären pH-Wert [137].

Zusammenfassend spielt die durch Entzündungsmediatoren getriebene Aktivität neutrophiler Granulozyten in Entzündungsgeschehen eine wichtige klinische Rolle. Wärhrend für pathophysiologisch hochrelevante Chemokine wie fMLF und C5a zellphysiologische Abläufe bereits ausführlich beschrieben wurden, so besteht hier für das pathophysiologisch und klinisch relevante IL-8 noch nicht vollständig der Fall. Daher befasst sich diese Dokotorarbeit mit den nachfolgenden Fragestellungen.

Aus der Zusammenschau der bereits vorhandenen Literatur über neutrophile Granulozyten und ihrer physiologischen Eigenschaften sowie über Interleukin 8, als einen wichtigen proinflammatorischen Mediator ergab sich folgende Hypothese:

Interleukin 8 verursacht zentrale Änderungen hinsichtlich des intrazellulären pH und der Zellgröße neutrophiler Granulozyten. Die dabei entstehenden Reaktionsmuster unterliegen wiederum Änderungen durch inflammatorische Umgebungsbedingungen.

Zur Untersuchung der Hypothese wurden folgende Teilschritte definiert (siehe auch Abbildung 2):

1. Charaktierisierung der IL-8-induzierten physiologischen Reaktionen neutrophiler Granulozyten.

2. Etablierung einer sekundengenauen durchflusszytometrischen Messung zur genaueren Identifizierung der IL-8-vermittelten Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes und des FSCs.

3. Modulation der beobachteten physiologischen Reaktionen durch Verwendung verschiedener Inhibitoren zur Analyse vermittelnder Ionentransportproteine und Signalmoleküle.

4. Beeinflussung der IL-8-induzierten Antworten durch experimentelle inflammatorische Bedingungen in vitro und ex vivo.

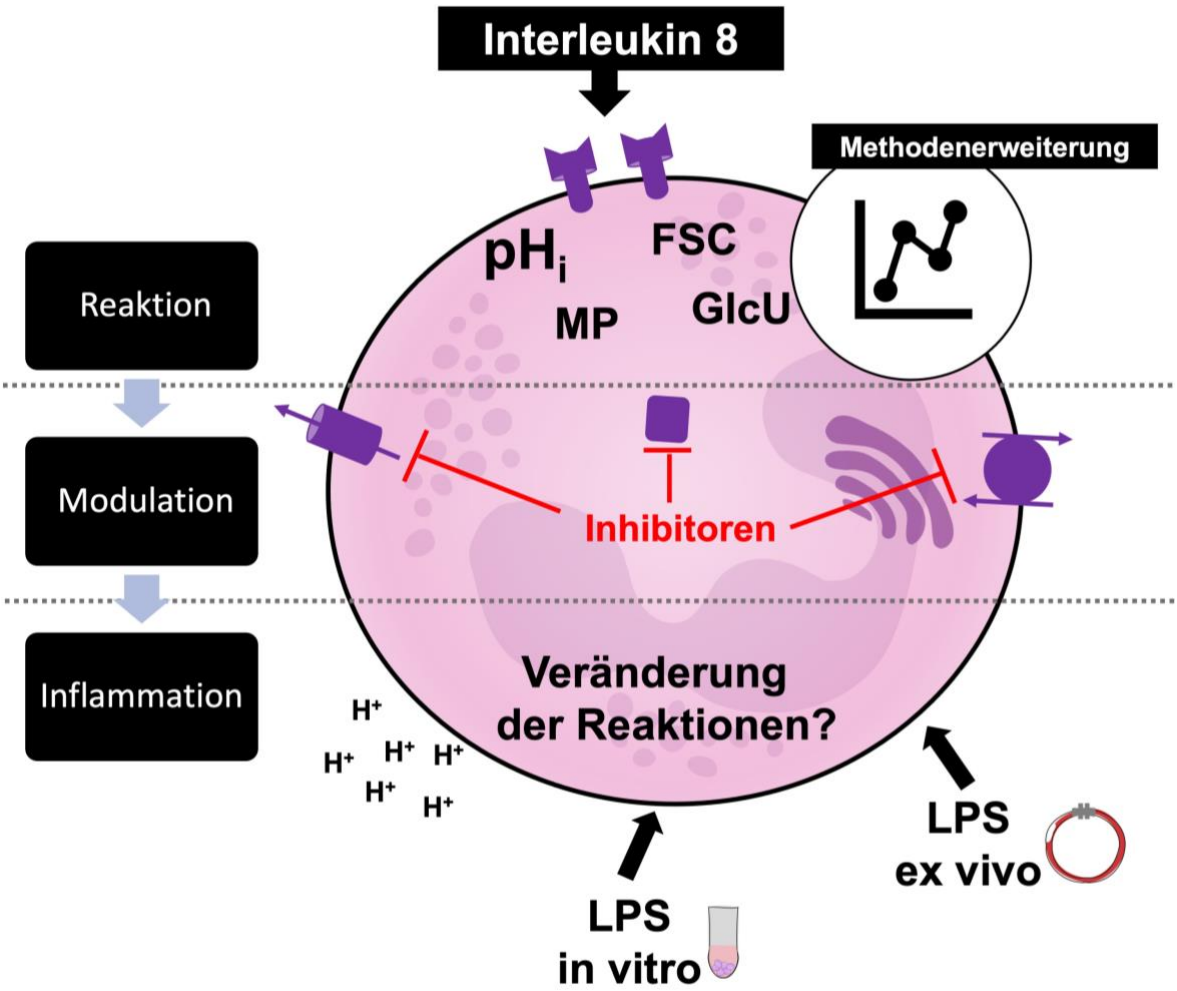

Abb. 2: Grafische Zusammenfassung des Arbeitsablaufs. Um die Hypothese zu untersuchen, erfolgte die Definition von vier Teilschritten. Der erste Schritt umfasste die Analyse der physiologischen Reaktionen neutrophiler Granulozyten auf eine Stimulation mit Interleukin 8. Dabei wurde zusätzlich versucht, die Auflösung durchflusszytometrischer Messungen zu verbessern. Diesen Abschnitten folgte die Untersuchung verschiedener Signalwege zur Modulation der beobachteten Reaktionen. Schließlich erfolgte die Betrachtung der Interleukin-8-vermittelten Reaktionen in einem inflammatorischen Umfeld. Dieses wurde simuliert durch eine Veränderung des extrazellulären pH-Werts und einer in-vitro und ex-vivo Exposition gegenüber LPS. pH_i = intrazellulärer pH, FSC = Forward Scatter, MP = Membranpotential, GlcU = Glukoseaufnahme, LPS = Lipopolysaccharid, H^+ = schematische Darstellung einer extrazellulären Azidose; Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Lösungen und Puffer

Name / Abkürzung	Hersteller / Firma
Aqua dest. (Ampuwa Spüllösung)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline + Ca^{2+} + Mg^{2+} ($DPBS^{+/+}$)	Gibco BRL, Grand Island NY, USA
Hank´s Balanced Salt Solution + Ca^{2+} + Mg^{2+} ($HBSS^{+/+}$)	Gibco BRL, Grand Island NY, USA
Natriumchlorid-Lösung 0,9%	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium GlutaMAX™, HEPES (RPMI)	Gibco BRL, Grand Island NY, USA

2.2. Fluoreszenzfarbstoffe

Name / Abkürzung	Hersteller / Firma
2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose (2NBDG)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
5-(and-6)-Carboxy SNARF™-1, Acetoxymethyl Ester, Acetate (SNARF)	Thermo Fisher Sientific, Rockford, USA
Bis(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (Dibac)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2′,7′-bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxyfluorescein (BCECF)	Abcam, Cambridge, England
Polybead Polystyrene Micropheres (10, 15, 20 µm) Größenbeads	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstraße, Deutschland

2.3. Stimulanzien

Name / Abkürzung	Hersteller / Firma
Human rekombinantes C5a	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Human rekombinantes IL-1β	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Human rekombinantes IL-6	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Human rekombinantes IL-8	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Human rekombinantes IL-10	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Human rekombinantes IL-13	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanin (fMLF)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lipopolysaccharid von E. coli 0111:B4 (LPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lipopolysaccharid-Bindeprotein (LBP)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

2.4. Chemikalien

Name / Abkürzung	Hersteller / Firma
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dextran from Leuconostoc spp.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ficoll-Plaque PLUS	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Heparin Natrium (25.000 I.E. / 5 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Nigericin	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
BD FACS lysing solution™	BD Biosciene, San Jose, USA

2.5. Antikörper

Name / Abkürzung	Hersteller / Firma / Chargennummer
PE-Cy7 anti-human CD181	BioLegend, San Diego, USA, #320620
FITC anti-human CD182	BioLegend, San Diego, USA, #320704

2.6. Hemmstoffe

Name / Abkürzung	Hersteller / Firma
1-[2-(4-Methoxyphenyl)-2-[3-(4-methoxyphenyl)propoxy]ethyl] imidazole (SKF-96365)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Cyano-3-(1-phenyl-1H-indol-3-yl)-2-propenoic acid (UK5099)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Deoxyglukose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
4-Cyanobenzo[b]thiophene-2-carbonyl)guanidine, methanesulfonate (NHE1-Inhibitor)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Amiloride hydrochloride hydrate (Amilorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calphostin C	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Dimethyloxalylglycine (DMOG)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Diphenyleneiodonium chloride (DPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kupfer	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride (W7)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Omeprazol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Suramin sodium salt (Suramin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Thapsigargin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zink	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.7. Geräte

Name / Abkürzung	Hersteller / Firma
Blutgasanalysegerät ABL 700 Series	Radiometer GmbH, Willich, Deutschland

Drehrad	Snijders Labs, Tilburg, Niederlande
Durchflusszytometer BD FACS Canto II	BD Bioscience, San Jose, USA
CASY Cell Counter & Analyzer	OLS OMNI Life Science, Bremen, Deutschland
Entris 323I-1S (Waage)	Sartorius Lab Instruments, Goettingen, Deutschland
Fluoroskan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Heracell 150i Inkubationsschrank	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Heraeus Multifuge 3 S-R Plus	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Mikroliterpipette Transferpette® (D10, D20, D100, D200, D1000)	Brand, Wertheim, Deutschland
Miniature Temperature Controller TC-124A	Warner Instruments, Hamden, USA
Mikroskop BI200	VWR International, Oud-Heverlee, Belgien
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm², 0,1 mm Tiefe)	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
pHenomenal® pH 1100L	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Pipettierhilfe (Pipetboy)	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
Wasserbad TW8	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland

2.8. Verbrauchsmaterial

Name / Abkürzung	**Hersteller / Firma**
BD FACS Clean	BD Bioscience, San Jose, USA

BD FACS Shutdown Solution	BD Bioscience, San Jose, USA
BD FACSFlow	BD Bioscience, San Jose, USA
CB Schlauch 1/4 x 1/16 x 185 cm	Medtronic, Meerbusch, Deutschland
CB Konnektor	Medtronic, Meerbusch, Deutschland
EasyLoad 200	Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Austria
FACS Tubes	Corning Science, Reynosa, Mexico
Falcon 15 mL konische Zentrifugenröhrchen	Corning Science, Reynosa, Mexico
Falcon 50 mL konische Zentrifugenröhrchen	Corning Science, Reynosa, Mexico
Kodan Tinktur forte	Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland
Safe-Lock Tubes 0,5 mL Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5 mL Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tubes 2,5 mL Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SafeSeal-Tips Professional Line Pipettenspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Safety-Multifly 21G tube 80 mm	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	Corning Incorporate, New York, USA
S-Monovette 9 ml	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
S-Monovette 9 ml 9NC	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
S-Monovette 9 ml LH	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland

2.9. Software

Name / Abkürzung	**Hersteller / Firma**
BD FACSDiva™ Version 6.12	BD Bioscience, San Jose, USA
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, San Diego, USA
Microsoft Excel 2019	Microsoft, Redmond, USA

R Version 3.6.2	R Core Team, Wien, Österreich

2.10. Isolation von neutrophilen Granulozyten

Die Isolation von humanen neutrophilen Granulozyten erfolgte aus Vollblut, welches durch periphere Venenpunktion von gesunden freiwilligen Spendern gewonnen wurde. Die Spender wurden entsprechend den Anforderungen der Ethikkommission der Universität Ulm (Ethiknummer: 459/18, 94/14) über das Projekt und die damit verbundene Blutentnahme aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung vor der Blutentnahme. Für die Entnahme wurden Natriumcitrat-antikoagulierte Monovetten (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) verwendet.

Zuerst wurde das Blut 1:1 mit NaCl 0,9% vermengt, danach wurden je 20 ml Blut über 10 ml Ficoll geschichtet. Durch einen folgenden Zentrifugationsschritt bei 340 g, Raumtemperatur und für 30 min wurden die Blutzellen nach ihrer Dichte getrennt. Monozyten und Lymphozyten wurden zusammen mit dem Blutplasma abgenommen. Das Pelett, bestehend aus Erythrozyten und Neutrophilen, wurde in einer 1%igen Dextranlösung resuspendiert, in welcher die Erythrozyten schneller sedimentierten als die Neutrophilen. Nach 30 min wurde der Überstand abgenommen und mit 340g bei Raumtemperatur 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pelett wurde dreimal in 10 ml destilliertem Wasser resuspendiert, um die restlichen Erythrozyten osmotisch zu lysieren. Durch Zugabe von 5 ml NaCl 2,7% wurde wieder ein isoosmolares Milieu hergestellt. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt befanden sich die neutrophilen Granulozyten im Pelett, welche abhängig vom Versuchsaufbau initial in einem Milliliter $DPBS^{+/+}$, $HBSS^{+/+}$ oder RPMI resuspendiert wurden. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer, um die Zellen auf die gewünschte Konzentration von 2×10^6 Zellen / ml einzustellen.

2.11. Isolation von Leukozyten

Die Isolation der Leukozyten erfolgte analog zu der Isolation neutrophiler Granulozyten, jedoch ohne initiale Dichtezentrifugation, um eine Trennung der Lymphozyten und Monozyten von den Granulozyten zu verhindern. 15 ml des

entnommenen humanen Vollbluts wurden 1:1 mit NaCl 0,9% vermengt und in einer einprozentigen Dextranlösung für 30 min inkubiert. Der leukozytenreiche Überstand wurde abgenommen und für 5 min mit 340g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die im Pellet verbliebenen Erythrozyten wurden osmotisch lysiert durch die Zugabe von 10 ml destilliertem Wasser. Der Prozess der Lyse wurde durch Zugabe von 5 ml NaCl 2,7% gestoppt. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation mit 340 g und Raumtemperatur wurden die Leukozyten auf eine Zellzahl von 2 x 10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt und in $DPBS^{+/+}$, $HBSS^{+/+}$ oder RPMI resuspendiert.

2.12. Stimulation neutrophiler Granulozyten

In RPMI resuspendierte neutrophile Granulozyten wurden zeitabhängig mit IL-8 (0,05 – 500 ng / ml, wenn nicht anders angegeben 50 ng / ml), fMLF (10 µM), C5a (100 ng / ml), IL-1b (500 pg / ml), IL-6 (2 ng / ml), IL-10 (500 pg / ml), IL-13 (10 ng / ml) inkubiert, um stimulationsabhängige physiologische Effekte zu bestimmen. Wenn nicht anders gekennzeichnet, befanden sich die Zellen immer in Medien, deren pH auf einen Wert von7,3 – 7,4 durch Zugabe von NaOH oder HCl eingestellt wurde. Alle verwendeten Medien wurden wenige Minuten vor Gebrauch hinsichtlich ihres pH-Wertes kontrolliert.

2.13. Hemmung von Ionentransportproteinen / -kanälen und intrazellulären Signalmolekülen

Zur Identifizierung möglicher an den IL-8-induzierten Effekten beteiligter Ionentransportproteine / -kanäle und intrazellulärer Signalmoleküle wurden die neutrophilen Granulozyten vor der Stimulation mit zahlreichen Hemmstoffen inkubiert (Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht über die in der Arbeit eingesetzten Hemmstoffe. ENaC = epithelialer Natriumkanal; HIF-1α = Hypoxie-induzierter Faktor 1α; NHE1-Inhibitor = Natrium Protonen Austauscher 1 Inhibitor; TRPC6 = Transienter Rezeptorpotential-Kationenkanal, Unterfamilie C, Mitglied 6; ER = Endoplasmatisches Retikulum

Hemmstoff	*Blockade von*	*Kozentration*	*Inkubationszeit*
2-Deoxyglukose	Hexokinase	2 mM	30 min
Amilorid	ENaC, T-Typ Ca^{2+}-Kanäle	200 µM	10 min

Calphostin C	Proteinkinase C	50 nM	30 min
DMOG	HIF-1α-Stabilisator	1 mM	30 min
DPI	Flavoenzyme, NADPH-Oxidase	100 µM	30 min
NHE1-Inhibitor	Na^+/H^+-Austaucher 1	5 µM	5 min
NPPB	Cl^--Kanäle, intrazelluläres ATP	100 µM	10 min
Kupfer	Aquaporine	1 mM	10 min
Omeprazol	H^+/K^+-ATPase	10 µM	30 min
SKF-96365	rezeptor- und spannungs-abhängige Ca^{2+}-Aufnahme, TRPC6	50 µM	30 min
Suramin	P2Y Purinrezeptoren	200 µM	30 min
Thapsigargin	Ca^{2+}-Wiederaufnahme ins ER	2 µM	30 min
UK5099	mitochondrialer Pyruvattransporter	400 µM	30 min
W7	Calmodulin	40 µM	30 min
Zink	spannungsabhängige Protonenkanäle	50 µM	30 min

2.14. Durchflusszytometrie und Zellgrößenbestimmung

Die Durchflusszytometrie beschreibt ein automatisiertes Verfahren zur Analyse tausender Zellen innerhalb von Sekunden anhand morphologischer und/oder fluoreszenzbasierter Parameter. In Suspension befindliche Zellen werden in einem Hüllstrom fokussiert und dabei einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Durch die Passage der Zellen kommt es einerseits zu einer Beugung des Lichts, andererseits kann der Laser fluoreszenzmarkierte Stoffe dazu anregen, selbst Licht einer bestimmten Wellenlänge zu emittieren. Die Analyse beruht auf der Detektion der Emissionen. Das verwendete BD FACSCanto™ II verfügt über einen blauen Laser (488 nm) und einen roten Laser (635 nm). Gemessen wurden als Näherungswert für die Zellgröße das Vorwärtsstreulicht (FSC) und für den Grad der

Granulierung das Seitwärtsstreulicht (SSC). Zusätzlich erfolgte die Messung verschiedener Parameter mittels fluoreszenzmarktierter Stoffe in den Kanälen des blauen Lasers FITC, PE und PerCP. Die gemeinsame Auswertung von FSC und SSC erlaubte die Analyse der jeweils gewünschten Zellpopulation. Diese Analyse ist für Neutrophile beispielhaft in Abbildung 3 dargestellt. Pro Messung wurden jeweils 5.000 – 10.000 Zellen untersucht. Zur Verifizierung im FSC gemessener Veränderungen der Neutrophilengröße erfolgte eine Coulter-Zähler-Messung. Dabei wurden isolierte, in RPMI resuspendierte Neutrophile 10 min bei 37°C mit 50 ng / ml IL-8 stimuliert und anschließend 1:500 mit RPMI verdünnt und gemessen. Das Messprinzip des Coulter-Zählers beruht auf Veränderungen der elektrischen Leitfähigkeit, aus denen die Parameter Zellvolumen und Zellgröße abgeleitet werden können.

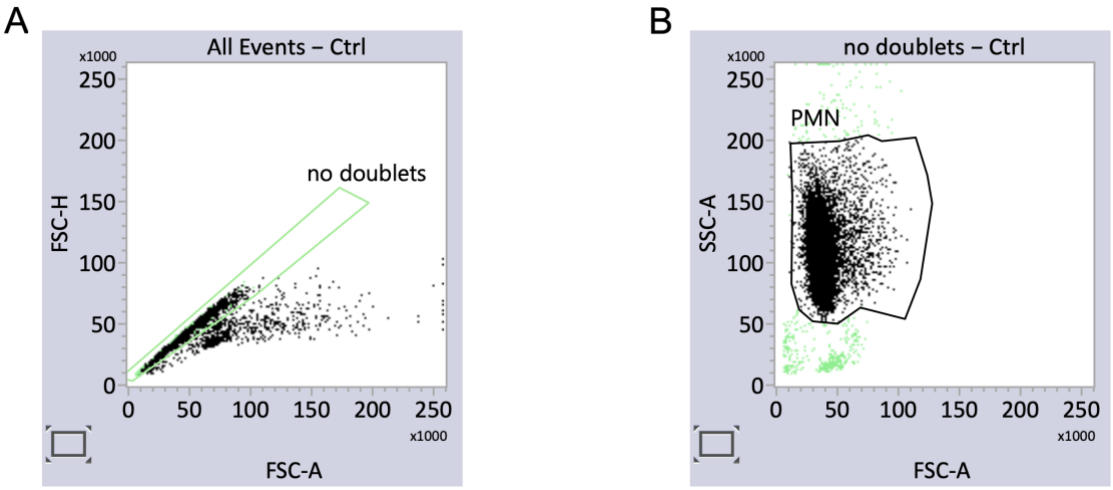

Abb. 3: Gating-Strategie zur Identifizierung neutrophiler Granulozyten in der Durchflusszytometrie. (A) Zuerst erfolgte die Elimination von Dubletten durch die Auswertung der Linearität von FSC-H und FSC-A. (B) Danach erfolgte die Identifizierung der Neutrophilen anhand ihrer Eigenschaften in SSC-A und FSC-A. Es handelt sich um die Streudiagramme eines repräsentativen Spenders ohne Stimulation. FSC-A = Forward Scatter Area; FSC-H = Forward Scatter Height; SSC-A = Side Scatter Area. Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

2.15. Messung des intrazellulären pH-Werts

Die Bestimmung des intrazellulären pH-Werts erfolgte mittels des Fluorezenzfarbstoffs SNARF. In $HBSS^{+/+}$ resuspendierte Zellen wurden 20 min bei 37°C mit 1 µM SNARF im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein

Zentrifugationsschritt für 5 min mit 340 g bei Raumtemperatur. Das Zellpelett wurde in RPMI resuspendiert, gefolgt von einer 10-minütigen Ruhephase im Wasserbad bei 37°C, bevor die Stimulation begann. Das im intrazellulären angereicherte Fluorochrom war nun in der Lage, an seinen freien Carboxygruppen selektiv H^+-Ionen zu binden. Da die protonierte Form ein anderes Emissionsspektrum als die deprotonierte Form besitzt, konnte man über das Verhältnis der detektierten Emissionen in PE und PerCP den intrazellulären pH-Wert bestimmen. Die Zuordnung des Quotienten zu einem definierten pH-Wert erfolgte mittels einer Eichkurve. Für die Eichkurve wurden die Zellen analog mit SNARF gefärbt. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in RPMI mit verschiedenen pH-Werten (5,6; 6,2; 6,8; 7,4; 8,0; 8,6) resuspendiert und mit Nigericin in einer Konzentration von 10 µg / ml für 30 min inkubiert. Bei Nigericin handelt es sich um ein Ionophor, welches K^+-Ionen und H^+-Ionen zwischen intra- und extrazellulärem Milleu austauscht.

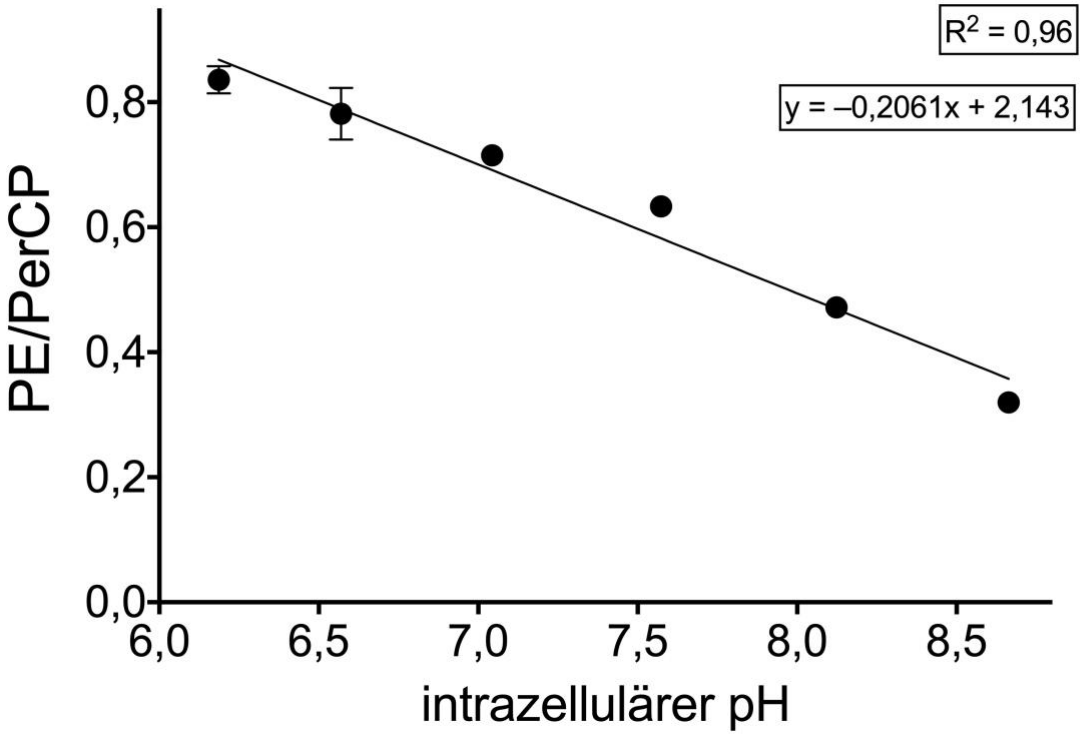

Abb. 4: Eichkurve für die Bestimmung des intrazellulären pH-Werts aus dem Quotienten der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Proben bei 575 nm (PE) und 695 nm (PerCP). Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung mit n = 3; R^2 = Bestimmtheitsmaß

Durch den Austausch der H^+-Ionen kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulär, was eine Angleichung des intrazellulären an den extrazellulären pH-Wert zur Folge hat. Nach der durchflusszytometrischen Messung Eichkurvenproben wurde erneut der extrazelluläre pH-Wert in den Proben gemessen und als Referenz für die Auswertung der Eichkurve verwendet (Abb. 4).

2.16. Messung des Membranpotentials

Zur Bestimmung des Membranpotentials wurden in $HBSS^{+/+}$ gelöste Zellen 30 min lang mit mit 50 nM Dibac bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach anschließender 5-minütiger Zentrifugation mit 340g bei Raumtemperatur wurden die Zellen in RPMI resuspendiert und nochmals für 10 min mit 50 nM Dibac bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Der anionische Farbstoff bildet ein Gleichgewicht zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Millieu. Wird nun das Membranpotential positiver (Depolarisation) wird der Farbstoff durch den neu entstandenen Ladungsunterschied in das intrazelluläre Milleu verlagert. Dies zeigt sich durchflusszytometrisch durch eine Zunahme der Fluoreszenz im FITC-Kanal. Vorversuche zeigten, dass die Dibac Fluoreszenz innerhalb der ersten Stunde kontinuierlich linear abnahm. Zur besseren Interpretation der mit Dibac gemeseenen Ergebnisse erfolgte innerhalb der ersten 10 min eine nachträgliche mathematische Korrektur der Fluoreszenzabnahme. Es wurde dabei das Vorgehen von Stratmann et al. angewendet [114]. In der vorliegenden Arbeit wurde das Membranpotential relativ zu einer unstimulierten Kontrolle ausgewertet.

2.17. Messung der Glukoseaufnahme

Die Glukoseaufnahme wurde mittels des FITC-markiertem Farbstoff 2NBDG gemessen. In RPMI gelöste Zellen wurden 10 min lang mit 30 µM 2NBDG inkubiert. Die stimulationsbedingte Steigerung der Glukoseaufnahme wurde relativ zu unstimulierten Zellen analysiert.

2.18. Chemotaxis

Für die Analyse des Migrationsverhalten der Zellen wurden die Neutrophilen in $HBSS^{+/+}$ + 0,1% bovinem Serumalbumin gelöst. Für 30 min bei 37°C wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF-AM (1,6 µg / ml) und einer Auswahl, der in Tabelle 1 aufgelisteten Hemmstoffe inkubiert. Einer 5-minütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur und 340g folgte die Resuspension der Zellen in $HBSS^{+/+}$ + 0,1% bovinem Serumalbumin unter erneuter Zugabe des zugehörigen Hemmstoffes. Die Zelllösungen wurden auf eine Seite einer Mikrotiterplatte gegeben, auf der anderen Seite befanden sich als Lockstoffe entweder IL-8 oder, als Kontrollsubstanz, $DPBS^{+/+}$. Getrennt wurden beide Seiten durch eine Polycarbonatmembran mit 3 µm großen Poren. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C im Inkubator wurden die migrierten Neutrophilen, die sich in den Poren der Membran befanden, gemessen. Dabei wurde der Anstieg der BCECF-Fluoreszenz in Relation zu einer unstimulierten Kontrolle bei einer Wellenlänge von 485/538 nm mittels des Fluorometers (Fluoroskan Ascent) gemessen.

2.19. Veränderung des extrazellulären pH-Werts

Um den Einfluss eines veränderten extrazellulären pH-Werts auf den intrazellulären pH-Wert neutrophiler Granulozyten zu untersuchen, wurden extrazelluläre Azidosen und Alkalosen simuliert. RPMI wurde mittels HCl 1% oder NaOH 1% auf die pH-Werte 6,6, 7,0, 7,4 und 7,8 eingestellt. Die Neutrophilen wurden mit SNARF gefärbt (siehe Punkt 2.15., S. 19 dieser Arbeit) und anschließend für 10 min in den veränderten Medien inkubiert, bevor sie stimuliert und gemessen wurden.

2.20. Vorinkubationsexperimente

In $HBSS^{+/+}$ resuspendierte neutrophile Granulozyten wurden für 1 h bei 37°C im Wasserbad mit fMLF (10 µM), IL-8 (50 ng / ml), LPS (100 ng / ml) oder LPS (100 ng / ml) + LBP (2 ng / ml) stimuliert. Für die Messung des intrazellulären pH-Werts wurde nach 40 min der Vorstimulation parallel die Färbung mit SNARF begonnen. Nach einer Stunde wurden die Zellen bei 340g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert und anschließend in RPMI und der zuvor hinzugefügten Substanz resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Ruhephase bei 37°C im Wasserbad

wurden die Zellen erneut mit IL-8 (50 ng / ml) oder fMLP (10 µM) stimuliert und gemessen.

2.21. Ex-vivo-Vollblutmodell

Der Versuchsablauf des Ex-vivo-Vollblutmodells erfolgte wie durch die Arbeitsgruppe bereits beschrieben [78]. Für das Ex-vivo-Vollblutmodell erfolgte eine Blutabnahme in eine Serum-Monovette, in welcher Heparin in einer Konzentration von 0,5 I.U. / ml und als Stimulanz entweder LPS (Endkonzentration: 100 ng / ml) oder $DPBS^{+/+}$ vorgelegt wurden. Das Blut wurde anschließend in ein Heparin-beschichtetes Schlauchsystem überführt und zu einem Ring geschlossen. Die Ringe wurden auf ein Drehrad gespannt und rotierten mit einer Geschwindigkeit von 5 rpm bei 37°C in einem Inkubator. Eine Luftblase von 1,5 ml Volumen in dem beschriebenem Schlauchsystem sorgte dabei für einen kontinuierlichen Blutfluss.

Tab. 2: Zusammenstellung physiologischer und laborchemischer Parameter des Vollblutmodells ohne Kontakt zum Schlauchsystem (Ctrl 0 min) und nach 60 min Inkubation mit $DPBS^{+/+}$ (Ctrl 60 min) oder LPS 100 ng / ml (LPS 60 min). Ctrl = Kontrolle; LPS = Lipopolysaccharid. Übersetzt und modifiziert nach Messerer et al. [78], Erstveröffentlichung in Frontiers in Immunology. CCBY4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Parameter	Ctrl 0 min	Ctrl 60 min	LPS 60 min
Leukozyten [G/l]	5,0 ± 0,66	4,9 ± 0,52	4,9 ± 0,47
Erythrozyten [T/l]	4,5 ± 0,36	4,5 ± 0,33	4,5 ± 0,33
Hämoglobin [g/dl]	15,8 ± 1,4	16,0 ± 1,5	14,7 ± 4,6
Thrombozyten [T/l]	159 ± 52	161 ± 63	169 ± 73
Natrium [mmol/l]	144 ± 1,7	144 ± 1,3	145 ± 4,1
Kalium [mmol/l]	3,8 ± 0,31	3,4 ± 0,20	3,4 ± 0,30
Calcium [mmol/l]	0,84 ± 0,05	0,82 ± 0,04	0,82 ± 0,08
Glukose [mmol/l]	5,1 ± 0,58	4,4 ± 0,52	4,2 ± 0,55
Laktat [mmol/l]	1,3 ± 0,24	2,7 ± 0,30	3,0 ± 0,28
pH-Wert	7,4 ± 0,02	7,4 ± 0,02	7,3 ± 0,02
pO_2 [mmHg]	22,8 ± 3,1	38,9 ± 7,6	42,3 ± 9,2
pCO_2 [mmHg]	45,2 ± 4,2	42,5 ± 3,1	43,9 ± 3,1
HCO_3^- [mmHg]	23,2 ± 1,4	21,9 ± 1,6	21,7 ± 1,4

Die Analyse des Blutes und der darin enthaltenen Zellen erfolgte einerseits direkt, d.h. ohne Kontakt des Blutes zum Schlauchsystem (Messzeitpunkt 0 min) und andererseits nach 60-minütiger Inkubation des Blutes im Schlauchsystem (Messzeitpunkt 60 min). Zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurde das Blut in eine

Natrium-Citrat antikoagulierte Monovette überführt und aus dem Blut wurden Neutrophile isoliert (siehe Punkt 2.10., S. 15 dieser Arbeit). Zur Überprüfung der Stabilität des Systems erfolgten zusätzlich Messungen der Elektrolyte, der Glukose- und Laktat-Konzentrationen und des pH-Wertes im Blut, mittels Blutgasanalyse. Ebenso wurde zu jedem Messzeitpunkt ein Blutbild erhoben (Tab. 2). An den Zellen wurde durchflusszytometrisch der FSC und der intrazelluläre pH-Wert gemessen (siehe Punkte 2.14. und 2.15., S. 17 – 19). Zusätzlich wurden Antikörpermessungen vorgenommen. Die Neutrophilen wurden entweder mit einem Antikörper gegen CD181 (PE-Cy7, Verdünnung 1:10) oder gegen CD182 (FITC, Verdünnung 1:625) für 15 min, bei RT und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 950 µl 1x FACS Lysing Solution^{TM} für weitere 30 min bei RT und im Dunkeln zu den Proben gegeben, um die Zellen zu fixieren und die Erythrozyten zu lysieren. Nach einem Zentrifugationsschritt mit 340g bei Raumtemperatur für 5 min, wurde der Überstand der Proben entnommen und die Zellen in DPBS$^{+/+}$ resuspendiert und mittels Durchflusszytometer gemessen.

2.22. Sekundengenaue durchflusszytometrische Messungen

Zur sekundengenauen Messung der Reaktionen Neutrophiler erfolgte eine initiale Messung von 10.000 Zellen vor der Stimulation, um Basiswerte zu generieren. Der Stimulation mit IL-8 (50 ng / ml) folgte eine durchgehende 5-minütige durchflusszytometrische Messung. Die Daten wurden mittels eines nicht gewichteten gleitenden Durchschnitts ausgewertet, mit einer Zeitspanne von 1s und einer durchschnittlichen Anzahl gemesserner Neutrophiler von 3019 ± 498 / s. Um die Umgebungsbedingungen während der Messreihe so stabil wie möglich zu halten, wurde ein Temperaturregler (Miniature Temperature Controller TC-124A, Warner Instruments, Hamden, USA) für FACS Röhrchen, mit einer Einstellung auf 37°C, verwendet. Beispielhaft wurde für die Beschreibung der Kinetik die Zeit berechnet bis zum Erreichen des halbmaximalen Effekts, sowie als Surrogatmarker für den maximalen Effekt die Fläche unter der Kurve (AUC). Die AUC beschreibt dabei die Fläche unter der jeweiligen Kurve bezogen auf eine Horizontale, die durch den Mittelwert der Basiswertmessung erhoben wurde. Die Vorinkubation mit LPS für die kontinuierliche durchflusszytometrische Messung erfolgte analog zum oben beschriebenen Vorgehen (siehe Punkt 2.20., S. 22).

2.23. Ethikvotum

Die Versuche mit dem Blut freiwilliger und gesunder Erwachsener fanden nach dem Ethikvotum 94/14 und 459/18 der Ethikkommission der Universität Ulm statt. Nachdem diese Personen informiert und aufgeklärt worden waren und diese ihre schriftliche Einwilligung gegeben hatten, erfolgte die peripherven öse Blutabnahme. Ausschlusskriterien für die Blutabnahme waren bekannte Grunderkrankungen, Einnahme von Dauermedikation oder akute Krankheitssymptome.

2.24. Statistik

Die Daten wurden mittels Microsoft Excel, der Programmiersprache R und GraphPad Prism 9 ausgewertet. „Ausreißer“ wurden mit dem Z-Score (>3 Standardabweichungen) indentifizert und aussortiert. Die Daten wurden als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Aufgrund der Fallzahl und aufgrund eines konservativen Testansatzes wurde bei den statistischen Tests von einer nicht-parametrischen Verteilung ausgegangen. Daher wurde für den Vergleich zweier Gruppen der Mann-Whitney Test und der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Wilcoxon Signed Rank Test) verwendet. Für multiples Testen wurde eine Varianzanalyse (One-way ANOVA) gefolgt von einem Dunn’s Test verwendet. Die Signifikanzniveaus $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ wurden mittels *, **, bzw. ***, dargestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1. IL-8-induzierte Leukozytenantwort im Vergleich zu anderen Stimulanzien

Mit IL-8 (50 ng / ml) stimulierte Neutrophile zeigten eine nachfolgend definierte Abfolge bestimmter zellulärer Reaktionen. Für die Zellgröße und die Zellgranularität wurden als Näherungsparameter die Werte des durchflusszytometrisch bestimmten FSC bzw. SSC herangezogen.

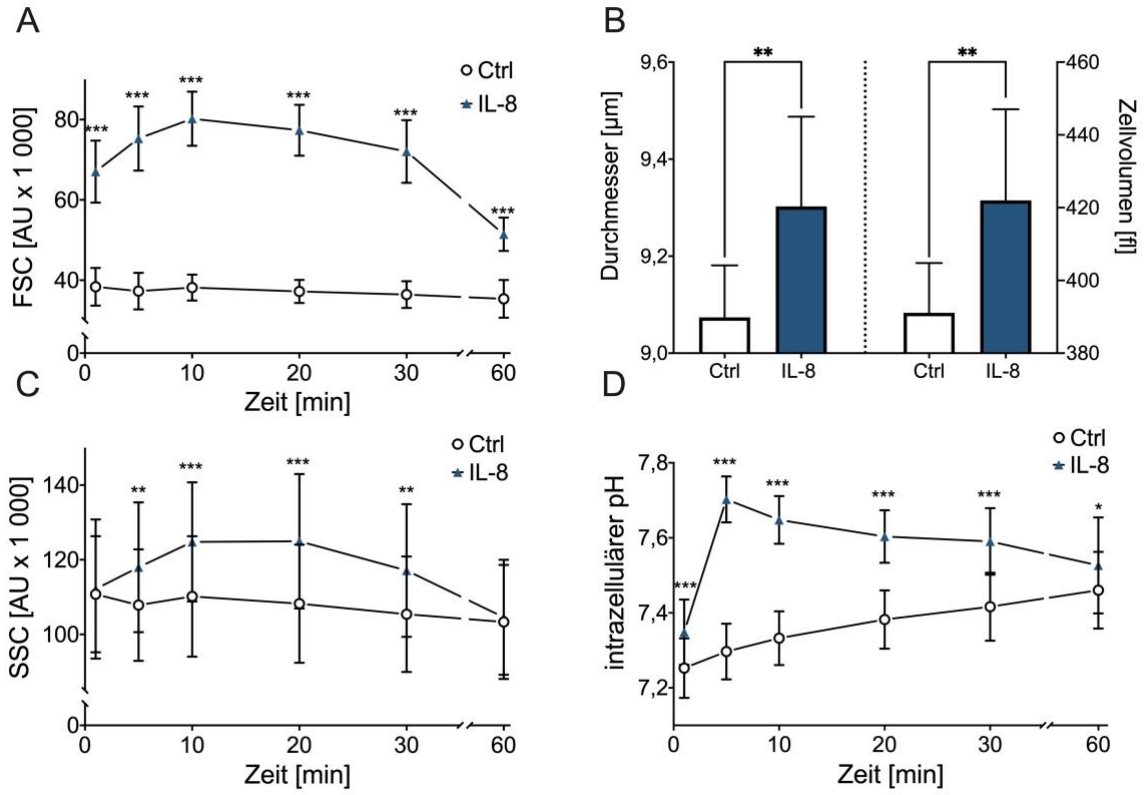

Abb. 5: Einfluss von Interleukin 8 (IL-8, 50 ng / ml) auf die Neutrophilenphysiologie während einer Messperiode von 1 h. (A) IL-8 induzierte Zunahme der Zellgröße, gemessen durch den FSC; n = 31 − 42; ***, $p < 0{,}001$ im Vergleich mit der korrespondierenden Kontrolle (Mann-Whitney Test). (B) Volumen- und Durchmesserzunahme Neutrophiler nach Stimulation mit IL-8 (50 ng / ml), gemessen mittels Coulter-Zähler; n = 8; **, $p < 0{,}01$ im Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle (Mann-Whitney Test). (C) Veränderung der Neutrophilen-Granularität nach Stimulation mit IL-8 (50 ng / ml); n = 31 − 42; **, $p < 0{,}01$; ***, $p < 0{,}001$ im Vergleich mit der korrespondierenden Kontrolle (Mann-Whitney Test). (D) IL-8 (50 ng / ml) vermittelter Anstieg des intrazellulären pH-Werts; n = 31 − 42; *, $p < 0{,}05$; ***, $p < 0{,}001$ im Vergleich mit der korrespondierenden Kontrolle (Mann-Whitney Test). Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. AU = Arbitary Units; FSC = Forward Scatter; SSC = Side Scatter; Ctrl = Kontrolle; Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Als Reaktion auf die Stimulation zeigten die Neutrophilen einen schnellen Anstieg des FSC, mit einem Maximum von 107% ± 11% nach 10 min (Abb. 5 A). Zur Validierung der im FSC gemessenen Werte erfolgte eine Messung mittels Coulter Zähler. Es zeigten sich eine signifkante Erhöhung des Zellvolumens um 7,1% sowie der Zellgröße um 2,4% (Abb. 5 B). Die Veränderung der Granularität erfolgte langsamer, erzielte jedoch einen maximalen Anstieg um 16% ± 3% nach 20-minütiger Stimulation (Abb. 5 C). Des Weiteren erzeugte die Stimulation eine intrazelluläre Alkalinisierung mit einem Maximum von +0,40 ± 0,05 nach 5 min (Abb. 5 D). Alle drei Reaktionen gingen nach einstündiger Inkubation annähernd auf das Kontrollniveau zurück. Abb. 6 illustriert die für den FSC und den intrazellulären pH-Wert (pH_i) feststellbare Konzentrationsabhängigkeit mit einer mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) von 11,5 ng / ml für den FSC und 9,2 ng / ml für den pH_i.

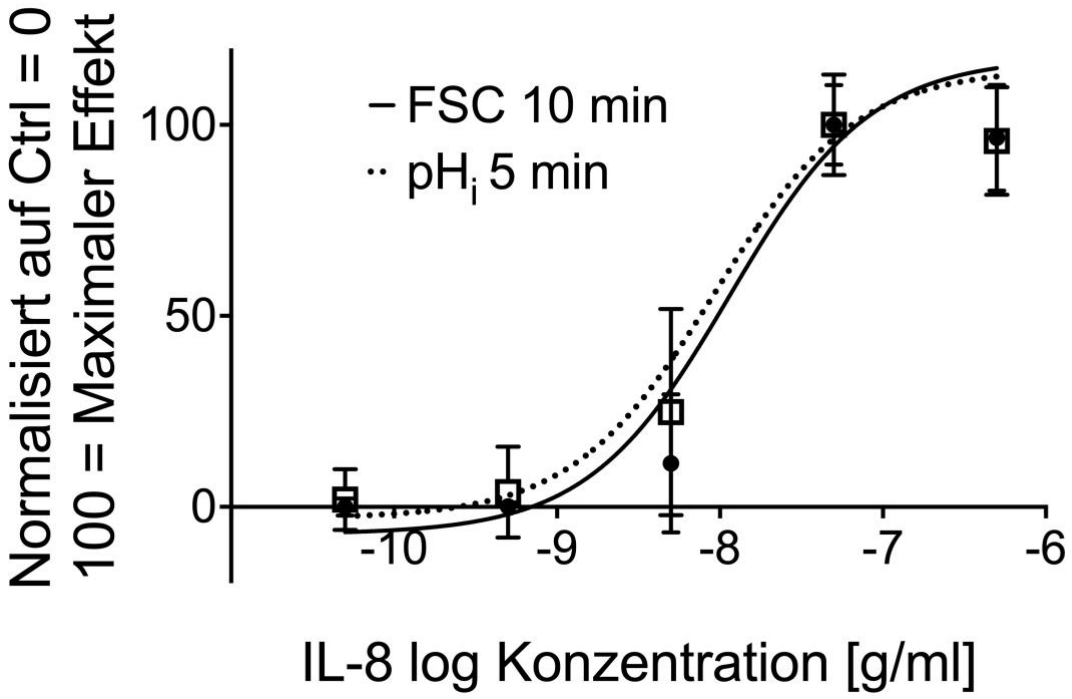

Abb. 6: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Zunahme der Zellgröße (FSC) nach 10 min und des intrazellulären pH (pH_i) nach 5 min Stimulation mit IL-8 (0,05 – 500 ng / ml); n = 6 − 42. Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. FSC = Forward Scatter; pH_i = intrazellulärer pH; Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Als schnellste Antwort auf die Stimulation mit IL-8 konnte die Depolarisation des Membranpotentials ermittelt werden. Der Höchstwert von +3,8 mV ± 1,6 mV wurde bereits nach 1 min erreicht. Neben den physiologischen Veränderungen ließen sich auch Veränderungen im Glukosestoffwechsel als Folge der Stimulation

nachweisen. Die Glukoseaufnahme stieg nach 10 min auf ein Maximum von +97% ± 47% (Tab. 3).

Tab. 3: Zusammenstellung der Maximalwerte für jeden gemessenen Parameter. Die Werte wurden gesammelt und nach Geschlecht getrennt betrachtet. Für den intrazellulären pH-Wert und die Zellgröße wurden die EC50-Werte berechnet. Alle Daten sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. MP = Membranpotential; pH_i = intrazellulärer pH; GlcU = Glukoseaufnahme; FSC = Forward Scatter; SSC = Side Scatter; PMN = polymorphkernige Granulozyten; EC50 = mittlere effektive Konzentration; n.d. = not determined (Daten nicht erhoben). Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Parameter	max. Effekt nach	EC_{50} Werte [ng/ml] (95% CI)	PMN n=31-42	PMN ♀ n=7-12	PMN ♂ n=19-30
MP [mV]	1 min	n.d.	3,8 ± 1,6	3,6 ± 1,3	3,9 ± 1,7
pH_i	5 min	9,2 (5,8-14,3)	0,40 ± 0,05	0,39 ± 0,06	0,40 ± 0,05
GlcU [%]	10 min	n.d.	97 ± 47	99 ± 24	96 ± 53
FSC [%]	10 min	11,5 (7,8-16,4)	107 ± 11	107 ± 13	108 ± 10
SSC [%]	20 min	n.d.	16 ± 3	17 ± 1	15 ± 3

Tab. 3. zeigt eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse. Des Weiteren wurde untersucht, ob es einen geschlechtsabhängigen Effekt bei der Ausprägung der Reaktionen gibt. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern (Tab. 3).

Im nächsten Experiment wurden die IL-8-induzierten Effekte mit den Reaktionen auf andere Chemotaxine, Interleukine und dem PAMP LPS verglichen.

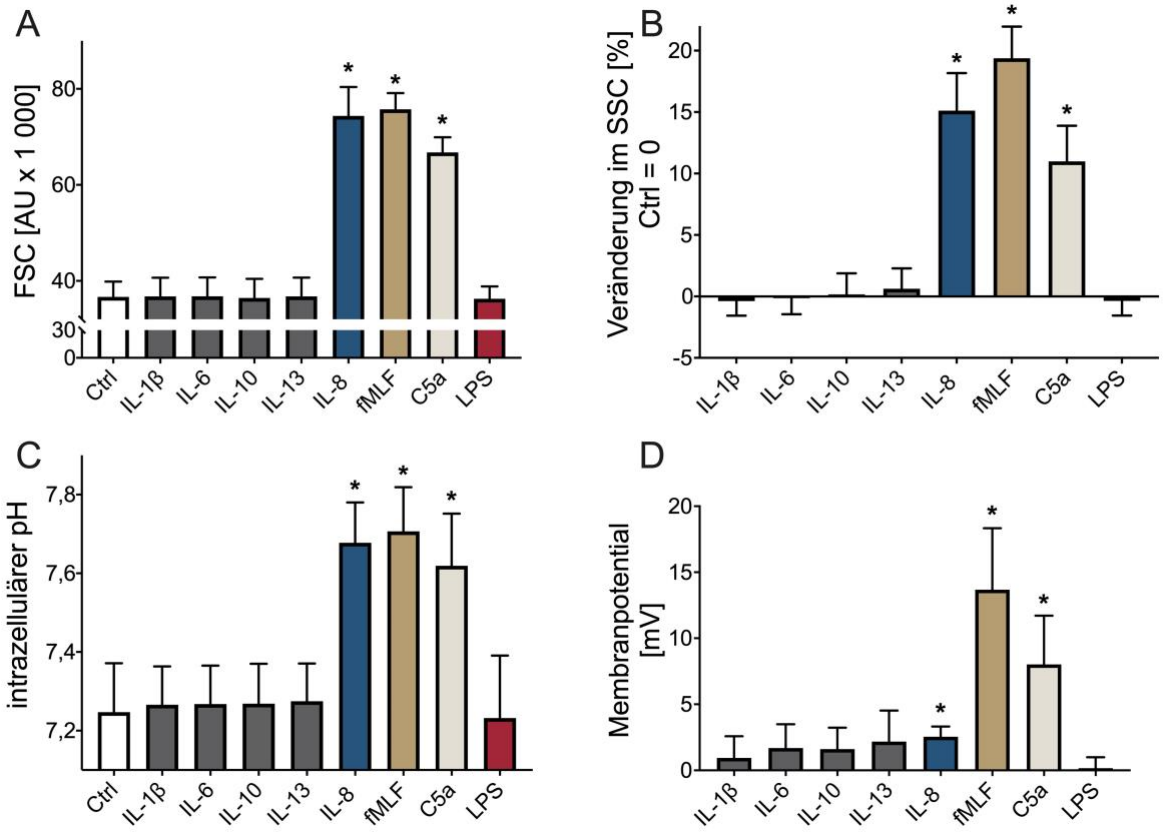

Abb. 7: Vergleich der IL-8 induzierten Effekte auf die Neutrophilenphysiologie mit anderen Interleukinen, Chemotaxinen und LPS. Die Neutrophilen wurden mit IL-1β (500 pg / ml), IL-6 (2 ng / ml), IL-10 (500 pg / ml), IL-13 (10 ng / ml), IL-8 (50 ng / ml), fMLF (10 µM), C5a (100 ng / ml) oder LPS (100 ng / ml) stimuliert. (A) Effekt der verschiedenen Moleküle 10 min nach Stimulation auf die Zellgröße; n = 6 − 12; *, $p < 0,05$ Vergleich gegen Ctrl; (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). (B) Neutrophilengranularität 20 min nach Stimulation; n = 6 − 12; *, $p < 0,05$ Vergleich gegen 0; (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). (C) Veränderung des intrazellulären pH-Werts 5 min nach Stimulation; n = 6 − 12; *, $p < 0,05$ Vergleich gegen Ctrl; (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). (D) Vergleich der Effekte verschiedener Stimulanzien, 1 min nach Zugabe, auf das Membranpotential; n = 6 − 12; *, $p < 0,05$ Vergleich gegen 0; (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. FSC = Forward Scatter; SSC = Side Scatter, Ctrl = Kontrolle, C5a = Komplementfaktor 5a, fMLF = N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin, LPS = Lipopolysaccharid. Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Im Vergleich mit den Chemotaxinen C5a und fMLF löste IL-8 ähnliche Reaktionen in vergleichbarem Umfang aus (Abb. 7 A - C). Ausgenommen war dabei der Effekt auf das Membranpotential. Die IL-8 induzierte Depolarisation stellte sich als deutlich geringer dar, im Gegensatz zu den Auswirkungen von fMLF und C5a auf das

Membranpotential (Abb. 7 D). Eine Stimulation mit den weiteren getesteten Interleukinen und LPS verursachte in keinem der gemessenen Parameter eine signifikante Reaktion (Abb. 7 A - D)

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Chemotaxine IL-8, fMLF und C5a auch bei Monozyten eine Änderung der physiologischen Antwort erzeugen.

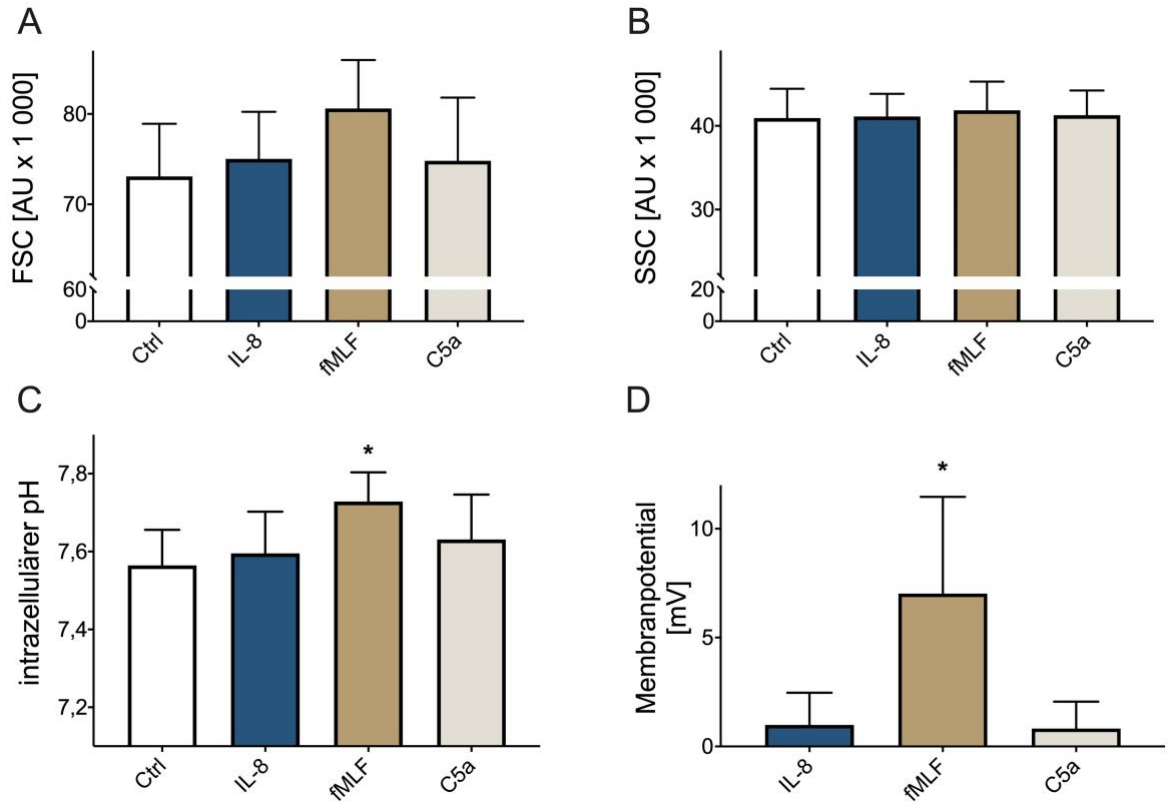

Abb. 8: Veränderung der Monozytenphysiologie durch Stimulation mit IL-8 (50 ng / ml), fMLF (10 µM) und C5a (100 ng / ml). (A) Veränderung der Zellgröße, gemessen anhand des FSC, 10 min nach Stimulation; n = 6. (B) Einfluss der verschiedenen Stimulanzien auf die Granularität der Monozyten, gemessen 20 min nach Stimulation; n = 6. (C) Zunahme des intrazellulären pH-Werts (pH_i), 5 min nach Stimulation; n = 6; *, $p < 0,05$ Vergleich mit der Ctrl; (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). (D) Einfluss der oben genannten Stimulanzien auf das Membranpotential 1 min nach Stimulation; n = 6; *, $p < 0,05$ Vergleich gegen 0; (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. FSC = Forward Scatter; SSC = Side Scatter, Ctrl = Kontrolle, C5a = Komplementfaktor 5a. fMLF = N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin.

Nur die Stimulation mit fMLF löste einen Effekt bei Monozyten aus, und zwar in Form einer mäßigen, aber signifikanten intrazellulären Alkalinisierung und einer Depolarisation des Membranpotentials (Abb. 8 C + D). IL-8 und C5a konnten keine Reaktionen bei den Monozyten auslösen. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Effekt von fMLF auf die Zellgröße und Granularität von Monozyten (Abb. 8 A - D).

3.2. Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf die IL-8-induzierte Neutrophilenantwort

Im Folgenden wurden Teile der zugrundeliegenden beteiligten Ionentransportproteine und weitere Signalwege der IL-8-induzierten Zellschwellung sowie der intrazellulären Alkalinisierung genauer eruiert.

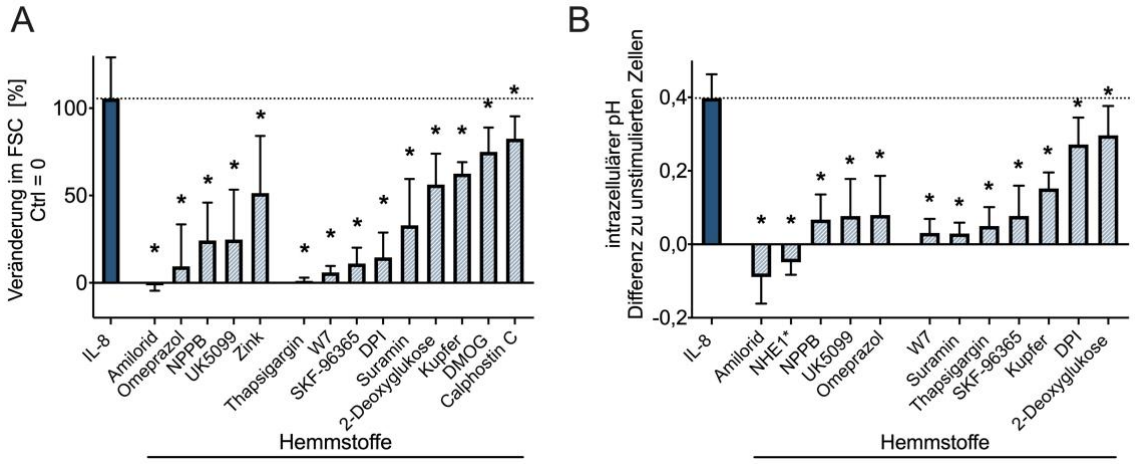

Abb. 9: Effekt verschiedener Hemmstoffe auf die IL-8-induzierte Zellschwellung und die intrazelluläre Alkalinisierung. Die Zellen wurden mit IL-8 (kein Hemmstoff, Kontrolle mit $DPBS^{+/+}$), Amilorid (200 µM, 10 min), Omeprazol (10 µM, 30 min), NPPB (100 µM, 10 min), UK5099 (400 µM, 30 min), Zink (50 µM, 30 min), NHE1* (5 µM, 10 min), Thapsigargin (2 µM, 30 min), W7 (40 µM, 30 min), SKF-96365 (50 µM, 30 min), DPI (100 µM, 30 min), Suramin (200 µM, 30 min), 2-Deoxyglukose (2 mM, 30 min), Kupfer (1 mM, 10 min), DMOG (1 mM, 30 min) oder Calphostin C (50 nM, 30 min) vorinkubiert und im Anschluss mit IL-8 (50 ng / ml) für 10 min (FSC) bzw. 5 min (pH_i) stimuliert. (A) Einfluss der Hemmstoffe auf die IL-8-verursachte Zellschwellung, gemessen durch den FSC; n = 5 − 6; *, $p < 0{,}05$ gegen IL-8; (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). (B) Effekt verschiedener Hemmstoffe auf die intrazelluläre Alkalinisierung, ausgelöst durch IL-8; n = 5 − 6; *, $p < 0{,}05$ gegen IL-8; (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. Dargestellt sind die Quotienten aus den mit Hemmstoffen inkubierten und IL-8-stimulierten Zellen sowie dazugehörigen Kontrollen, die nur mit den Hemmstoffen inkubiert wurden. NHE1* = Natrium Protonen Austauscher 1 Inhibitor, pH_i = intrazellulärer pH. Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

In einem Screening wurden die Neutrophilen vor der Stimulation mit zahlreichen Hemmstoffen inkubiert. Eine genaue Aufstellung der Inkubationszeiten und Konzentrationen der Hemmstoffe zeigt Tab. 1. Wie Abb. 9 zu entnehmen ist, erzielte die Blockade der Na^+-Kanäle durch Amilorid den größten Effekt, was zu einer vollständigen Aufhebung der IL-8-vermittelten Zellschwellung und intrazellulären

Alkalinisierung führte. Eine vergleichbare, aber etwas geringere Hemmung erzielte die Inhibition der Cl^--Kanäle mittels NPPB. Nach der Identifikation beteiligter Ionenströme wurde versucht, einige der möglichen Transporter genauer zu charakterisieren. Hierbei zeigte die Blockade der H^+/K^+-ATPase durch Omeprazol einen hemmenden Effekt auf beide gemessene Parameter. Die Antagonisierung des spannungsabhängigen Protonenkanals sorgte nur für eine mäßige Reduktion der Zellschwellung und hatte keinen Effekt auf den pH_i. Eine deutliche, dem Effekt von Amilorid ähnliche Antwort auf die intrazelluläre Alkalinisierung erfolgte durch die spezifische Hemmung des Na^+/H^+-Austauschers 1 (NHE1). Der Hemmstoff hatte jedoch keine Wirkung auf die Zellschwellung. Neben den membranständigen Transportern wurde auch der mitochondriale Pyruvattransporter mit UK5099 blockiert. Dies führte zu einer deutlichen Verminderung der IL-8-induzierten Antwort. Anschließend wurden intrazelluläre Signalmechanismen und -wege analysiert, um mögliche zugrundeliegende Aktivierungswege zu identifizieren. Der Eingriff in den Calciumstoffwechsel mittels Thapsigargin und SKF-96365 bewirkte den größten hemmenden Effekt. Um die calciumabhängige Regulation weiter zu beschreiben, wurde Calmodulin, ein zentraler Regulator des Calciumstoffwechsels, mit dem Antimetaboliten W7 antagonisiert. Dies ergab eine annähernd vollständige Hemmung der IL-8-induzierten Neutrophilenantwort. Als weitere beteiligte intrazelluläre Proteine konnten Flavoenzyme, HIF-1α und die Proteinkinase C identifiziert werden. Die Inhibition von Flavoenzymen durch DPI erzeugte eine deutliche Hemmung der Zellschwellung, aber nur eine mäßige Hemmung der intrazellulären Alkalinisierung. Die Modulation von HIF-1α durch DMOG und die Blockade der Proteinkinase C mit Calphostin C hatten nur einen marginal hemmenden Effekt auf die Zellschwellung und keinen Effekt auf den pH_i. Des Weiteren zeigte sich, dass die an der Vermittlung der Reaktionen beteiligten P2Y-Purinrezeptoren sowie die Aquaporine, welche durch Suramin bzw. Kupfer gehemmt wurden, mit einer relevanten Reduktion der Zellschwellung und der intrazellulären Alkalinisierung einher gingen. Abschließend wurde das Augenmerk auf die Glykolyse gelegt, den Hauptstoffwechselweg der Neutrophilen. Die Inhibition des Glukosestoffwechsels resultierte in einer mäßigen Reduktion der Zellschwellung und einer geringen Reduktion der intrazellulären Alkalinisierung (Abb. 9 A + B).

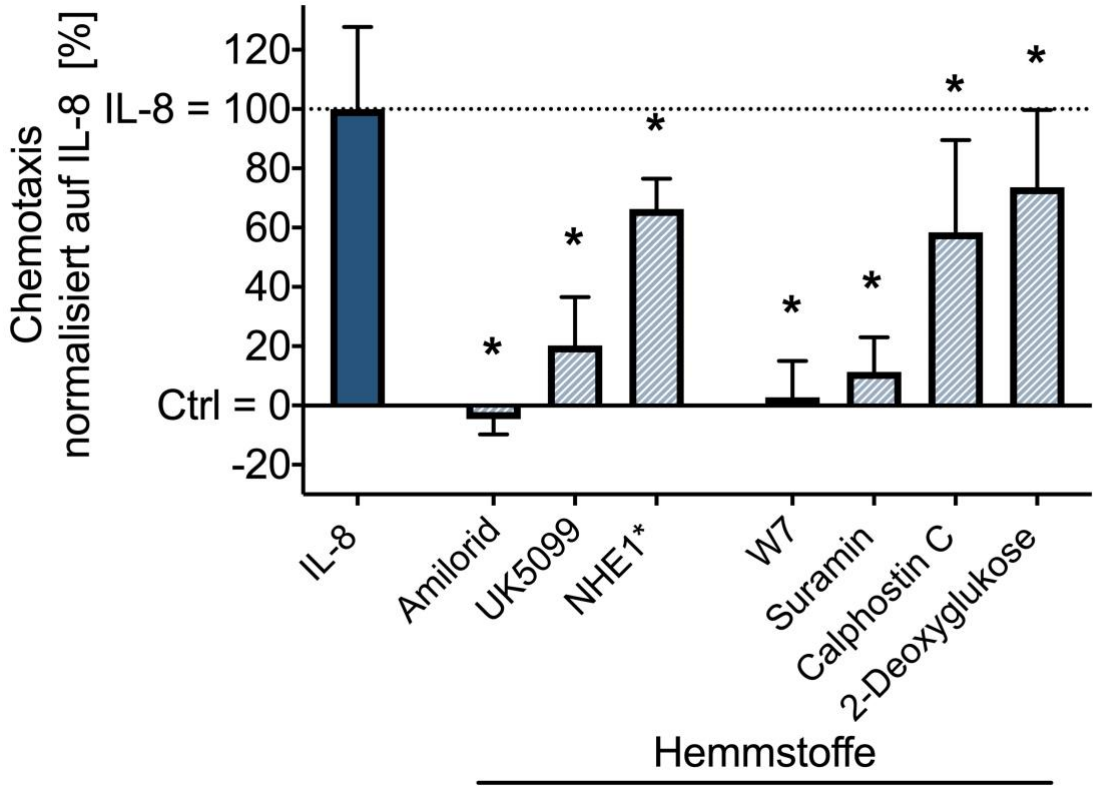

Abb. 10: Einfluss der bei Zellschwellung und intrazellulärer Alkalinisierung relevanten Hemmstoffe Amilorid (200 µM, 10 min), UK5099 (400 µM, 30 min), NHE1* (5 µM, 10 min), W7 (40 µM, 30 min), Suramin (200 µM, 30 min), Calphostin C (50 nM, 30 min) und 2-Deoxyglukose (2 mM, 30 min) auf die chemotaktische Aktivität Neutrophiler, stimuliert durch IL-8 (50 ng / ml); n = 6 − 15; *, $p < 0,05$ gegen IL-8; (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. NHE1* = Natrium Protonen Austauscher 1 Inhibitor. Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Anschließend an dieses Screening erfolgte die Anwendung relevanter Hemmstoffe der Zellschwellung und der intrazellulären Alkalinisierung in einem Test der IL-8-erzeugten chemotaktischen Aktivität der Neutrophilen, um mögliche Verbindungen darstellen zu können. Ähnlich dem hemmenden Effekt auf die Zellgröße und den pH_i zeigte sich die größte Hemmung durch die Blockade der Na^+-Kanäle mit Amilorid und Calmodulin mit W7. Weitere signifikante Reaktionen folgten auf die Inhibition des mitochondrialer Pyruvattransporter durch UK5099 und der P2Y-Purinrezeptoren durch Suramin (Abb. 10). Geringere, aber dennoch signifikante, Effekte auf die chemotaktische Aktivität wurden durch die Blockade des NHE1, der Proteinkinase C und des Glukosestoffwechsels erzielt. (Abb. 10).

3.3. Veränderung der IL-8-induzierten Neutrophilenantwort durch experimentelle inflammatorische Bedingungen

In einem translationalen Ansatz wurde als nächstes untersucht, welchen Einfluss eine in vitro erzeugte experimentelle systemische Inflammation auf die IL-8 induzierten zellulären Reaktionen der Neutrophilen hat.

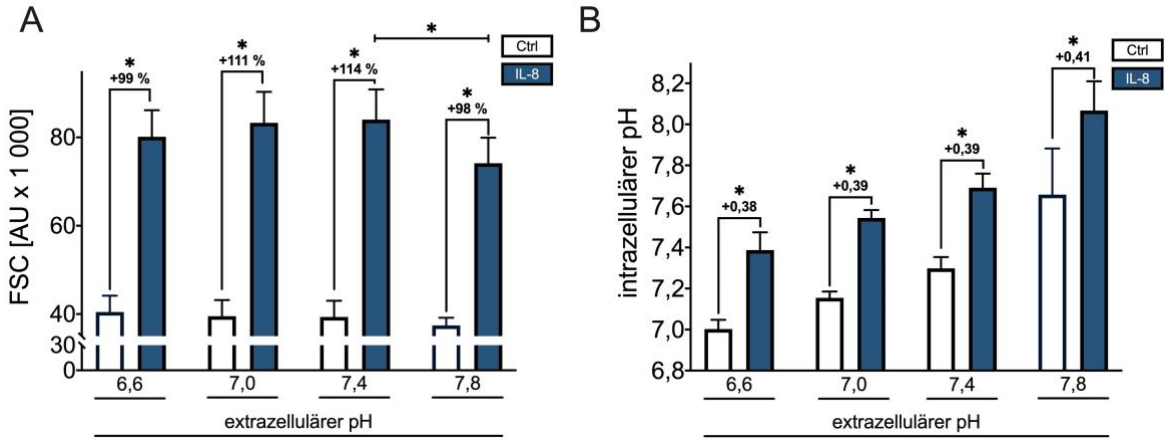

Abb. 11: Effekt einer 10-minütigen Inkubation verschiedener extrazellulärer pH-Werte (pH_e) auf die IL-8-bedingten Änderungen der Zellgröße und des intrazellulären pH-Werts. (A) Einfluss des extrazellulären pH-Werts auf die Zellgröße unstimulierter und mit IL-8 (50 ng / ml, für 10 min), stimulierter Zellen; n = 6; *, $p < 0,05$ IL-8 stimulierter Zellen gegen die korrespondierende Kontrolle. FSC IL-8 stimulierter Zellen bei pH_e 7,8 gegen FSC IL-8-stimulierter Zellen bei pH_e 7,4 (Mann-Whitney Test). (B) Einfluss des extrazellulären pH-Werts auf den intrazellulären pH-Wert unstimulierter und mit IL-8 (50 ng / ml, für 5 min), stimulierter Zellen; n = 6; *, $p < 0,05$ IL-8 stimulierter Zellen gegen die korrespondierende Kontrolle (Mann-Whitney Test). Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. FSC = Forward Scatter, Ctrl = Kontrolle. Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Eine häufige Begleiterscheinung ausgeprägter systemischer Entzündungen ist eine extrazelluläre Azidose. Abb. 11 stellt die Effekte einer in vitro erzeugten Veränderung des extrazellulären pH-Werts (pH_e) auf den pH_i dar. Die Veränderung des pH_e hatte keinen Einfluss auf die Zellgröße unstimulierter und mit IL-8 stimulierter Neutrophiler. Es zeigte sich lediglich eine leichte, jedoch signifikante Abnahme der stimulierten Zellgröße bei einem alkalischen pH_e von 7,8 im Vergleich zu der stimulierten Zellgröße bei einem pH_e von 7,4 (Abb. 11 A). Dem gegenüber konnte eine Verschiebung des pH_i in Richtung des jeweiligen pH_e, in dem die Neutrophilen jeweils inkubiert wurden, beobachtet werden. Die Reaktion auf IL-8 zeigte sich als unabhängig von dieser Verschiebung, da der Grad der

Alkalinisierung unbeeinflusst von Art und Umfang der Änderung des pH_e blieb (Abb. 11 B).

Im nächsten Schritt wurde eine systemische Entzündung durch eine einstündige Inkubation von LPS, LPS und dem LPS-bindenden Protein (LBP), IL-8 oder fMLF simuliert, um den Einfluss dieser Vorinkubation auf die IL-8-induzierten Veränderungen der Zellgröße und des pH_i festzustellen.

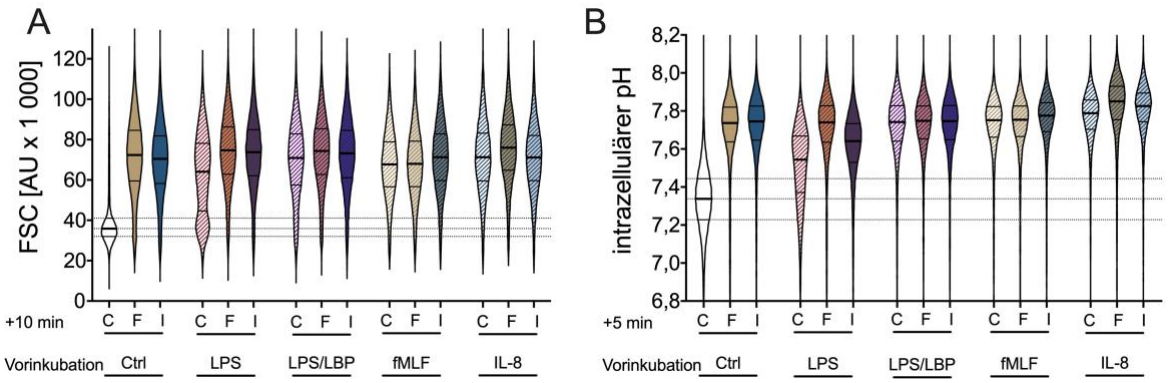

Abb. 12: Einfluss einer einstündigen Vorinkubation mit LPS (100 ng / ml), LPS (100 ng / ml) und LBP (2 ng / ml), fMLF (10 µM) oder IL-8 (50 ng / ml) auf die durch fMLF (10 µM) bzw. IL-8 (50 ng / ml) induzierten Veränderungen. (A) Änderung der fMLF- bzw. IL-8-induzierten Zellschwellung durch die Vorinkubation. (B) Einfluss der vorangehenden Stimulation auf die fMLF- bzw. IL-8-induzierte intrazelluläre Alkalinisierung. Die Daten sind als Violin-Plots dargestellt, in denen jeweils 2.000 Zellen der Probanden zusammengefasst wurden; n = 6 −. 11. LPS = Lipopolysaccharid, LBP = LPS-bindendes Protein, fMLF = N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin, IL-8 = Interleukin 8, Ctrl = Kontrolle, C = Kontrolle, F = fMLF, I = IL-8, FSC = Forward Scatter. Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Anhand dieser Vorinkubationsexperimente wurde deutlich, dass eine länger anhaltende Stimulation mit diesen Substanzen zu einer signifikanten Änderung der Zellgröße und des pH_i führte und die erneute Stimulation mit fMLF und IL-8 nach einstündiger Vorinkubation nur unter Kontrollbedingungen eine Änderung der gemessenen Parameter erzielte (Abb 12 A + B). Besonders auffällig war die Vorinkubation mit LPS. Zeigten sich nach 5 min Stimulation für den pH_i bzw. 10 min für die Zellgröße keine signifikanten Änderungen (Abb. 7 A + C), erzeugte LPS nach 1 h eine deutliche Zunahme der Zellgröße und des pH_i (Abb 12 A + B). Eine weitere Beobachtung ergab die veränderte Verteilung der Neutrophilen. Unter Kontrollbedingungen und nach Stimulation mit fMLF bzw. IL-8 zeigte sich eine unimodale Verteilung der Neutrophilen. Die Stimulation mit LPS dagegen führte zu

einer bimodalen Verteilung. Diese zweigipflige Verteilung konnte nicht durch einen einzelnen Probanden erklärt werden, sondern zeigte sich bei allen Spendern. Die zeitgleiche Inkubation mit LBP oder eine nachträgliche Stimulation mit fMLF oder IL-8 löste dieses zweite Maximum der bimodalen Verteilung wieder auf.

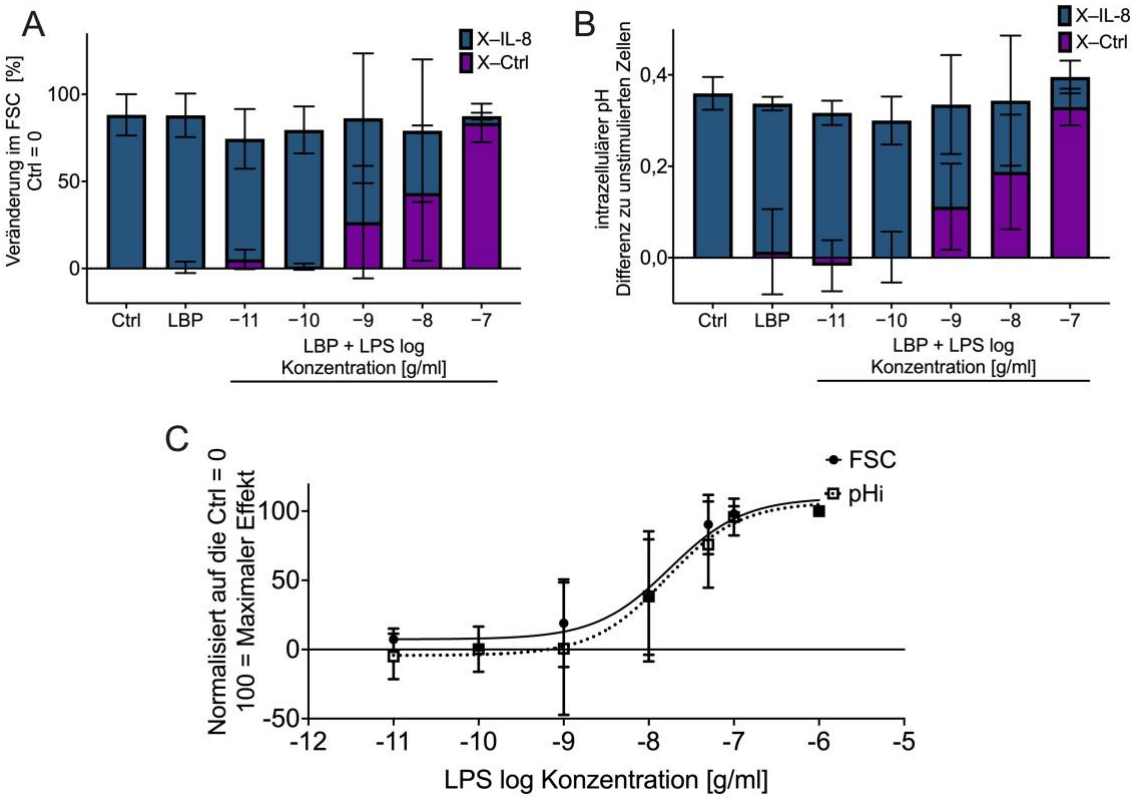

Abb. 13: Einfluss verschiedener LPS-Konzentrationen (0,1 – 1000 ng / ml) und LBP (2 ng / ml) auf die Änderung der Zellgröße, 10 min (A), und die intrazelluläre Alkalinisierung, 5 min (B), nach Inkubation mit IL-8 (50 ng / ml). (C) Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Zunahme der Zellgröße (FSC) und des intrazellulären pH nach 1 h Stimulation mit LPS (0,1 – 1000 ng / ml); n 5 – 11. Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. FSC = Forward Scatter, pH_i = intrazellulärer pH, LPS = Lipopolysaccharid, LBP = LPS-bindendes Protein, IL-8 = Interleukin 8, Ctrl = Kontrolle. Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Die Reduktion der IL-8-induzierten intrazellulären Alkalinisierung und Zellschwellung durch die Vorinkubation mit LPS und LBP äußert sich dabei als konzentrationsabhäbgig, mit einem EC_{50}-Wert von 17,2 ng / ml LPS für den FSC und 15,9 ng / ml LPS für den pH_i (Abb. 13 A - C). Zur Bestätigung der in vitro festgestellten Auswirkungen von LPS wurde eine Endotoxinämie in einem ex vivo Vollblutmodell simuliert. In diesem Modell konnten die Ergebnisse der in vitro

Versuche reproduziert werden. Nach einstündiger LPS-Vorinkubation zeigten die Neutrophilen einen deutlichen Anstieg des FSC und des pH_i (Abb. 14 A + B).

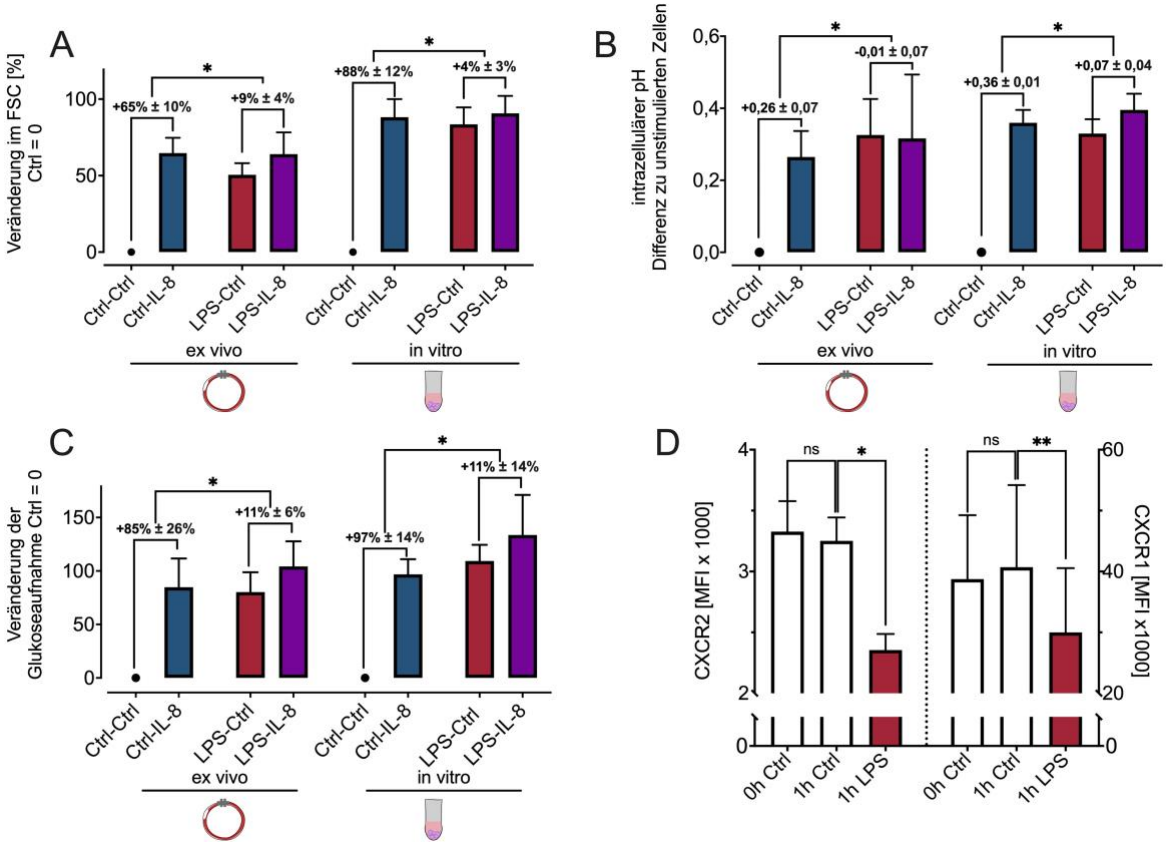

Abb. 14: Vergleich des Einflusses einer einstündigen Inkubation von LPS (100 ng / ml) und LBP (2 ng / ml) auf die Neutrophilenantwort, stimuliert durch IL-8 (50 ng / ml), zwischen einem in-vitro-Modell und einem ex-vivo-Vollblutmodell. (A) Einfluss der LPS und LBP Vorinkubation auf die IL-8-vermittelten Änderungen der Zellgröße; n = 6; *, $p < 0,05$ Vergleich der Quotienten bzw. Differenzen zwischen LPS vorbehandelten Zellen und Kontrollzellen (Mann Whitney Test). (B) Änderung der IL-8-induzierten intrazellulären Alkalinisierung durch eine vorangehende Inkubation mit LPS und LBP; n = 6; *, $p < 0,05$ Vergleich der Quotienten bzw. Differenzen zwischen LPS vorbehandelten Zellen und Kontrollzellen (Mann Whitney Test). (C) Auswirkungen der LPS und LBP Vorinkubation auf die IL-8-induzierte Glukoseaufnahme. Dargestellt sind die IL-8 induzierten Veränderung in Relation zu ihren korrespondierenden Kontrollen; n = 4 – 6; *, $p < 0,05$ Vergleich der Quotienten zwischen LPS vorbehandelten Zellen und Kontrollzellen (Mann Whitney Test). (D) Bedeutung einer einstündigen Vorbehandlung mit LPS (100 ng / ml) und LBP (2 ng / ml) auf die IL-8-Rezeptoren CXCR1 (CD181) und CXCR2 (CD182), n = 6; *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ gegen die Kontrolle (Varianzanalyse (One-way ANOVA) und Dunn`s post hoc Test). Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. FSC = Forward Scatter, LPS = Lipopolysaccharid, LBP = LPS-bindendes Protein, IL-8 = Interleukin 8, Ctrl = Kontrolle, MFI = mittlere Fluoreszenzintensitäten. Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Darüber hinaus führte LPS auch zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme (Abb. 14 C). Vergleichbar mit den in-vitro-Experimenten zeigte eine nachträgliche Stimulation mit IL-8 zu keiner signifikanten Zunahme der gemessenen Parameter. Dies ergab ein Vergleich mit der Stimulation unter Kontrollbedingungen. Als mögliche Ursache dieser verminderten IL-8-Antwort, wurde die Oberflächenexpression der IL-8-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 vermutet und daher untersucht. Die einstündige Inkubation mit LPS führte dabei zu einer signifikanten Herabregulierung dieser

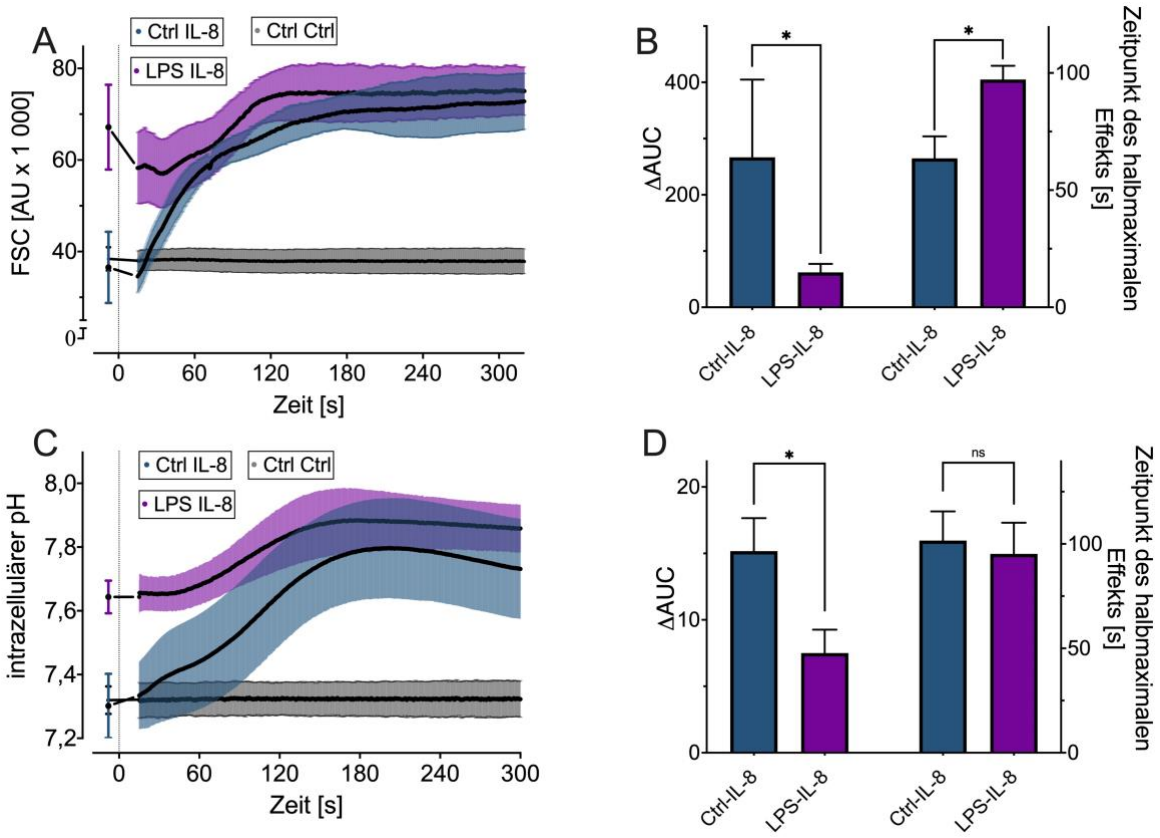

Abb. 15: Sekundengenaue Darstellung, der ersten 5 min der mit IL-8 (50 ng / ml) induzierten Effekte und deren Veränderung durch eine einstündige Vorinkubation mit LPS (100 ng / ml) und LBP (2 ng / ml). (A) Darstellung der IL-8-induzierten Zellschwellung und der Auswirkungen von LPS. (B) Effekt der LPS und LBP Vorbehandlung auf die AUC und den Zeitpunkt des halbmaximalen Effekts der Veränderungen der Zellgröße; jeweils, n = 6; *, $p < 0,05$ (Mann Whitney Test). (C) IL-8-vermittelte intrazelluläre Alkalinisierung und Veränderung des pH_i durch eine Vorinkubation mit LPS. (D) Effekt der LPS und LBP Vorbehandlung auf die AUC und den Zeitpunkt des halbmaximalen Effekts der Veränderungen des pH_i; jeweils, n = 6; *, $p < 0,05$ (Mann Whitney Test). Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. FSC = Forward Scatter, LPS = Lipopolysaccharid, LBP = LPS-bindendes Protein, IL-8 = Interleukin 8, Ctrl = Kontrolle, ΔAUC = Differenz der Fläche unter der Kurve einer Messung und einer rechteckigen Fläche, gebildet unter der zugehörigen initialen Messung. Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Oberflächenrezeptoren. Daher wurde eine durchflusszytometrische Methode entwickelt, um mit einer kontinuierlichen Messung ein genaueres Abbild dieser schnellen physiologischen Reaktionen zu generieren.

Die sekundengenaue Messung stimmte mit den zuvor konventionell durchgeführten durchflusszytometrischen Messungen überein und zeigte eine signifikante IL-8-induzierte Zellschwellung und intrazelluläre Alkalinisierung. Bei deutlicher sichtbarer Kinetik stellte sich ein schneller Anstieg im FSC und pH_i dar, der zeitnah in den ersten Sekunden nach der Stimulation mit IL-8 begann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Maxima des FSC und pH_i schon nach 2-3 min erreicht wurden (Abb. 15 A + C). Die Vorinkubation mit LPS und LBP führte, übereinstimmend mit den vorherigen Ergebnissen, auch bei der neuen Messmethode zu einer sichtbaren Reduktion der IL-8-induzierten Antwort. Dabei deutlich ersichtlich, dass sich die Verminderung des maximalen Effekts über den gesamten Messzeitraum erstreckt. Dies wurde anhand der Berechnung der Fläche unter der Kurve (ΔAUC) dargestellt. Es zeigte sich sowohl für den FSC (266 ± 138 ohne LPS, 62 ± 15 mit LPS), als auch für den pH_i (15 ± 2 ohne LPS, 8 ± 2 mit LPS) eine signifikante Verminderung der Fläche unter der Kurve, was ein Zeichen der verminderten Fähigkeit zur IL-8-induzierten Zellschwellung und intrazellulären Alkalinisierung ist (Abb. 15 B + D). Neben dem Betrag der IL-8-vermittelten Effekte, beeinflusste LPS auch Einfluss die zeitliche Kinetik. Dies wurde z.B. an der Zeit des halbmaximalen Effekts dargestellt. Die Vorinkubation mit LPS verlängerte signifikant die Zeit, bis 50% der maximalen Zellschwellung erreicht wurden (Abb. 15 B). Dagegen zeigte sich kein LPS-abhängiger Effekt auf die Zeit des halbmaximalen Effekts beim intrazellulären pH-Wert (Abb. 15 D).

3.4. Abgleich mit der Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die ursprüngliche Hypothese **„Interleukin 8 verursacht zentrale Änderungen hinsichtlich des intrazellulären pH und der Zellgröße neutrophiler Granulozyten. Die dabei entstehenden Reaktionsmuster unterliegen wiederum Änderungen durch inflammatorische Umgebungsbedingungen“**, konnte bestätigt werden. Eine Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse zeigt Abb. 16. Die Ergebnisse der einzelnen Teilschritte stellten sich wie folgt dar:

1. *Charaktierisierung der IL-8-induzierten physiologischen Reaktionen neutrophiler Granulozyten.*

IL-8 induziert eine Depolarisation des Membranpotentials, eine intrazelluläre Alkalinisierung, eine Zunahme der Zellgröße und eine Hochregulierung der Glukoseaufnahme neutrophiler Granulozyten. Diese Reaktionen sind in vielen Punkten vergleichbar mit anderen Chemotaxinen (Abb. 5 - 8 + Tab. 3)

2. *Etablierung einer sekundengenauen durchflusszytometrischen Messung zur genaueren Identifizierung der IL-8 vermittelten Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes und des FSCs.*

Eine neuartige sekundengenaue durchflusszytometrische Messung erbrachte eine genaue Beschreibung der Kinetik von IL-8-induzierten Reaktionen und der Auswirkungen von LPS (Abb. 15).

3. *Modulation der beobachteten physiologischen Reaktionen durch Verwendung verschiedener Inhibitoren zur Analyse vermittelnder Ionentransportproteine und Signalmoleküle.*

Zahlreiche Inhibitoren zeigten in einem Screeningverfahren sowohl einen Einfluss auf zentrale IL-8-induzierte Reaktionen als auch auf die Chemotaxis, einer bedeutenden Funktion der Neutrophilen (Abb. 9 - 10).

4. *Beeinflussung der IL-8 induzierten Antworten durch experimentelle inflammatorische Bedingungen in vitro und ex vivo.*

In vitro und ex vivo führte eine Exposition gegenüber LPS zu einer bedeutenden Suppression der IL-8-induzierten Reaktionen. Eine Änderung des extrazellulären pH-Werts zeigte sich unabhängig von IL-8-vermittelten Effekten auf die Zellgröße und den intrazellulären pH (Abb 11 - 15).

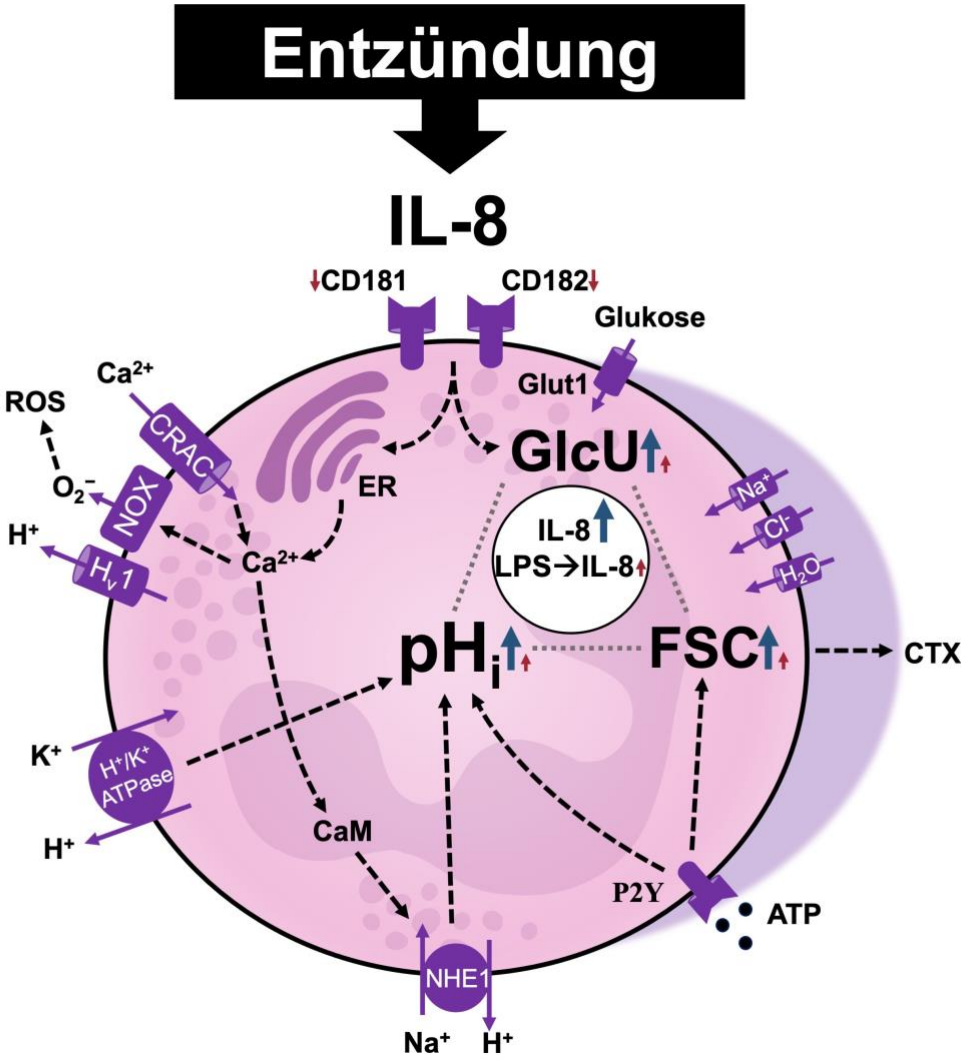

Abb. 16: Zusammenfassung der IL-8-induzierten Effekte auf Neutrophile. Über die zwei IL-8 Rezeptoren CD181 und CD182 führt IL-8 zu einer intrazellulären Alkalinisierung, erhöhten Aufnahme von Glukose, Zellschwellung und Aktivierung der chemotaktischen Aktivität. Der pH_i, ein zentraler Regulator der Zellhomöostase wird dabei von vielen Ionenkanälen und -transportern beeinflusst, vor allem von Calciumsignalwegen über Calmodulin und dem NHE1-Transporter. Eine Vorinkubation mit LPS führt zu einer Reduktion der IL-8 induzierten Zelleffekte durch eine Erhöhung der basalen Aktivität der Neutrophilen. Blaue Pfeile = IL-8 induzierte Effekte, Rote Pfeile = IL-8 induzierte Effekte nach einer Vorinkubation mit LPS, CRAC = Kanäle aktiviert durch Kalziumfreisetzung, ROS = Reaktive Sauerstoffspezies, NOX = NADPH Oxidase, CaM = Calmodulin, NHE1 = Natrium Protonen Austauscher 1, pH_i = intrazellulärer pH, FSC = Forward Scatter, CTX = Chemotaxis, GlcU = Glukoseaufnahme, LPS = Lipopolysaccharid. Modifiziert nach Bernhard et al. [7], Erstveröffentlichung im Journal of Innate Immunity. CC BY-NC 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

4. DISKUSSION

4.1. IL-8-vermittelte Reaktion neutrophiler Granulozyten unter physiologischen Umständen

Neutrophile Granulozyten reagieren auf die IL-8 Stimulation mit einer Depolarisation des Membranpotentials, Alkalinisierung des intrazellulären pH-Werts, Zunahme der Zellgröße und Aktivierung der Glukoseaufnahme (Abb. 16). Diese Reaktionen konnten schon bei anderen Chemotaxinen wie fMLF, C5a oder PAF festgestellt werden, was die Gültigkeit der Ergebnisse bestätigt [26, 27, 41, 54, 77, 137]. Frühestes Kennzeichen dieser physiologischen Abläufe ist die Depolarisation des Membranpotentials. Diese wird auf eine Aktivierung der NADPH-Oxidase zurückgeführt, wobei negative Ladungen der Zelle in Form eines Elektronenausstroms verloren gehen und dabei zu einer Depolarisation des Membranpotentials führen [22, 56]. Gestützt wird diese Annahme durch die begleitend auftretende intrazelluläre Alkalinisierung, die durch IL-8 ausgelöst wird. Der Efflux von Elektronen wird durch einen Ausstrom von Protonen begleitet, um eine Ladungsindifferenz zu verhindern. Die folglich entstehende geringere intrazelluläre Protonenkonzentration führt zu einem Anstieg des pH_i [22, 24, 25]. Verglichen mit den Chemotaxinen fMLF und C5a erzeugte IL-8 eine geringere Depolarisation, während die Effekte im Hinblick auf die Zellschwellung und die intrazelluläre Alkalinisierung vergleichbar sind (Abb 7 A - D). Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz könnte die hauptsächlich verwendete IL-8 Konzentration von 50 ng / ml sein. In einer früheren Studie konnten Konzentrationen von 500 bis 5000 ng / ml IL-8 deutlichere Depolarisationen auslösen [137]. In der vorliegenden Studie sollte sich die IL-8 Konzentration jedoch möglichst in einem klinisch relevanten Bereich befinden (Abb. 1).

Nach der Depolarisation erzeugte IL-8 eine intrazelluläre Alkalinisierung. Wie schon diskutiert wurde, ist diese als eine Folge der Depolarisation selbst zu werten. Daneben wird eine Beteiligung des Pentosephosphatwegs diskutiert [12]. Dieser wird bei stimulierten Neutrophilen aktiviert und stellt NADPH für die NADPH-Oxidase bereit.

Die dabei entstehenden Protonen werden über aktivierte Ionenkanäle und -transporter beseitigt, um eine Ansäuerung des pH_i zu verhindern. Eine überschießende Reaktion dieser Transporter scheint dabei die Ursache der intrazellulären Alkalinisierung zu sein [12, 22, 86, 87]. Diese beiden Faktoren allein sind jedoch nicht ausreichend, um die transiente Alkalinisierung und ihre Bedeutung zu erklären. Bei Neutrophilen lässt sich ein enger Zusammenhang zwischen dem pH_i und Effektorfunktionen wie Chemotaxis, Phagozytose und der Generierung von ROS erkennen [42, 94, 105]. Es sind daher weitere Untersuchungen notwendig, um die Bedeutung der intrazellulären Alkalinisierung für die Regulation und Funktion der Neutrophilen zu klären.

Des Weiteren zeigte IL-8 ähnliche Wirkungen wie C5a und fMLF in Bezug auf die Zellschwellung (Abb. 7 A). Als Näherungsmaß für die Zellgröße wurde hauptsächlich der FSC herangezogen. Zusätzlich zeigten die Neutrophilen nach der Stimulation eine Erhöhung des SSC (Abb. 7 B). Dieser durchflusszytometrische Parameter, der oft als Marker der Zellgranularität herangezogen wird, könnte jedoch auch als weiterer Parameter für die Zunahme der Zellgröße herangezogen und interpretiert werden [124]. Besonders deutlich ist dabei die Diskrepanz zwischen einer durchflusszytometrisch gemessenen Zunahme der Zellgröße um 107% ± 11% im Vergleich mit einer Coulter-Counter Messung, die eine Zunahme der Zellgröße um 2,4% ergab (Abb. 5 B). Eine entsprechende Diskrepanz konnte auch schon für das Chemotaxin PAF dargestellt werden [54]. Dieser Unterschied ist auf die verwendeten Messmethoden zurückzuführen. Die Stimulation der Zellen führt durch Reorganisation des Aktinzytoskeletts zu einer Elongation der Neutrophilen [27, 68], welche durch das Durchflusszytometer überschätzt wird. Dennoch stehen die Ergebnisse im Einklang mit den Untersuchungen für andere Chemotaxine wie C5a und PAF [27, 54] und dem allgemeinen Anspruch an ein Chemotaxin, für die gerichtete Bewegung der Neutrophilen im Gewebe zu sorgen und dafür eine rasche Formänderung zu provozieren [68, 110].

Abschließend konnte eine erhöhte Glukoseaufnahme durch die Stimulation mit IL-8 dargestellt werden (Tab. 3). Eine Steigerung des Glukosemetabolismus konnte ebenfalls für andere chemotaktisch aktive Substanzen wie fMLF oder C5a gezeigt werden [26, 129]. Die Bedeutung von Glukose als Energieträger begründet sich wahrscheinlich einerseits auf den stark glukoseabhängigen Effektorfunktionen der

Neutrophilen wie Chemotaxis und Phagozytose, andererseits darauf, dass im entzündeten Gewebe vornehmlich hypoxische Zustände herrschen, die eine anaerobe Glykolyse unabdingbar machen [101, 129]. Der metabolischen Aktivierung liegt eine Hochregulierung der GLUT-1-Transporter zugrunde, die durch chemotaktisch wirkende Stoffe initiiert wird [45]. Zusätzlich wird eine Abhängigkeit vom intrazellulären pH-Wert diskutiert. Ein erhöhter intrazellulärer pH-Wert scheint mit einer erhöhten Aktivität der Phosphofruktokinase 1, dem Schlüsselenzym der Glykolyse, zu korrelieren [33, 122]. Da auch IL-8 eine Verschiebung des intrazellulären pH-Werts ins Alkalische erzeugt, könnte ebenfalls hier dieser Effekt zum Tragen kommen und die erhöhte Glukoseaufnahme eine Folge der physiologischen Abläufe unter Stimulation sein.

4.2. Pharmakologische Modulation der IL-8-induzierten Effekte

Vorherige Studien wiesen auf die Relevanz des Natrium-Protonen-Austauschers 1 (NHE1) als Modulator dieser physiologischen Abläufe hin. Darüber hinaus konnten Assoziationen zu verschiedenen granulozytären Effektorfunktionen wie der Chemotaxis gefunden werden [26, 94, 106]. Vor diesem Hintergrund wurde durch die gezielte pharmakologische Modulation in einem Screening versucht, Teile der zugrundeliegenden Ionenströme und Signalmoleküle zu bestimmen, welche an den IL-8 induzierten Effekten beteiligt sind. Auch für IL-8 konnten NHE1-abhängige Effekte beobachtet werden. So zeigte sich eine vollständige Reduktion der intrazellulären Alkalinisierung und eine deutliche Reduktion der chemotaktischen Aktivität (Abb. 9 B + 10). Daneben zeigte Amilorid, ein unselektiver Inhibitor von Natriumkanälen, einen noch prominenteren Effekt auf die intrazelluläre Alkalinisierung und die Chemotaxis und darüber hinaus im Gegensatz zu NHE1 auch eine Hemmung der Zellschwellung (Abb. 9 A + B + 10). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es neben NHE1 noch weitere relevante Natriumströme für die Regulation der physiologischen Reaktionen gibt [85]. Auch die unselektive Hemmung der Chloridströme erbrachte eine deutliche Hemmung der IL-8-vermittelten Reaktionen, was im Einklang mit vorherigen Studien steht, die einen Chloridausstrom bei Neutrophilen in Zusammenhang mit der Zellformänderung und dem intrazellulären pH beschrieben haben [27, 136]. Eine weitere Manipulation von Protonenströmen gelang durch Omeprazol (Hemmung der H^+/K^+-ATPase) und Zink (Hemmung spannungsabhängiger Protonenkanäle) (Abb. 9 A + B). Zink zeigte

dabei nur einen Effekt auf die Zellschwellung. Es scheinen jedoch sowohl die H^+/K^+-ATPase als auch die spannungsabhängigen Protonenkanäle regulierend in die Physiologie von Neutrophilen einzugreifen [82, 94].

Neben möglichen beteiligten Ionenströmen wurde das Augenmerk auch auf die Beteiligungen verschiedener intrazellulärer Signalmechanismen gelegt. Nach der Bindung von IL-8 an seine beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 werden zahlreiche Signalwege iniitiert, unter Anderem eine Aktivierung der Phospholipase Cβ 2, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt und dadurch zu einer Aktivierung des calcium-bindenden Proteins Calmodulin [43, 57, 125]. Im Einklang mit den Daten für C5a konnte durch eine Hemmung des intrazellulären Calciumstoffwechsels und durch eine spezifische Hemmung von Calmodulin eine nahezu vollständige Suppression der intrazellulären Alkalinisierung erreicht werden (Abb. 9 B) [26]. Zusätzlich zeigte sich eine äquipotente Auswirkung auf die Zellschwellung und eine starke Beteiligung von Calmodulin an der Chemotaxis (Abb. 9 A + 10). Diese Effekte sind möglicherweise durch eine Aktivierung von NHE1 durch Calmodulin zu erklären [8]. Ein weiterer zentraler Regulator verschiedener Zellfunktionen stellt die Proteinkinase C (PKC) dar. Im Gegensatz zu C5a zeigte eine Blockade der PKC nur minimale Effekte im Hinblick auf die Chemotaxis und Zellschwellung und hatte keinen Effekt auf den pH_i (Abb. 9 A + B + 10) [26]. Dieser Unterschied ist eventuell durch die Selektivität der in den Studien verwendeten Hemmstoffe zu erklären und Staurosporin scheint über die PKC hinaus noch weitere relevante Signalmoleküle zu beeinflussen [117]. Darüberhinaus nutzen C5a und IL-8 unterschiedliche Signalwege, um entsprechende zelluläre Effekte zu induzieren [48].

Schließlich wurde eine weitere Modulationsmöglichkeit durch Beeinflussung des Metabolismus adressiert. Die Inhibition des mitochondrialen Pyruvattransporters (MPC) mittels UK5099 erzeugte eine starke Reduktion der physiologischen Reaktionen und der Chemotaxis (Abb. 9 A + B + 10). Parallel führte eine Hemmung der Glykolyse nur zu leichten Reduktionen der gemessenen zellulären Antworten. Neutrophile sind in ihrer Funktionsweise auf eine funktionierende Glykolyse angewiesen. Dabei konnten schon erste Vorarbeiten einen Zusammenhang zwischen der Rate des Glukosestoffwechsels und dem intrazellulären pH-Wert

darstellen, was eine metabolische Komponente im komplexen Zusammenspiel der physiologischen Reaktion Neutrophiler nahelegt [26, 64, 122].

Insgesamt konnten in diesem Screening mögliche Ansatzpunkte für die Modulation der Neutrophilenphysiologie aufgezeigt werden. Für einige der untersuchten Transporter und Signalmoleküle wurde bereits eine pharmakologische oder klinische Relevanz beschrieben. So ist beispielsweise der MPC in anderen inflammatorischen Zuständen wie malignen Erkrankungen oder ischämischen Herzerkrankungen herunterreguliert, was zur Exazerbation der Erkrankung beiträgt [35, 133]. Für die Inhibition von NHE1 konnten in Tierexperimenten erste positive Ergebnisse bei inflammatorischen Zuständen erzielt werden [70, 131]. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit weiterer Experimente, um die klinische Relevanz einer Modulation der physiologischen Abläufe während der Aktivierung Neutrophiler auf die überschießende Immunantwort zu eruieren.

4.3. LPS als Modulator IL-8-vermittelter Reaktionen

Systemische Entzündungsreaktionen haben bekanntermaßen einen beträchtlichen Einfluss auf die Neutrophilenphysiologie [26, 27, 54, 77]. Vor diesem Hintergrund wurden die IL-8-vermittelten Reaktionen in den Kontext einer experimentellen Inflammation gestellt. Die extrazelluläre Azidose stellt ein typisches Merkmal schwerer entzündlicher Prozesse dar. Infektionen, Hypoxien und die Ansammlung saurer Valenzen (wie z.B. Laktat) führen zu einer Senkung des extrazellulären pH-Werts [107, 116, 119]. In der Simulation extrazellulärer pH-Verschiebungen stellte sich der pH_i und die Zellgröße der Neutrophilen davon unabhängig dar (Abb. 11 A + B).

Diesem Experiment folgte die Simulation einer Endotoxinämie in vitro und ex vivo. Eine einstündige Inkubation mit LPS führte zu einem deutlichen Anstieg der Zellgröße, einer intrazellulären Alkalinisierung und einer Suppression der IL-8-vermittelten Effekte (Abb. 12 A + B). Dieser LPS-Effekt stellte sich als konzentrationsabhängig dar (Abb. 13 A - C). Interessanterweise war dieses Ergebnis erst nach einer einstündigen Inkubation sichtbar, eine 1- bis 20-minütige Stimulation mit LPS hingegen erbrachte keine nenneswerten Veränderungen der gemessenen Parameter (Abb. 7 A - D). Ein Anwachsen der Zellgröße und ein alkalischer pH_i wurden dabei auch schon in septischen Patienten und Mäusen

entdeckt [26, 27]. Dies deutet daraufhin, dass LPS an den in vivo ermittelten Effekten beteiligt sein könnte. Nicht jeder Neutrophile scheint jedoch gleich auf LPS zu reagieren. In Bezug auf die Zellgröße und den pH_i erzeugt LPS eine bimodale Verteilung der Neutrophilen (Abb. 12 A + B). Die Verteilung in zwei Gruppen wird aber durch die Zugabe von LBP nahezu unterdrückt, d.h. LBP mediiert zentral die Aktivierung der Neutrophilen durch LPS, was darauf hindeutet, dass es diese Aufgabe auch im Bezug auf die physiologischen Reaktionen der Neutrophilen ausübt [134]. Die abgeschwächte IL-8-Reaktion könnte in diesem Rahmen als Ceilingeffekt interpretiert werden. Dies ist für die Zellgröße als wahrscheinlich anzusehen, da die Ausdehnung einer Zelle physiologisch begrenzt ist. Allerdings spricht der Blick auf den pH_i gegen die Theorie eines Ceilingeffekts. In einem alkalischen Milieu zeigen Neutrophile auch einen erhöhten pH_i. Dennoch ist es den Neutrophilen möglich, als Reaktion auf eine Stimulation mit IL-8 einen ähnlichen Alkalinisierungsgrad zu erreichen, wie unter physiologischen Bedingungen mit einem pH_e von 7,4. Daraus folgt, dass ein reiner Ceilingeffekt nicht alle Reaktionen von LPS erklärt und es weitere Mechanismen geben muss, wie sich LPS auf die Physiologie der Neutrophilen auswirkt und so die weitere Stimulation blockiert. Ähnliche suppressive Effekte konnten auch durch eine Inkubation mit IL-8 und fMLF dargestellt werden (Abb. 12 A + B).

Eine Übertragung der Experimente mit LPS auf ein ex-vivo-Vollblutmodell bestätigte die in vitro ermittelten Reaktionen. Darüber hinaus konnte durch die Inkubation mit LPS eine erhöhte Glukoseaufnahme festgestellt werden (Abb. 14 A - C), welche wahrscheinlich auf die Aktivierung von Glukosetransportern zurückzuführen ist [104]. In dieser Versuchsreihe konnte ebenfalls eine LPS-induzierte Reduktion der IL-8-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 als mögliche Ursache für die Verminderung der IL-8-vermitttelten Reaktionen festgestellt werden. Diese Rezeptordesensibilisierung aufgrund einer starken Überstimulation lässt sich auch durch andere Chemotaxine wie fMLF oder IL-8 selbst erzeugen, wodurch die ähnlichen Reaktionen der Neutrophilen unabhängig vom Stimulus der Vorinkubation zu erklären sind (Abb. 14 D) [93, 97, 100].

Die für LPS erhobenen Daten stehen damit im Einklang zu anderen Studien, die Veränderungen der Neutrophilenphysiologie unter inflammatorischen Bedingungen darstellen konnten und diese auch teilweise als diagnostische Marker nutzten [26,

27, 50, 52, 126]. Der Frage nach einer diagnostischen Verwendung dieser Reaktionen kann man sich durch eine genaue Beschreibung der physiologischen Kinetik nähern. Dafür wurde eine neuwertige kontinuierliche durchflusszytometrische Messung verwendet, die nach Aufbereitung der Daten eine zeitliche Auflösung von einer Sekunde zeigte. Als Surrogatparameter für den maximalen IL-8-induzierten Effekt und die Auswirkungen einer LPS-Vorinkubation darauf wurde die Fläche unter den jeweiligen Kurven verwendet (engl. area under the curve, AUC). Damit bestätigte diese Testreihe die bereits beobachteten Ergebnisse aus den vorherigen Experimenten zu IL-8 und LPS, was eine hohe methodische Qualität dieser Messmethode aufzeigt (Abb. 15 A - D). Die sekundengenaue Darstellung zeigte zusätzlich, dass LPS nicht nur Auswirkungen auf die maximalen zellulären Veränderungen hat, sondern auch auf die Zellgröße mit entsprechend beobachteter zeitlicher Kinetik. Die Zeit, die die Neutrophilen benötigen, um 50% ihrer maximalen Zellschwellung zu erreichen, wurde durch LPS signifikant verlängert (Abb. 15 B). Dieser Umstand könnte als weiteres Indiz dafür betrachtet werden, dass die Verminderung der IL-8-induzierten Effekte durch LPS nicht nur auf einen reinen Ceilingeffekt zurückzuführen sind, sondern dass eine Überstimulation durch LPS fundamental in die Zellbiologie eingreift.

Zusammenfassend zeigt sich, dass sich LPS als bedeutender Suppressor der IL-8-vermittelten Effekte auswirkt. Es ist zu überprüfen, ob LPS die Zellen überstimuliert oder die Zellbiologie so sehr verändert, dass andere Mediatoren nicht mehr wirken können.

4.4. Limitationen und Stärken der Arbeit

Im Vergleich zu Vorarbeiten über die Auswirkungen von IL-8 auf Neutrophile, wurde in den vorliegenden Testreihen versucht, eine den natürlichen physiologischen Bedingungen möglichst ähnliche Umgebung zu erzeugen. Diese beinhaltete die Exposition zu Puffermedien mit Hydrogencarbonat, einem für das Zellmilieu wichtigen Anion [27, 75, 137], sowie eine möglichst konstante Umgebungstemperatur von 37°C. Als negative Auswirkung von RPMI wurde eine sukzessive Steigerung des pH_i bei Kontrollzellen durch einen kontinuierlichen Verlust von Hydrogencarbonat beobachtet. Jedoch war es stimulierten Zellen nach Erreichen der maximalen intrazellulären Alkalinisierung möglich, ihren pH_i im

Verlauf wieder abzusenken (Abb. 5 D). Aus diesem Umstand und der Tatsache, dass in den relevanten ersten 10 Minuten der Messperiode die Parameter der Kontrollzellen stabil waren, geht hervor, dass der Vorteil eines physiologischeren Milieus durch hydrogencarbonathaltige Medien überwog.

Der methodische Kern dieser Arbeit war die Durchflusszytometrie, welche die Analyse von einigen tausend Zellen pro Sekunde ermöglicht. Kritisch dabei ist die Tatsache, dass die gemessenen Werte indirekt aus Fluoreszenzfarbstoffen abgeleitet sind. Als Alternative hierfür wäre die direkte Messmethode des Patch-Clamp-Verfahrens zu nennen. Diese Methode eignet sich für Neutrophile aber oft nur auf Umwegen und auf Kosten eines physiologischen Umgebungsmilieus. Dabei scheinen die Neutrophilen die Patch-Pipette als Fremdkörper zu erkennen, was zu einer artifiziellen Aktivierung führen und die Messwerte verfremden könnte [21, 56]. Zusätzlich zur sicheren Analyse der Neutrophilen äußert sich der Vorteil der Durchflusszytometrie durch die Möglichkeit, zahlreiche Parameter gleichzeitig messen zu können [114]. Dabei zeigten sich die Ergebnisse für IL-8 konsistent mit Daten, die für andere Chemotaxine wie PAF und C5a erhobenen wurden [26, 27, 54]. Gerade im Hinblick auf eine mögliche diagnostische Verwendung der physiologischen Parameter und ihrer Veränderungen, stellt die Durchflusszytometrie ein weit verbreitetes und - im Gegensatz zur Patch-Clamp-Methode - leicht zu erlernendes Verfahren dar.

Die hauptsächlich verwendete Konzentration von 50 ng / ml IL-8 überstieg die empirisch gemessenen Serumwerte von septischen Patienten [31, 74]. Generell ist es schwierig, eine septische IL-8 Konzentration zu definieren, da die Serumwerte großen Schwankungen unterliegen [44]. Des Weiteren übt IL-8 seine Funktion hauptsächlich parakrin aus und scheint sich in inflammatorischen Milieus anzureichern und dabei Konzentrationen zu erreichen, die mit der experimentell genutzten Konzentration von 50 ng / ml vergleichbar sind [53, 79]. Auch andere Studien benutzten für eine maximale Stimulation der Neutrophilen ähnlich hohe bzw. sogar höhere Konzentrationen an IL-8 [136, 137]. Demzufolge wird von deutlich höheren lokalen Gewebekonzentrationen ausgegangen, deren genaue Höhe und Relevanz in weiteren Experimenten zu eruieren ist. Auch die verwendete Konzentration von LPS war durchaus höher als in septischen Patienten festgestellt werden konnte [89]. Jedoch wurden die Neutrophilen lediglich für eine Stunde

stimuliert. In septischen Patienten liegen niedrigere Plasmakonzentrationen vor, aber die Patienten sind diesen über einen deutlich längeren Zeitraum hinweg ausgesetzt.

Im Rahmen des Screeningverfahrens zur Detektion möglicher zugrundeliegender Ionentransporterproteine und Signalmoleküle wurden einige Inhibitoren verwendet, die mit mehr als nur einem Protein interagieren. Dennoch konnte dadurch die Relevanz von Ionenströmen als Vermittler dieser physiologischen Reaktionen und als möglicher therapeutischer Ansatz hervorgehoben werden, ähnlich wie es vorherige Studien schon zeigen konnten [26, 27, 54, 77].

Um sich der klinischen Bedeutung der IL-8-vermittelten Effekte anzunähern, wurde ein Ex-vivo-Vollblutmodell verwendet. Eventuelle Störfaktoren wie z.B. im Modell durch LPS erzeugtes IL-8, welches für die Effekte verantwortlich sein könnte, konnte schon in einer anderen Studie ausgeschlossen werden [78]. Während der einstündigen Inkubationsphase waren zudem die physiologischen Parameter des Systems weitestgehend stabil (Tab. 2). Die systemische Endotoxinämie stellt jedoch nur einen Teil der komplexen und vielfältigen Sepsispathologie dar. Es sind weitere Studien notwendig, die einem sepsisähnlichen Komplex von inflammatorischen Mediatoren, aber auch die Interaktion von Blut mit anderen Organen thematisieren, welche im Schlauchsystem des Vollblutmodells nicht abgebildet werden konnten. Das übergeordnete Ziel einer patientennahen Labordiagnostik wurde mit der sekundengenauen durchflusszytometrischen Messung verfolgt. Erste Versuche demonstierten den Nutzen der Durchflusszytometrie im klinischen Alltag [50, 111]. Weitere Untersuchungen sollten in diesem Zusammenhang den Stellenwert einer sekundengenauen Messung, die eine der konventionellen Durchflusszytometrie gleichgestellte Methode ist, als diagnostische Methode darlegen [114].

4.5. Schlussfolgerung

Schwere Entzündungsreaktionen bedürfen eines kompetenten Immunsystems. Teil dieses vielfältigen Komplexes sind die neutrophilen Granulozyten, die die erste Verteidiungslinie des menschlichen Körpers gegen Pathogene darstellen. Eine exzessive Aktivierung der Neutrophilen durch verschiedene Gefahrenmoleküle kann zu einer Dysregulation mit anschließender Schädigung körpereigenen

Strukturen führen. In dieser Arbeit konnten die physiologischen Reaktionen auf Interleukin 8, einen prominenten proinflammatorischen Mediator, dargestellt werden. In-vitro- und ex-vivo-Experimente zeigten die relevante Desensibilisierung dieser Reaktionen in systemischer Inflammation, was ein Zeichen der Immundysfunktion ist. Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis der Sepsispathologie und der sie begleitenden Immundysfunktion. Zusammengefasst wirft all dies viele neue Fragen auf. Zeigen septische Patienten ähnliche Reaktionsmuster? Gibt es definierbare zugrundeliegende Signalwege, welche im besten Fall therapeutisch genutzt werden können? Eignet sich die Beschreibung von granulozytären Phänotypen als Diagnostikum in systemischer Inflammation? Ist die Übertragung der in Sepsis gewonnenen Erkenntnisse auf andere Entzündungsreaktionen, wie sie beispielsweise bei malignen Erkankungen auftreten möglich und sinnvoll [132]? Um den Antworten auf all diese Fragen näher zu kommen, sollte eine Übertragung der Ergebnisse auf septische Patienten erfolgen, damit gezeigt werden kann, ob diese Veränderungen in der menschlichen Sepsis eine Bedeutung haben. Zusätzlich sollten diese Veränderungen in den klinischen Kontext gesetzt werden. Dabei wären mögliche Korrelationen zwischen der Neutrophilenphysiologie und dem klinischen Verlauf einer Sepsis die Grundlage einer diagnostischen Nutzung. Dem folgend könnte eine Blockade für die physiologischen Reaktionen wichtiger Signalmoleküle, z.B. im Tierexperiment ein erster Schritt hin zu einer therapeutischen Nutzung sein.

Therapeutische, teils hochpräzise Eingriffe in das Immunsystem sind im klinischen Alltag angekommen. Dennoch sind diagnostische und therapeutische Ansätze am Immunsystem noch längst nicht abschließend verstanden und werden nicht in ihrem möglichen Maße verwendet. Der Weg von der pathologiebezogenen Medizin, auch im Kontext Sepsis, zu personaliserten Therapieansätzen hat gerade erst begonnen und das Immunsystem könnte bei diesem Bestreben ein zentraler Aspekt sein [37, 90].

5. ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Sepsis, definiert als lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer irregulären Immunantwort auf eine Infektion, ist weltweit eine der häufigsten Todesursachen. Der zentrale Aspekt der Sepsispathologie ist das Immunsystem. Dessen erste zelluläre Verteidigungslinie gegen pathogene Erreger bilden die neutrophilen Granulozyten. Darüber hinaus spielen lösliche Entzündungsmediatoren als Treiber der systemischen Inflammationen eine entscheidende Rolle, beispielsweise das Interleukin 8 (IL-8) als ein bedeutendes proinflammatorisches Chemotaxin. Elektrophysiologische Veränderungen, getrieben durch Chemotaxine, werden als möglicher Ansatz der Immundysfunktion Neutrophiler gesehen. Über die Auswirkungen von IL-8 auf die Neutrophilenphysiologie ist jedoch wenig bekannt. Daraus ergab sich folgende Hypothese: Interleukin 8 verursacht zentrale Änderungen der Physiologie neutrophiler Granulozyten, welche durch inflammatorische Zustände verändert werden.

Methoden: Kern der vorliegenden Arbeit war eine multiparametrische Bestimmung von intrazellulärem pH-Wert, Zellgröße, Membranpotential und Glukoseaufnahme mittels Durchflusszytometrie an isolierten, menschlichen Neutrophilen. Mögliche Signalstrukturen wurden mit Hilfe zahlreicher Inhibitoren untersucht. Zur Analyse der IL-8-vermittelten Reaktionsmuster unter inflammatorischen Bedingungen wurden in vitro und ex vivo Endotoxinämien simuliert und die Ergebnisse in einer neuartigen, sekundengenauen durchflusszytometrischen Messung abgebildet.

Ergebnisse: IL-8 führt bei Neutrophilen zu einer Depolarisation des Membranpotentials, intrazellulären Alkalinisierung, Größenzunahme, gesteigerten Glukoseaufnahme und Aktivierung der Chemotaxis. Der Einsatz zahlreicher Inhibitoren zeigte einige potenziell zugrundeliegende Signalwege auf, sowie den Zusammenhang von physiologischen Änderungen des intrazellulären pH-Werts und der Zellgröße mit der chemotaktischen Aktivität. Dabei erwiesen sich die Zellgröße und der intrazelluläre pH als unabhängig vom extrazellulären pH-Wert. Dagegen führte eine experimentelle Endotoxinämie zu einer relevanten Verminderung der IL-8-vermittelten Reaktionen. Diese Erkenntnisse konnten in einem Ex-Vivo-

Vollblutmodell und einer neu entwickelten, sekundengenauen durchflusszytometrischen Messung mit hoher Zeitauflösung bestätigt werden.

Diskussion/Schlussfolgerung: IL-8 erzeugt mehrere physiologische Veränderungen der Neutrophilen. Diese Veränderungen werden haupstächlich durch die Blockade von Na^+-Kanäle (Amilorid, NHE1) und der Calciumsignalwege (Thapsigargin, SKF-96365, W7) supprimiert. Systemische Exposition mit Lipopolysaccharid hat einen signifikanten Einfluss auf diese IL-8-induzierten zellulären Reaktionen. Diese Desensibilisierung der Neutrophilen gegenüber den Chemotaxinen könnte ein mögliches Kennzeichen eines veränderten oder gar dysfunktionalen Immunsystems sein. Weitere translationale Studien sind notwendig, um die Relevanz der Neutrophilenphysiologie in der Pathophysiologie septischer Patienten zu untersuchen und Möglichkeiten der diagnostischen oder therapeutischen Intervention zu eruieren.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allen T C, Kurdowska A: Interleukin 8 and Acute Lung Injury. Arch Pathol Lab Med: S. 266–269 (2014)

2. Altan-Bonnet G, Mukherjee R: Cytokine-mediated communication: a quantitative appraisal of immune complexity. Nat Rev Immunol: S. 205–217 (2019)

3. Angus D C, van der Poll T: Severe sepsis and septic shock. N Engl J Med: S. 840–851 (2013)

4. Arden L, Brunner T, Cerottini J: Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors. J Immunol Baltim Md 1950: S. 2928–2929 (1979)

5. Balkwill F R, Burke F: The cytokine network. Immunol Today: S. 299–304 (1989)

6. Berkamp S, Park S H, De Angelis A A, Marassi F M, Opella S J: Structure of monomeric Interleukin-8 and its interactions with the N-terminal Binding Site-I of CXCR1 by solution NMR spectroscopy. J Biomol NMR: S. 111–121 (2017)

7. Bernhard S, Hug S, Stratmann A E P, Erber M, Vidoni L, Knapp C L, Thomaß B D, Fauler M, Nilsson B, Nilsson Ekdahl K, Föhr K, Braun C K, Wohlgemuth L, Huber-Lang M, Messerer D A C: Interleukin 8 Elicits Rapid Physiological Changes in Neutrophils That Are Altered by Inflammatory Conditions. J Innate Immun S. 1–17 (2021)

8. Bertrand B, Wakabayashi S, Ikeda T, Pouysségur J, Shigekawa M: The Na+/H+ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. J Biol Chem: S. 13703–13709 (1994)

9. Bester J, Pretorius E: Effects of IL-1β, IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity. Sci Rep: S. 32188 (2016)

10. Bianchi M E: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. J Leukoc Biol: S. 1–5 (2007)

11. Boppana N B, Devarajan A, Gopal K, Barathan M, Bakar S A, Shankar E M, Ebrahim A S, Farooq S M: Blockade of CXCR2 signalling: A potential therapeutic target for preventing neutrophil-mediated inflammatory diseases. Exp Biol Med: S. 509–518 (2014)

12. Borregaard N, Schwartz J H, Tauber A I: Proton secretion by stimulated neutrophils. Significance of hexose monophosphate shunt activity as source of electrons and protons for the respiratory burst. J Clin Invest: S. 455–459 (1984)

13. Bozza F A, Salluh J I, Japiassu A M, Soares M, Assis E F, Gomes R N, Bozza M T, Castro-Faria-Neto H C, Bozza P T: Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. Crit Care: S. R49 (2007)

14. Brat D J, Bellail A C, Van Meir E G: The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoralangiogenesis. Neuro-Oncol: S. 122–133 (2005)

15. Bréchard S, Bueb J-L, Tschirhart E J: Interleukin-8 primes oxidative burst in neutrophil-like HL-60 through changes in cytosolic calcium. Cell Calcium: S. 531–540 (2005)

16. Burzynski L C, Humphry M, Pyrillou K, Wiggins K A, Chan J N E, Figg N, Kitt L L, Summers C, Tatham K C, Martin P B, Bennett M R, Clarke M C H: The Coagulation and Immune Systems Are Directly Linked through the Activation of Interleukin-1α by Thrombin. Immunity: S. 1033-1042.e6 (2019)

17. Chaplin D D: Overview of the immune response. J Allergy Clin Immunol: S. S3–S23 (2010)

18. Cheng Y, Ma X, Wei Y, Wei X-W: Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases. Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer: S. 289–312 (2019)

19. Coakley R J, Taggart C, McElvaney N G, O'Neill S J: Cytosolic pH and the inflammatory microenvironment modulate cell death in human neutrophils after phagocytosis. Blood: S. 3383–3391 (2002)

20. Cohen J, Vincent J-L, Adhikari N K J, Machado F R, Angus D C, Calandra T, Jaton K, Giulieri S, Delaloye J, Opal S, Tracey K, van der Poll T, Pelfrene E: Sepsis: a roadmap for future research. Lancet Infect Dis: S. 581–614 (2015)

21. 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)

22. DeCoursey T E: The intimate and controversial relationship between voltage-gated proton channels and the phagocyte NADPH oxidase. Immunol Rev: S. 194–218 (2016)

23. Delano M J, Ward P A: The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. Immunol Rev: S. 330–353 (2016)

24. Demaurex N, Downey G P, Waddell T K, Grinstein S: Intracellular pH regulation during spreading of human neutrophils. J Cell Biol: S. 1391–1402 (1996)

25. 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)

26. 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: S. 4846–4854 (2017)

27. 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: S. 143–155 (2017)

28. Detmers P A, Lo S K, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn Z A: Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. J Exp Med: S. 1155–1162 (1990)

29. Dinarello C A: Historical Review of Cytokines. Eur J Immunol: S. S34–S45 (2007)

30. Dinarello C A: Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. Immunol Rev: S. 8–27 (2018)

31. Endo S, Inada K, Ceska M, Takakuwa T, Yamada Y, Nakae H, Kasai T, Yamashita H, Taki K, Yoshida M: Plasma interleukin 8 and polymorphonuclear leukocyte elastase concentrations in patients with septic shock. J Inflamm: S. 136–142 (1995)

32. Epstein F H, Weiss S J: Tissue Destruction by Neutrophils. N Engl J Med: S. 365–376 (1989)

33. Erecińska M, Deas J, Silver I A: The effect of pH on glycolysis and phosphofructokinase activity in cultured cells and synaptosomes. J Neurochem: S. 2765–2772 (1995)

34. Fajgenbaum D C, June C H: Cytokine Storm. N Engl J Med: S. 2255–2273 (2020)

35. Fernandez-Caggiano M, Eaton P: Heart failure—emerging roles for the mitochondrial pyruvate carrier. Cell Death Differ: S. 1149–1158 (2021)

36. Gallo R L, Hooper L V: Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. Nat Rev Immunol: S. 503–516 (2012)

37. Gambardella V, Tarazona N, Cejalvo J M, Lombardi P, Huerta M, Roselló S, Fleitas T, Roda D, Cervantes A: Personalized Medicine: Recent Progress in Cancer Therapy. Cancers: S. 1009 (2020)

38. Gilmour P S, Rahman I, Donaldson K, MacNee W: Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol: S. L533–L540 (2003)

39. Gonzalez-Aparicio M, Alfaro C: Influence of Interleukin-8 and Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation in the Tumor Microenvironment: Is There a Pathogenic Role?. J Immunol Res: S. 1–7 (2019)

40. Gopcevic A, Mazul-Sunko B, Marout J, Sekulic A, Antoljak N, Siranovic M, Ivanec Z, Margaritoni M, Bekavac-Beslin M, Zarkovic N: Plasma Interleukin-8 as a Potential Predictor of Mortality in Adult Patients with Severe Traumatic Brain Injury. Tohoku J Exp Med: S. 387–393 (2007)

41. Grinstein S, Furuya W, Cragoe E J: Volume changes in activated human

neutrophils: The role of Na+/H+ exchange. J Cell Physiol: S. 33–40 (1986)

42. Grinstein S, Swallow C J, Rotstein O D: Regulation of cytoplasmic pH in phagocytic cell function and dysfunction. Clin Biochem: S. 241–247 (1991)

43. Ha H, Debnath B, Neamati N: Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. Theranostics: S. 1543–1588 (2017)

44. Hack C E, Hart M, van Schijndel R J, Eerenberg A J, Nuijens J H, Thijs L G, Aarden L A: Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. Infect Immun: S. 2835–2842 (1992)

45. Hagi A, Hayashi H, Kishi K, Wang L, Ebina Y: Activation of G-protein coupled fMLP or PAF receptor directly triggers glucose transporter type 1 (GLUT1) translocation in Chinese hamster ovary (CHO) cells stably expressing fMLP or PAF receptor. J Med Investig JMI: S. 19–28 (2000)

46. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K: Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. J Leukoc Biol: S. 559–564 (1994)

47. Hébert C A, Baker J B: Interleukin-8: A Review. Cancer Invest: S. 743–750 (1993)

48. Heit B, Tavener S, Raharjo E, Kubes P: An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. J Cell Biol: S. 91–102 (2002)

49. Henkels K M, Frondorf K, Gonzalez-Mejia M E, Doseff A L, Gomez-Cambronero J: IL-8-INDUCED NEUTROPHIL CHEMOTAXIS IS MEDIATED BY JANUS KINASE 3 (JAK3). FEBS Lett: S. 159–166 (2011)

50. Hesselink L, Heeres M, Paraschiakos F, ten Berg M, Huisman A, Hoefer I E, de Groot M C H, van Solinge W W, Dijkgraaf M, Hellebrekers P, Van Wessem K J P, Koenderman L, Leenen L P H, Hietbrink F: A Rise in Neutrophil Cell Size Precedes Organ Dysfunction After Trauma:. SHOCK: S. 439–446 (2019)

51. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M: Multiple control of interleukin-8 gene expression. J Leukoc Biol: S. 847–855 (2002)

52. van Hout G P J, van Solinge W W, Gijsberts C M, Teuben M P J, Leliefeld P H C, Heeres M, Nijhoff F, de Jong S, Bosch L, de Jager S C A, Huisman A, Stella P R, Pasterkamp G, Koenderman L J, Hoefer I E: Elevated mean neutrophil volume represents altered neutrophil composition and reflects damage after myocardial infarction. Basic Res Cardiol: S. 58 (2015)

53. Huber A, Kunkel S, Todd R, Weiss S: Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. Science: S. 99–102 (1991)

54. Hug S, Bernhard S, Stratmann A E P, Erber M, Wohlgemuth L, Knapp C L, Bauer J M, Vidoni L, Fauler M, Föhr K J, Radermacher P, Hoffmann A, Huber-Lang M, Messerer D A C: Activation of Neutrophil Granulocytes by Platelet-Activating Factor Is Impaired During Experimental Sepsis. Front Immunol: S. 642867 (2021)

55. Hughes C E, Nibbs R J B: A guide to chemokines and their receptors. FEBS J: S. 2944–2971 (2018)

56. 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)

57. Jiang H, Kuang Y, Wu Y, Xie W, Simon M I, Wu D: Roles of phospholipase C 2 in chemoattractant-elicited responses. Proc Natl Acad Sci: S. 7971–7975 (1997)

58. Jones S A, Dewald B, Clark-Lewis I, Baggiolini M: Chemokine Antagonists That Discriminate between Interleukin-8 Receptors. J Biol Chem: S. 16166–16169 (1997)

59. Kany S, Vollrath J T, Relja B: Cytokines in Inflammatory Disease. Int J Mol Sci: S.6008 (2019)

60. Kaur S, Bansal Y, Kumar R, Bansal G: A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. Bioorg Med Chem: S. 115327 (2020)

61. Kettritz R, Gaido M L, Haller H, Luft F C, Jennette C J, Falk R J: Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-α-mediated apoptosis of human neutrophils. Kidney Int: S. 84–91 (1998)

62. Kolaczkowska E, Kubes P: Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat Rev Immunol: S. 159–175 (2013)

63. Kubelkova K, Macela A: Innate Immune Recognition: An Issue More Complex Than Expected. Front Cell Infect Microbiol: S. 241 (2019)

64. Kumar S, Dikshit M: Metabolic Insight of Neutrophils in Health and Disease. Front Immunol: S. 2099 (2019)

65. Lee J, Horuk R, Rice G C, Bennett G L, Camerato T, Wood W I: Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. J Biol Chem: S. 16283–16287 (1992)

66. 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: S. 73 (2016)

67. Leong K, Gaglani B, Khanna A K, McCurdy M T: Novel Diagnostics and Therapeutics in Sepsis. Biomedicines: S. 311 (2021)

68. Lepidi H, Zaffran Y, Ansaldi J L, Mege J L, Capo C: Morphological polarization of human polymorphonuclear leucocytes in response to three different chemoattractants: an effector response independent of calcium rise and tyrosine kinases. J Cell Sci: S. 1771–1778 (1995)

69. Li D, Wu M: Pattern recognition receptors in health and diseases. Signal Transduct Target Ther: S. 291 (2021)

70. Li W P, Zhao G Y, Yang X K: Effects of Na(+) /H(+) exchanger 1 inhibitor on intestinal injury of rats with burn sepsis and the mechanism. Zhonghua Shao Shang Za Zhi Zhonghua Shaoshang Zazhi Chin J Burns: S. 349–354 (2017)

71. López-Cotarelo P, Gómez-Moreira C, Criado-García O, Sánchez L, Rodríguez-Fernández J L: Beyond Chemoattraction: Multifunctionality of Chemokine Receptors in Leukocytes. Trends Immunol: S. 927–941 (2017)

72. 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)

73. Marshall J S, Warrington R, Watson W, Kim H L: An introduction to immunology and immunopathology. Allergy Asthma Clin Immunol: S. 49 (2018)

74. Marty C, Misset B, Tamion F, Fitting C, Carlet J, Cavaillon J-M: Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin:. Crit Care Med: S. 673–679 (1994)

75. Maueröder C, Mahajan A, Paulus S, Gößwein S, Hahn J, Kienhöfer D, Biermann M H, Tripal P, Friedrich R P, Munoz L E, Neurath M F, Becker C, Schett G A, Herrmann M, Leppkes M: Ménage-à-Trois: The Ratio of Bicarbonate to CO2 and the pH Regulate the Capacity of Neutrophils to Form NETs. Front Immunol: S. 583 (2016)

76. Mayadas T N, Cullere X, Lowell C A: The Multifaceted Functions of Neutrophils. Annu Rev Pathol Mech Dis: S. 181–218 (2014)

77. 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: S. 2052356 (2018)

78. Messerer D A C, Vidoni L, Erber M, Stratmann A E P, Bauer J M, Braun C K, Hug S, Adler A, Nilsson Ekdahl K, Nilsson B, Barth E, Radermacher P, Huber-Lang M: Animal-Free Human Whole Blood Sepsis Model to Study Changes in Innate Immunity. Front Immunol: S. 571992 (2020)

79. Miller E J, Cohen A B, Matthay M A: Increased interleukin-8 concentrations in the pulmonary edema fluid of patients with acute respiratory distress syndrome from sepsis. Crit Care Med: S. 1448–1454 (1996)

80. Miller M, Mayo K: Chemokines from a Structural Perspective. Int J Mol Sci: S. 2088 (2017)

81. Miyoshi T, Yamashita K, Arai T, Yamamoto K, Mizugishi K, Uchiyama T: The role of endothelial interleukin-8/NADPH oxidase 1 axis in sepsis: Endothelial IL-8/Nox1 in sepsis. Immunology: S. 331–339 (2010)

82. 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)

83. Morgan R A, Yang J C, Kitano M, Dudley M E, Laurencot C M, Rosenberg S A: Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2. Mol Ther: S. 843–851 (2010)

84. Mukaida N: Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol: S. L566–L577 (2003)

85. Najder K, Rugi M, Lebel M, Schröder J, Oster L, Schimmelpfennig S, Sargin S, Pethő Z, Bulk E, Schwab A: Role of the Intracellular Sodium Homeostasis in Chemotaxis of Activated Murine Neutrophils. Front Immunol: S. 2124 (2020)

86. Nanda A, Grinstein S, Curnutte J T: Abnormal activation of H+ conductance in NADPH oxidase-defective neutrophils. Proc Natl Acad Sci: S. 760–764 (1993)

87. Nanda A, Gukovskaya A, Tseng J, Grinstein S: Activation of vacuolar-type proton pumps by protein kinase C. Role in neutrophil pH regulation. J Biol Chem: S. 22740–22746 (1992)

88. Opal S M: Endotoxins and other sepsis triggers. Contrib Nephrol: S. 14–24 (2010)

89. Opal S M, Scannon P J, Vincent J, White M, Carroll S F, Palardy J E, Parejo N A, Pribble J P, Lemke J H: Relationship between Plasma Levels of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS-Binding Protein in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock. J Infect Dis: S. 1584–1589 (1999)

90. Prucha M, Zazula R, Russwurm S: Immunotherapy of Sepsis: Blind Alley or Call for Personalized Assessment?. Arch Immunol Ther Exp (Warsz): S. 37–49 (2017)

91. Rajarathnam K, Prado G N, Fernando H, Clark-Lewis I, Navarro J: Probing Receptor Binding Activity of Interleukin-8 Dimer Using a Disulfide Trap. Biochemistry: S. 7882–7888 (2006)

92. Reeves E P, Williamson M, O'Neill S J, Greally P, McElvaney N G: Nebulized Hypertonic Saline Decreases IL-8 in Sputum of Patients with Cystic Fibrosis. Am J

Respir Crit Care Med: S. 1517–1523 (2011)

93. Richardson R M, Pridgen B C, Haribabu B, Ali H, Snyderman R: Differential Cross-regulation of the Human Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2. J Biol Chem: S. 23830–23836 (1998)

94. Ritter M, Schratzberger P, Rossmann H, Wöll E, Seiler K, Seidler U, Reinisch N, Kähler C M, Zwierzina H, Lang H J, Lang F, Paulmichl M, Wiedermann C J: Effect of inhibitors of Na+/H+-exchange and gastric H+/K+ ATPase on cell volume, intracellular pH and migration of human polymorphonuclear leucocytes. Br J Pharmacol: S. 627–638 (1998)

95. Rittirsch D, Flierl M A, Ward P A: Harmful molecular mechanisms in sepsis. Nat Rev Immunol: S. 776–787 (2008)

96. Rosales C: Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?. Front Physiol: S. 113 (2018)

97. Rose J J, Foley J F, Murphy P M, Venkatesan S: On the Mechanism and Significance of Ligand-induced Internalization of Human Neutrophil Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2. J Biol Chem: S. 24372–24386 (2004)

98. Rudd K E, Johnson S C, Agesa K M, Shackelford K A, Tsoi D, Kievlan D R, Colombara D V, Ikuta K S, Kissoon N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado F R, Reinhart K K, Rowan K, Seymour C W, Watson R S, West T E, Marinho F, Hay S I, Lozano R, Lopez A D, Angus D C, Murray C J L, Naghavi M: Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. The Lancet: S. 200–211 (2020)

99. Russo R C, Garcia C C, Teixeira M M, Amaral F A: The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. Expert Rev Clin Immunol: S. 593–619 (2014)

100. Sabroe I, Jones E C, Whyte M K B, Dower S K: Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. Immunology: S. 90–98 (2005)

101. Sadiku P, Walmsley S R: Hypoxia and the regulation of myeloid cell metabolic imprinting: consequences for the inflammatory response. EMBO Rep: S. 47388

(2019)

102. Schraufstatter I U, Chung J, Burger M: IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol: S. L1094–L1103 (2001)

103. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R: Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. Mediators Inflamm: S. 1–16 (2013)

104. Schuster D P, Brody S L, Zhou Z, Bernstein M, Arch R, Link D, Mueckler M: Regulation of lipopolysaccharide-induced increases in neutrophil glucose uptake. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol: S. L845–L851 (2007)

105. Simchowitz L: Intracellular pH modulates the generation of superoxide radicals by human neutrophils. J Clin Invest: S. 1079–1089 (1985)

106. Simchowitz L, Cragoe E J: Regulation of human neutrophil chemotaxis by intracellular pH. J Biol Chem: S. 6492–6500 (1986)

107. Simmen H-P, Battaglia H, Giovanoli P, Blaser J: Analysis of pH, pO2 and pCO2 in drainage fluid allows for rapid detection of infectious complications during the follow-up period after abdominal surgery. Infection: S. 386–389 (1994)

108. Simonet W S, Hughes T M, Nguyen H Q, Trebasky L D, Danilenko D M, Medlock E S: Long-term impaired neutrophil migration in mice overexpressing human interleukin-8. J Clin Invest: S. 1310–1319 (1994)

109. Singer M, Deutschman C S, Seymour C W, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard G R, Chiche J-D, Coopersmith C M, Hotchkiss R S, Levy M M, Marshall J C, Martin G S, Opal S M, Rubenfeld G D, van der Poll T, Vincent J-L, Angus D C: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA: S. 801–810 (2016)

110. Smith W B, Gamble J R, Clark-Lewis I, Vadas M A: Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. Immunology: S. 65–72 (1991)

111. Spijkerman R, Hesselink L, Hellebrekers P, Vrisekoop N, Hietbrink F, Leenen L P H, Koenderman L: Automated flow cytometry enables high performance point-

of-care analysis of leukocyte phenotypes. J Immunol Methods: S. 112646 (2019)

112. Steinman L: Elaborate interactions between the immune and nervous systems. Nat Immunol: S. 575–581 (2004)

113. Stillie R, Farooq S M, Gordon J R, Stadnyk A W: The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. J Leukoc Biol: S. 529–543 (2009)

114. Stratmann A E P, Wohlgemuth L, Erber M E, Bernhard S, Hug S, Fauler M, Vidoni L, Mohamed A O K, Thomaß B D, Münnich F, Stukan L, Föhr K J, Mannes M, Huber-Lang M S, Messerer D A C: Simultaneous Measurement of Changes in Neutrophil Granulocyte Membrane Potential, Intracellular pH, and Cell Size by Multiparametric Flow Cytometry. Biomedicines: S. 1504 (2021)

115. Sun J C, Beilke J N, Lanier L L: Adaptive immune features of natural killer cells. Nature: S. 557–561 (2009)

116. Swenson E R: Hypoxia and Its Acid–Base Consequences: From Mountains to Malignancy. Adv Exp Med Biol: S. 301–323 (2016)

117. Tamaoki T: Use and specificity of staurosporine, UCN-O1, and calphostin C as protein kinase inhibitors. Methods Enzymol: S. 340–347 (1991)

118. Teijeira A, Garasa S, Ochoa M del C, Cirella A, Olivera I, Glez-Vaz J, Andueza M P, Migueliz I, Alvarez M, Rodríguez-Ruiz M E, Rouzaut A, Berraondo P, Sanmamed M F, Perez Gracia J L, Melero I: Differential Interleukin-8 thresholds for chemotaxis and netosis in human neutrophils. Eur J Immunol: S. 2274–2280 (2021)

119. Thomas-Rueddel D O, Poidinger B, Weiss M, Bach F, Dey K, Häberle H, Kaisers U, Rüddel H, Schädler D, Scheer C, Schreiber T, Schürholz T, Simon P, Sommerer A, Schwarzkopf D, Weyland A, Wöbker G, Reinhart K, Bloos F: Hyperlactatemia is an independent predictor of mortality and denotes distinct subtypes of severe sepsis and septic shock. J Crit Care: S. 439.e1-439.e6 (2015)

120. Tilg H, Diehl A M: Cytokines in Alcoholic and Nonalcoholic Steatohepatitis. N Engl J Med: S. 1467–1476 (2000)

121. Tisoncik J R, Korth M J, Simmons C P, Farrar J, Martin T R, Katze M G: Into

the eye of the cytokine storm. Microbiol Mol Biol Rev MMBR: S. 16–32 (2012)

122. Trivedi B, Danforth W H: Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase. J Biol Chem: S. 4110–4112 (1966)

123. Turner M D, Nedjai B, Hurst T, Pennington D J: Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res: S. 2563–2582 (2014)

124. Tzur A, Moore J K, Jorgensen P, Shapiro H M, Kirschner M W: Optimizing Optical Flow Cytometry for Cell Volume-Based Sorting and Analysis. PLoS ONE: S. e16053 (2011)

125. Verploegen S, van Leeuwen C M, van Deutekom H W M, Lammers J-W J, Koenderman L, Coffer P J: Role of Ca2+/calmodulin regulated signaling pathways in chemoattractant induced neutrophil effector functions. Comparison with the role of phosphotidylinositol-3 kinase. Eur J Biochem: S. 4625–4634 (2002)

126. Villanueva E I, Almirol B J: The Accuracy of Mean Neutrophil Volume Relative to Blood Culture for the Diagnosis of Sepsis: A Meta-analysis. Philipp J Pathol: S. 18–22 (2017)

127. Volpin G, Cohen M, Assaf M, Meir T, Katz R, Pollack S: Cytokine Levels (IL-4, IL-6, IL-8 and TGFβ) as Potential Biomarkers of Systemic Inflammatory Response in Trauma Patients. Int Orthop: S. 1303–1309 (2014)

128. Wang M, Zhong D, Dong P, Song Y: Blocking CXCR1/2 contributes to amelioration of lipopolysaccharide-induced sepsis by downregulating substance P. J Cell Biochem: S. 2007–2014 (2019)

129. Weisdorf D J, Craddock P R, Jacob H S: Glycogenolysis versus glucose transport in human granulocytes: differential activation in phagocytosis and chemotaxis. Blood: S. 888–893 (1982)

130. Wiersinga W J, Leopold S J, Cranendonk D R, van der Poll T: Host innate immune responses to sepsis. Virulence: S. 36–44 (2014)

131. Wu D, Qi J: Mechanisms of the beneficial effect of NHE1 inhibitor in traumatic hemorrhage: inhibition of inflammatory pathways. Resuscitation: S. 774–781 (2012)

132. Xiong S, Dong L, Cheng L: Neutrophils in cancer carcinogenesis and metastasis. J Hematol OncolJ Hematol Oncol: S. 173 (2021)

133. Xue C, Li G, Bao Z, Zhou Z, Li L: Mitochondrial pyruvate carrier 1: a novel prognostic biomarker that predicts favourable patient survival in cancer. Cancer Cell Int: S. 288 (2021)

134. Yan S R, Al-Hertani W, Byers D, Bortolussi R: Lipopolysaccharide-Binding Protein- and CD14-Dependent Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase p38 by Lipopolysaccharide in Human Neutrophils Is Associated with Priming of Respiratory Burst. Infect Immun: S. 4068–4074 (2002)

135. Yang M: Systemic inflammation and multiple organ injury in traumatic hemorrhagic shock. Front Biosci: S. 927–933 (2015)

136. Yasuaki S, Daniels R H, Elmore M A, Finnen M J, Hill M E, Lackie J M: Agonist-stimulated Cl− efflux from human neutrophils. Biochem Pharmacol: S. 1743–1751 (1993)

137. Yuo A, Kitagawa S, Kasahara T, Matsushima K, Saito M, Takaku F: Stimulation and priming of human neutrophils by interleukin-8: cooperation with tumor necrosis factor and colony-stimulating factors. Blood: S. 2708–2714 (1991)

138. Zhang J, Bai C: Elevated Serum Interleukin-8 Level as a Preferable Biomarker for Identifying Uncontrolled Asthma and Glucocorticosteroid Responsiveness. Tanaffos: S. 260–269 (2017)

139. Zhang J-M, An J: Cytokines, Inflammation, and Pain. Int Anesthesiol Clin: S. 27–37 (2007)

7. DANKSAGUNG

Aus Gründen des Datenschutzes wurde die Danksagung entfernt.

8. LEBENSLAUF

Aus Gründen des Datenschutzes wurde der Lebenslauf entfernt.

Aus Gründen des Datenschutzes wurde der Lebenslauf entfernt.

Aus Gründen des Datenschutzes wurde der Lebenslauf entfernt.