

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Arnold

Medizinische Poliklinik

Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. P. von Wichert

**Stimulation β -adrenerger Rezeptoren
auf neutrophilen Granulozyten**

**Effekte auf Adhäsionsmoleküle, Zytokine
und intrazelluläre Botenstoffe**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Timm Greulich

aus Berlin

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin

der Philipps-Universität Marburg am 24.02.2005

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. P. v. Wichert

Correferent: Frau PD Dr. Jaques

Forschen wir zuerst nach den Gesetzen der Erscheinung;
erst, wenn diese erkannt sind, darf der Geist die größere Forschung
nach den Gründen der Erscheinung beginnen.

R. Virchow

Ich denke des Nachts an mein Saitenspiel
und rede mit meinem Herzen;
mein Geist muss forschen.

Psalm 77,6

I. Einleitung	10
1. Allgemeines zur Immunabwehr	10
2. Neutrophile Granulozyten	11
2.1. Entwicklung und Struktur der neutrophilen Granulozyten	12
2.2. Funktionen und sekretorische Aktivitäten der neutrophilen Granulozyten	13
2.3. Aktivierung von neutrophilen Granulozyten	16
3. Katecholamine	16
3.1. Struktur, Biosynthese und Sekretion von Katecholaminen	16
3.2. Molekularer Wirkmechanismus der Katecholamine	18
3.2.1. α_1 -Adrenozeptoren	18
3.2.2. α_2 -Adrenozeptoren	19
3.2.3. β -Adrenozeptoren	19
3.3. Biologische Wirkungen von Katecholaminen	20
4. Wechselwirkungen zwischen Katecholaminen und dem Immunsystem	22
4.1. Stress und Immunfunktion	22
4.1.1. Akuter psychischer Stress und Immunfunktion	22
4.1.2. Körperliche Belastung und Immunfunktion	23
4.2. Adrenozeptoren auf Zellen des Immunsystems	24
4.3. Effekte von Katecholaminen auf neutrophile Granulozyten	25
5. Adhäsionsmoleküle	25
5.1. Einteilung und Struktur der Adhäsionsmoleküle	26
5.2. Adhäsionsmoleküle als Mediatoren der Leukozytenwanderung	29
5.3. Kurze Darstellung der drei untersuchten Adhäsionsmoleküle	29
5.3.1. Lewis ^X (CD15)	29
5.3.2. CD44	30
5.3.3. CD54 (ICAM-1)	30

6. Zytokine und Chemokine	31
6.1. Die Nomenklatur der Chemokine	31
6.2. Strukturelle und funktionelle Einteilung der Chemokine	34
6.3. Chemokin-produzierende Zellen des Immunsystems	35
6.3.1. Chemokine in Monozyten	35
6.3.2. Chemokine in Lymphozyten	36
6.3.3. Chemokine in Granulozyten	36
6.4. Biologische Aktivitäten der Chemokine	36
6.4.1. Effekte auf Monozyten	36
6.4.2. Effekte auf neutrophile Granulozyten	37
6.4.3. Effekte auf Lymphozyten	37
6.4.4. Nicht-chemotaktische Effekte	37
6.5. Kurze Darstellung der drei untersuchten Zytokine	38
6.5.1. TNF- α	38
6.5.2. IL-6	38
6.5.3. IL-8	39
7. Zielsetzung	39
II. Material und Methoden	41
1. Materialien	41
1.1. Medien, Geräte	41
1.2. Zellen	41
1.3. Standardbedingungen der Zellkulturen	41
1.4. Chemikalien	42
1.4.1. Medien und Medienzusätze	42
1.4.2. Farbstoffe	42
1.4.3. Monoklonale Antikörper	42
1.4.4. Sonstige	43
2. Methoden	44
2.1. Isolierung und Anreicherung humaner Granulozyten	44

2.1.1. Die Ficoll-Hypaque-Methode	44
2.1.2. Zellzahlbestimmung	45
2.1.3. Immunomagnetische Elimination von T-Lymphozyten	45
2.2. Isolierung und Anreicherung humaner Blutmonozyten	46
2.2.1. Separation der PBMC-Fraktion nach Dichtegradientenzentrifugation	46
2.2.2. Elutriation (Gegenflusszentrifugation)	47
2.3. Bestimmung der Vitalität	48
2.4. Bestimmung der Zellreinheit	49
2.4.1. Färbung mit Diff-Quick®	49
2.4.2. Analyse in der Durchflusszytometrie	49
2.4.3. Analyse in der CASY1-Apparatur	49
2.5. Kultivierung neutrophiler Granulozyten	50
2.5.1. Inkubation neutrophiler Granulozyten	50
2.5.2. Stimulation neutrophiler Granulozyten	50
2.5.3. Inkubation neutrophiler Granulozyten zur Untersuchung der Neusynthese von Zytokinen	51
2.5.4. Entnahme von neutrophilen Granulozyten aus den 24-Loch-Platten	52
2.6. Besonderheiten bei der Kultivierung humaner Monozyten	52
2.7. Messung des Kalzium-Influx	52
2.7.1. Prinzip der Messung	53
2.7.2. Vorbereitung der Messung	54
2.7.3. Messvorgang	55
2.8. Messung des cAMP-Spiegels	55
2.8.1. Prinzip der Messung	56
2.8.2. Durchführung des cAMP-Assays	56
2.9. Durchflusszytometrie im FACScan®	57
2.9.1. Arbeitsprinzip eines Durchflusszytometers	57
2.9.2. Aufbau eines Durchflusszytometers	58
2.9.3. Messung der Lichtstreuung	59
2.9.4. Messung der Fluoreszenz	59
2.9.5. Datenauswertung	60
2.9.6. Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen	62
2.9.7. Besonderheiten bei der Färbung intrazellulärer Zytokine	64

2.9.8. Durchführung der Negativ-Kontrollen	65
2.10. Statistische Auswertung	66
III. Ergebnisse	67
1. Vitalität, Menge und Reinheit der isolierten Zellen	67
1.1. Immunomagnetische Elimination von T-Lymphozyten	68
1.2. Elutriation von neutrophilen Granulozyten	69
2. Intrazelluläre Botenstoffe nach Adrenalin-Stimulation	71
2.1. Messung des intrazellulären cAMP-Spiegels	71
2.2. Messung des Kalzium-Influx	73
2.2.1. Etablierung der Methode	73
2.2.2. Stimulation mit Adrenalin bzw. Noradrenalin	74
3. Expression von Oberflächenproteinen	75
3.1. Stimulation mit LPS	75
3.1.1. Expression nach 6-stündiger Stimulation mit LPS	76
3.1.2. Expression nach 12-stündiger Inkubation mit LPS	79
3.1.3. Expression nach 18-stündiger Inkubation mit LPS	83
3.2. Stimulation unstimulierter Zellen mit Adrenalin	87
3.2.1. 6-stündige Inkubation unstimulierter Zellen mit Adrenalin	87
3.2.2. 12-stündige Inkubation unstimulierter Zellen mit Adrenalin	88
3.2.3. 18-stündige Inkubation unstimulierter Zellen mit Adrenalin	91
3.3. Stimulation vorstimulierter Zellen mit Adrenalin	94
3.3.1. 6-stündige Inkubation vorstimulierter Zellen mit Adrenalin	94
3.3.2. 12-stündige Inkubation vorstimulierter Zellen mit Adrenalin	96
3.3.3. 18-stündige Inkubation vorstimulierter Zellen mit Adrenalin	98
4. Kinetik der Expression von Oberflächenproteinen	99
4.1. Stimulation mit LPS	99
4.1.1. Expression von CD15 im zeitlichen Verlauf nach LPS-Stimulation	100
4.1.2. Expression von CD44 im zeitlichen Verlauf nach LPS-Stimulation	101
4.1.3. Expression von CD54 im zeitlichen Verlauf nach LPS-Stimulation	102

4.2. Stimulation mit Adrenalin	103
4.2.1. Expression von CD15 im zeitlichen Verlauf nach Adrenalin-Gabe	103
4.2.2. Expression von CD44 im zeitlichen Verlauf nach Adrenalin-Gabe	104
4.2.3. Expression von CD54 im zeitlichen Verlauf nach Adrenalin-Gabe	105
4.3. Adrenalin-Stimulation vorstimulierter Zellen	106
4.3.1. Expression von CD15 auf vorstimulierten Zellen nach Adrenalin-Gabe	106
4.3.2. Expression von CD44 auf vorstimulierten Zellen nach Adrenalin-Gabe	107
4.3.3. Expression von CD54 auf vorstimulierten Zellen nach Adrenalin-Gabe	108
5. Produktion von Zytokinen	109
5.1. Etablierung der Methode	109
5.2. Negativ-Kontrollen	110
5.3. Stimulation mit LPS und Adrenalin	111
6. Zusammenfassung der Ergebnisse	113
6.1. Signaltransduktion adrenerger Rezeptoren	113
6.2. Expression von Adhäsionsmolekülen	113
6.3. Produktion von Zytokinen	113
IV. Diskussion	115
1. Isolierung und Reinheit der neutrophilen Granulozyten	115
2. Adrenozeptoren und deren intrazelluläre Botenstoffe	116
3. Expression von Adhäsionsmolekülen	117
3.1. CD15 auf neutrophilen Granulozyten	117
3.2. CD44 auf neutrophilen Granulozyten	119
3.3. CD54 auf neutrophilen Granulozyten	121
4. Zytokin-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten	123
5. Katecholamine und neutrophile Granulozyten	127

V. Zusammenfassung	131
VI. Anhang	133
1. Literaturverzeichnis	133
2. Abkürzungsverzeichnis	152
3. Messergebnisse	154
3.1. Adhäsionsmoleküle	154
3.1.1. CD15 auf unstimulierten Zellen	154
3.1.2. CD15 auf LPS-stimulierten Zellen	155
3.1.3. CD44 auf unstimulierten Zellen	156
3.1.4. CD44 auf LPS-stimulierten Zellen	157
3.1.5. CD54 auf unstimulierten Zellen	158
3.1.6. CD54 auf LPS-stimulierten Zellen	159
3.2. IL-8	160
4. Lebenslauf	161
5. Verzeichnis der akademischen Lehrer	163
6. Danksagung	164
7. Ehrenwörtliche Erklärung	165

I. Einleitung

1. Allgemeines zur Immunabwehr

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes funktionelles System zur Erhaltung des Individuums und aller seiner Strukturen durch Abwehr körperfremder Substanzen. Es besteht aus ca. 10^{12} Zellen, die zwischen Blut und Lymphe zirkulieren, in anatomisch definierten Ansammlungen der primären und sekundären lymphatischen Organe vorkommen oder als vereinzelte Zellen in fast allen Geweben anzutreffen sind. Die Fähigkeit dieser Zellen zu zirkulieren sowie der ständige Austausch zwischen Blut, Lymphe und Gewebe sind von entscheidender Bedeutung für die Erkennung körperfremder Stoffe, insbesondere Krankheitserreger, und deren Elimination.

Das Immunsystem lässt sich zunächst in zwei funktionelle Untereinheiten unterteilen, in das unspezifische und das spezifische Immunsystem (Roitt et al., 1987). Träger der spezifischen Immunantwort sind die Lymphozyten. Bei der spezifischen Immunantwort unterscheidet man zwischen humoraler Immunität, die von B-Zellen vermittelt wird, und zellulärer Immunität, die von T-Zellen vermittelt wird. Humorale und zelluläre Immunität stehen über vielfältige Verknüpfungen miteinander in Verbindung. Die unspezifische Immunität, also die ohne spezifische Antigenerkennung vermittelte Immunität, ist die erste Verteidigungslinie gegen Infektionen aller Art. Die meisten potentiellen Krankheitserreger werden unschädlich gemacht, bevor sie eine klinisch erkennbare Infektion verursachen können. Funktionsträger der unspezifischen Immunabwehr sind auf der zellulären Seite die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und die Phagozyten, zu denen Granulozyten sowie Monozyten und Makrophagen gehören. Auf der Seite der löslichen Faktoren sind es z. B. Lysozym, Faktoren des Komplement-Systems und Akute-Phase-Proteine. Auch die Bestandteile der unspezifischen Immunität müssen als vielfach miteinander verwoben und funktionell voneinander abhängig betrachtet werden.

2. Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (kürzer: Neutrophile oder polymorphnukleäre Leukozyten, PMN) stellen die erste, schnell mobilisierbare Leukozytenbarriere der unspezifischen Immunabwehr gegen bakterielle sowie mykologische Infektionen dar. Mit 55-65 % im Differentialblutbild der weißen Blutkörperchen bilden sie die Mehrheit der zirkulierenden Leukozyten; der größte Anteil der Neutrophilen befindet sich jedoch im Knochenmark. Pro Tag werden durchschnittlich 10 Billionen Zellen gebildet, bei einer akuten bakteriellen Infektion kann diese Zahl innerhalb von drei Tagen aber noch verzehnfacht werden. Die Lebenszeit von neutrophilen Granulozyten beträgt 3-4 Tage. Ihre Fähigkeit, schon auf geringe chemotaktische Reize reagieren zu können, lässt sie die ersten Zellen an Orten bakterieller Infektion und zerfallenden Gewebes sein. Ihre Hauptfunktion im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr besteht in der Phagozytose und dem intrazellulären Abtöten von Bakterien, worin sie den Makrophagen gleichen. Im Gegensatz zu den Makrophagen spielt bei den Neutrophilen ihrer kurzen Lebenszeit entsprechend eher ihre große Anzahl die entscheidende Rolle als die Fähigkeit, sich mit invasiven Mikroorganismen über einen längeren Zeitraum auseinander setzen zu können (Gemsa et al., 1997). Im Rahmen der immunologischen Auseinandersetzung setzen die polymorphnukleären Leukozyten eine Reihe vasoaktiver Substanzen frei, die als die Hauptursache für das Auftreten der vier klassischen Entzündungszeichen (Rubor, Calor, Dolor, Tumor) gelten.

Die hier dargestellte Funktion der neutrophilen Granulozyten definiert sie als Teil des unspezifischen Immunsystems. In letzter Zeit weisen immer mehr Befunde darauf hin, dass Neutrophile auch eine Funktion im afferenten Schenkel des spezifischen Immunsystems haben könnten. Hier könnten sie durch die Produktion von Chemokinen sich selbst und andere Zellen aktivieren oder zu den Orten immunologischer Auseinandersetzung leiten (Cassatella et al., 1995).

2.1. Entwicklung und Struktur der neutrophilen Granulozyten

Wie alle Blutzellen entwickeln sich auch die Vorläuferzellen der Granulozyten aus den pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Unter dem Einfluss verschiedener Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (colony-stimulating factors, CSF) unterteilt sich die Linie zunächst in lymphozytäre und myeloische Stammzellen. IL-3 induziert die Differenzierung der myeloischen Reihe in vier weitere Zelllinien. Es entstehen die erythrozytäre, die megakaryozytäre (aus der später Thrombozyten entstehen), die eosinophil-granulozytäre und die granulozytär-monozytäre Linie. Aus der letztgenannten reifen unter dem Einfluss von granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) im Knochenmark aus den Vorläuferzellen die Myeloblasten und über die Zwischenstufen Promyelozyt, Myelozyt und Metamyelozyt schließlich die reifen Granulozyten. Der Prozess der Granulopoiese wird durch verschiedene Zytokine moduliert, die nach ihrer Funktion in zwei Gruppen unterteilt werden können. Die Faktoren der Gruppe 1, zu denen beispielsweise IL-3, IL-6, granulocyte-macrophage-CSF (GM-CSF) und stem cell factor (SCF) gehören, beeinflussen die Proliferation und Differenzierung der unreifen Vorläuferzellen. Die Faktoren der Gruppe 2, zu denen G-CSF, macrophage-CSF (M-CSF) und Erythropoietin gehören, bewirken die weitere Differenzierung in linienspezifische Vorläuferzellen. Die Produktion dieser Zytokine wird durch die inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 stimuliert, die ihrerseits verstärkt während bakterieller Infektionen freigesetzt werden. So ist gewährleistet, dass die Immunabwehr beim Eindringen von Mikroben sofort den Erfordernissen angepasst wird.

Im Laufe der Entwicklung unterliegen die Zellorganellen der neutrophilen Granulozyten starken Veränderungen. Der Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum werden stark verkleinert, die Anzahl der Mitochondrien und Ribosomen vermindert sich. Das hat zur Folge, dass reife polymorphkernige Leukozyten bei der Energiegewinnung hauptsächlich auf anaerobe Prozesse zurückgreifen müssen und dass sie nur noch eine reduzierte Proteinsyntheserate aufweisen, was ihre relativ kurze Lebensdauer hinreichend erklären kann (Gemsa et al., 1997). Auch die Form des Zellkerns verändert sich während der verschiedenen Reifestadien der neutrophilen Granulozyten. Bei den Jugendformen der Granulozyten ist er noch stabkernig (weshalb Zellen in diesem Stadium auch als Stabkernige bezeichnet werden) und im Laufe der Reifung kondensiert er; im reifen Stadium besteht der

Kern schließlich aus mehreren, meist drei Segmenten, die durch feine Chromatinfäden miteinander verbunden sind. Die Anzahl der Segmente steigt mit zunehmender Alterung, so dass alte neutrophile Granulozyten als Hypersegmentierte gesehen und bezeichnet werden können. Die reifen polymorphkernigen Leukozyten haben einen Durchmesser von 9-12 μm . Kennzeichnend für ihr Zytoplasma ist das Vorkommen ungefähr 50-200 membranumschlossener, neutrophiler Granula.

Etwa 60 % des Knochenmarks sind für die laufende Produktion von neutrophilen Granulozyten angelegt. Pro Minute werden ca. 80 Millionen Zellen gebildet. Nach dem Verlassen des Knochenmarks zirkulieren neutrophile Granulozyten 8-10 Stunden im Blut, wobei sich etwa 65 % der Zellen wandständig im kapillaren Netzwerk befinden (Margination) und bei Bedarf, z. B. im Fall einer Entzündung, rasch mobilisiert werden können (Athens et al., 1961). Besonders das Kapillarbett der Lungen und des Darmes beherbergt einen Großteil der randständigen Neutrophilen (Biermann et al., 1952).

2.2. Funktionen und sekretorische Aktivitäten der neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten besitzen einen hohen Gehalt an Granula. Man unterscheidet primäre (azurophile) und sekundäre (spezifische) Granula. Auch ein dritter, Gelatinase enthaltender Typ ist beschrieben worden, dessen Funktionen aber noch weitgehend unklar sind.

Die Granula werden im Golgi-Apparat gebildet, jedoch an verschiedenen Untereinheiten und während unterschiedlicher Differenzierungsstadien der Zellen. Als erste treten die primären oder azurophilen Granula im Stadium der Promyelozyten auf; sie machen in der reifen Zelle etwa ein Drittel aller Granula aus. Primäre Granula enthalten degradierende Enzyme, wie z. B. Myeloperoxidase, Lysozym, saure Hydrolasen und antimikrobizide kationische Proteine. Ihre Funktion erfüllen sie vor allem im intrazellulären Milieu, wo sie mit phagozytiertem Material zu Phagolysosomen verschmelzen und somit direkt in die Degradation von in den Organismus eingedrungenen und phagozytierten Mikroorganismen involviert sind.

Sekundäre oder spezifische Granula treten erstmals im Stadium der Myelozyten auf. Sie enthalten die leukozytenspezifischen Proteine Lactoferrin und Vitamin B₁₂-

bindendes Protein. Im Gegensatz zu primären Granula werden sie durch Exozytose in den Extrazellularraum freigesetzt. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als Degranulation. Neben verschiedenen proinflammatorischen Substanzen enthalten die sekundären Granula auch Membrankomponenten, wie z. B. Rezeptoren für C3b, Laminin und Formylpeptide, an der Signaltransduktion beteiligte G-Proteine, Cytochrom b 558, Plasminogenaktivator und alkalische Phosphatase (Paul et al., 1993). Die Translokation dieser Komponenten auf die Zelloberfläche ist von großer Bedeutung für die Margination von polymorphkernigen Leukozyten im Kapillarbett, für die Adhärenz an Endothelzellen, das Durchwandern von Gefäßwänden (Diapedese), die gerichtete Migration entlang einem aufsteigenden chemischen Konzentrationsgradienten (Chemotaxis), die Aktivierung des mikrobiziden Stoffwechselweges und die Regulation einer Entzündung.

Über diese präformierten Granulabestandteile hinaus besitzen neutrophile Granulozyten die Fähigkeit, auf entsprechende Stimulation mit der Neosynthese von plättchenaktivierendem Faktor (PAF), Eicosanoiden wie Leukotrien B₄ oder Prostaglandin E₂ und der Freisetzung von aktivierten und somit reaktiven Sauerstoffmetaboliten zu antworten. Auch diese Mediatoren besitzen vorwiegend entzündungsfördernde Eigenschaften (Gemsa et al., 1997).

Einige Autoren (zusammengefasst bei Cassatella et al., 1995) sprechen den neutrophilen Granulozyten auch immunmodulatorische Funktionen zu. Die Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen wie auch von antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch neutrophile Granulozyten ist nach wie vor Gegenstand aktueller Diskussionen. Neben IL-8, IL-1 β und TNF- α , für die es inzwischen viele Fürsprecher gibt, werden in diesem Zusammenhang auch TGF- β , MIP-1 α , IL-3, GM-CSF und IFN- α genannt.

Zusammenfassend lassen sich die Hauptfunktionen der neutrophilen Granulozyten wie folgt darstellen (Gemsa et al., 1997):

- (1) Phagozytose von Mikroorganismen, Abbau von Zelltrümmern und Fremdstoffen
- (2) Keimabtötung
- (3) Synthese von Entzündungsmediatoren.

Viele Daten aus der jüngeren Vergangenheit weisen darauf hin, dass eine entscheidende Funktion der neutrophilen Granulozyten auch in der Synthese und Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen liegt (Cassatella et al., 1995). Diese Funktion kann aber noch nicht als gesichert gelten. Eine Übersicht der wichtigsten Granulozytenprodukte und ihrer Funktion im Immunsystem ist in Tab. 1 dargestellt:

Gruppe	Substanz	Funktion
Primäre (azurophile) Granula	Saure Hydrolasen	Zerstörung von SH-Brücken
	Kollagenasen, Elastase	Abbau von Kollagen, Gewebeerstörung
	Myeloperoxidase	Degradation von Wasserstoffperoxid
Sekundäre (spezifische) Granula	Komplementaktivatoren	Chemotaxis und Opsonisierung
	Chemotaktische Proteine	Rekrutierung von Leukozyten
	Lactoferrin	Adhärenz der Neutrophilen
	fMLP-Rezeptoren	Chemotaxis
	CR3	Adhärenz, Margination, Phagozytose
	Plasminogenaktivator	Spaltung von C5a aus C5
Aktivierungsinduzierte Proteine	PAF, Eicosanoide	Entzündungsmediatoren
	Aktivierte Sauerstoffprodukte	Oxidation

Tab. 1 zeigt Granulozytenprodukte und ihre Funktionen (modifiziert nach Paul et al., 1993).

2.3. Aktivierung von neutrophilen Granulozyten

Eine Invasion des Gewebes durch neutrophile Granulozyten wird überwiegend bei bakteriellen Infektionen sowie bei akuten Zellnekrosen gefunden. Hierbei kommt es zu einer verstärkten Freisetzung chemotaktisch wirkender Substanzen, wie z. B. C5a, Leukotrien B₄ und Chemokinen, welche durch Endothelzellen auf ihrer Oberfläche präsentiert werden. Weiterhin bewirkt die Entzündungsreaktion die Aktivierung von Endothelzellen, wodurch eine verstärkte Produktion weiterer chemotaktischer Faktoren hervorgerufen wird. Die angelockten neutrophilen Granulozyten werden bereits in der Zirkulation durch diese chemotaktisch wirkenden Substanzen voraktiviert (Priming). Hierbei kommt es zu einer stark erhöhten Expression von Rezeptoren für chemotaktisch wirkende Substanzen sowie Rezeptoren für eine erhöhte Adhärenz. Es kommt zur Diapedese der Zellen und dem Einwandern in das Entzündungsgebiet entlang eines chemotaktischen Gradienten. Im Entzündungsgebiet entwickeln die polymorphkernigen Leukozyten ihre volle Aktivität. Dazu gehören die Phagozytose opsonisierter Partikel und die dabei auftretende Freisetzung biologisch aktiver Substanzen (Abramson et al., 1993).

Da neutrophile Granulozyten nur in geringem Maße zur Proteinneosynthese fähig sind, sterben sie sehr rasch nach Phagozytose und intrazellulärer Abtötung von Mikroorganismen. Die bei der Autolyse der Neutrophilen anfallenden Zerfallsprodukte und unvollständig abgebauten Bestandteile der Mikroorganismen sind für die Aufrechterhaltung der weiteren Entzündungsreaktion verantwortlich.

3. Katecholamine

3.1. Struktur, Biosynthese und Sekretion von Katecholaminen

Adrenalin und Noradrenalin werden zusammen mit Dopamin als körpereigene Katecholamine bezeichnet, da sie chemische Derivate des Katechols (1,2-Dihydroxybenzol) sind. Der Ausgangspunkt für die Biosynthese der Katecholamine ist Phenylalanin. Über das Zwischenprodukt p-Tyrosin, welches durch die Tyrosinhydroxylase zu Dopa hydroxyliert wird, entsteht Dopamin. Dopamin wird durch die Dopamin- β -Hydroxylase im Nebennierenmark sowie in den postganglionären Neuronen zu Noradrenalin hydroxyliert. Mit Hilfe der Phenylethanolamin-N-

methyltransferase erfolgt als letzte Reaktion der Adrenalin-Synthese die N-Methylierung von Noradrenalin zu Adrenalin.

Da die Bedeutung der Katecholamine für Stressreaktionen aller Art sehr groß ist, muss die Synthese genau reguliert sein. Nervale, über nicotinische Acetylcholinrezeptoren vermittelte Impulse sind für die Aktivierung der Katecholaminsynthese verantwortlich, indem sie die Neosynthese der beiden Enzyme Tyrosinhydroxylase und Phenylethanolamin-N-methyltransferase induzieren. Glucocorticoide wirken als schwache Induktoren der Tyrosinhydroxylase und als starke der Phenylethanolamin-N-methyltransferase. Weil Katecholamine wiederum die CRH- und ACTH-Produktion im Hypothalamus und in der Adenohypophyse stimulieren, ergeben sich hiermit Verstärkersysteme, die es dem Organismus erlauben, in kurzer Zeit große Mengen von Katecholaminen zu produzieren. Im Sinne eines negativen Feedbacks vermindern Adrenalin und Noradrenalin die Katecholaminsynthese, indem sie die Tyrosinhydroxylase und die Phenylethanolamin-N-methyltransferase allosterisch hemmen (nach Löffler et al., 1997).

Die Sekretion der Katecholamine wird durch nervale Reize ausgelöst. Sowohl in den sympathischen Nervenendigungen als auch im Nebennierenmark werden Katecholamine in membranumhüllten Granula gespeichert und konzentriert. Bei der Katecholaminsekretion wandern die Sekretgranula zur Zellmembran, um mit ihr zu verschmelzen. Dabei wird der Granulainhalt (neben den Katecholaminen auch noch ATP, das Enzym Dopamin- β -Hydroxylase sowie Chromogranine) in den Extrazellularraum abgegeben. Der Stimulus für die Ausschüttung des gespeicherten Noradrenalins in den sympathischen Nervenendigungen ist eine Erregung der präganglionären Neurone, die daraufhin Acetylcholin freisetzen, das als chemischer Transmitter wirkt. Aus entwicklungsgeschichtlichen Gründen bewirken ähnliche Mechanismen auch die Katecholamin-Ausschüttung aus dem Nebennierenmark. Auch hier wird Acetylcholin als Transmitter von den die sekretorischen Zellen innervierenden präganglionären Neuronen freigesetzt und löst dann die Hormonsekretion aus.

3.2. Molekularer Wirkmechanismus der Katecholamine

Noradrenalin und Adrenalin lösen ihre Wirkungen über α_1 -, α_2 -, β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren aus. Bei allen Adrenozeptoren handelt es sich um transmembrane Proteine mit sieben Helixstrukturen in den Membranen der Effektorzellen sowie Schleifen und je einer Endkette auf der extrazellulären Seite (Rezeptor) und auf der intrazellulären Seite (für die Kopplung an die intrazellulären Signalwege). Die ersten Schritte der weiteren Signaltransduktion sind bekannt und differieren unter den verschiedenen Rezeptoren.

3.2.1. α_1 -Adrenozeptoren

Die Bindung entsprechender Liganden an α_1 -Rezeptoren aktiviert ein G-Protein der G_q -Familie, welches die phosphatidylinositspezifische Phospholipase C (PI-PLC) stimuliert. Als second messenger entstehen Inosit-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 setzt aus dem endoplasmatischen Reticulum (ER) Kalzium frei, während Diacylglycerin die Proteinkinase C aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert spezifische (oft Ca^{2+} -abhängige) Zielproteine (siehe Abb.1).

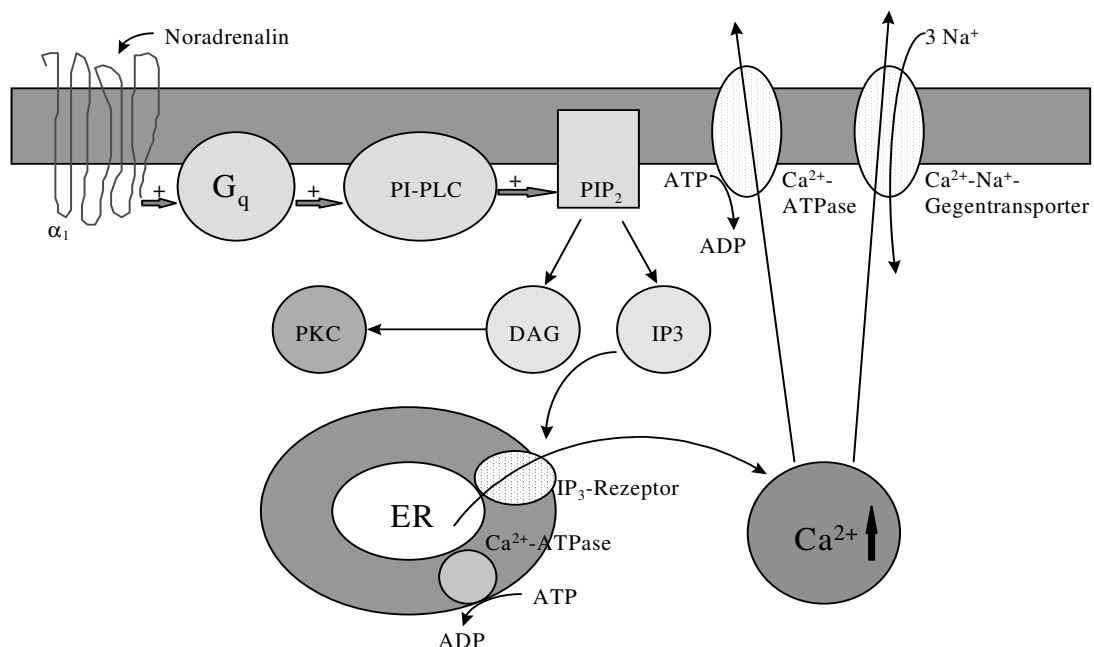


Abb. 1 zeigt erste Schritte bei der Signaltransduktion von α_1 -Adrenozeptoren. Die Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren führt zu einer Konzentrationserhöhung von freien Kalzium-Ionen in der Zelle. Grüne Pfeile stehen für eine Aktivierung.

3.2.2. α_2 -Adrenozeptoren

Die Bindung entsprechender Liganden an α_2 -Rezeptoren aktiviert ein G-Protein der G_i -Familie, welches auf dreierlei Art wirken kann: Es hemmt entweder die Adenylatcyclase, so dass die intrazelluläre Konzentration von cAMP sinkt, oder es erhöht die Offen-Wahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen, oder es vermindert die Offen-Wahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (siehe Abb. 2).

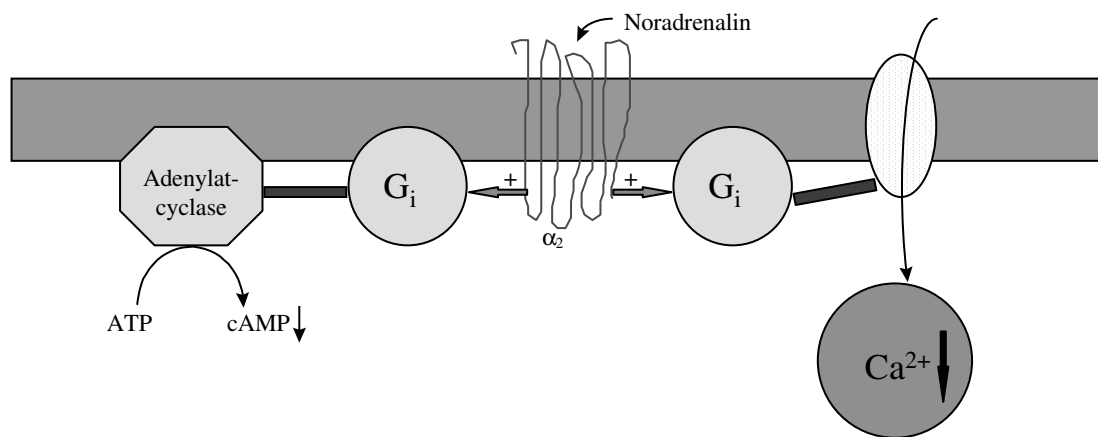


Abb. 2 zeigt zwei Möglichkeiten der Signaltransduktion bei α_2 -Adrenozeptoren. Sie resultieren in einem erniedrigten Spiegel von intrazellulärem Kalzium bzw. cAMP. Grüne Pfeile stehen für eine Aktivierung, rote Balken für eine Hemmung.

3.2.3. β -Adrenozeptoren

Die Bindung entsprechender Liganden an β_1 - und β_2 -Rezeptoren aktiviert ein G-Protein der G_s -Familie, welches die Adenylatcyclase stimuliert. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration des second messenger cAMP, welcher die cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A) aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert spezifische Zielproteine (siehe Abb. 3).

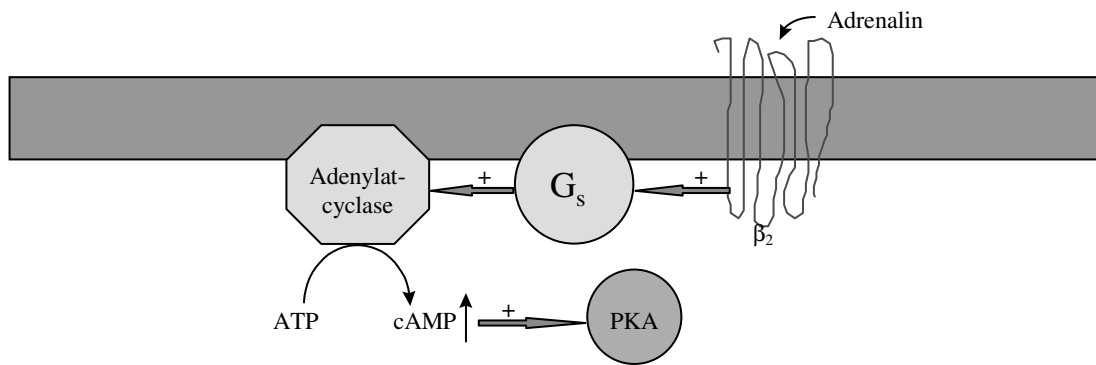


Abb. 3 zeigt erste Schritte der Signaltransduktion des β -Rezeptors. Grüne Pfeile stehen für eine Aktivierung.

Die Affinität von Adrenalin und Noradrenalin zu den beschriebenen Untergruppen der adrenergen Rezeptoren ist unterschiedlich. Adrenalin besitzt gegenüber Noradrenalin die höhere Affinität zu α_2 - und β_2 -Adrenozeptoren, während die Affinität zu β_1 -Adrenozeptoren von Noradrenalin stärker als die von Adrenalin ist. Die Affinität von Noradrenalin und Adrenalin auf α_1 -Adrenozeptoren ist etwa gleich stark.

3.3. Biologische Wirkungen von Katecholaminen

Da die verschiedenen adrenergen Rezeptoren unterschiedliche intrazelluläre second messenger aktivieren, ist die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf eine beliebige Zielzelle in hohem Maße durch das Muster der adrenergen Rezeptoren auf der Zelloberfläche determiniert. Deshalb kann man das Antwortverhalten einer Zelle auf Adrenalin oder Noradrenalin nur dann verstehen, wenn man den überwiegend vorhandenen Rezeptor-Typ kennt. Eine kurze Übersicht über die Wirkungen der Katecholamine (insbesondere von Adrenalin) aus dem Nebennierenmark gibt Tab. 2. Zusammenfassend dienen die durch Adrenalin vermittelten Stoffwechselwege der schnellen Bereitstellung von Energie, wodurch dem Organismus die Notfallreaktion ermöglicht wird.

Organ	Rezeptor	Reaktion		Wirkungen	
Bronchien	β	Dilatation		Verbesserte Ventilation	Sauerstofftransport zu Muskel, Herz und Gehirn \uparrow
Herz	β	Zunahme von Frequenz & Kontraktilität	Herzzeitvolumen \uparrow	Blutfluss zu Muskel, Herz und Gehirn \uparrow	
Venen	α	Konstriktion	Herzzeitvolumen \uparrow		
Arterien	α	Konstriktion: Haut und Viszera			
	β	Dilatation: Muskel und Koronarien			
Skelettmuskulatur	β	Glykogenolyse		Laktat \uparrow	Laktat zu Herz und Leber
Leber	β	Glykogenolyse		Glukose \uparrow	Glukose und freie Fettsäuren zu Muskel, Herz & Hirn
Fettgewebe	β	Lipolyse		Freie Fettsäuren \uparrow	

Tab. 2 zeigt die Wirkung von Katecholaminen (insbesondere Adrenalin) aus dem Nebennierenmark auf verschiedene Organe (modifiziert nach Jänig, W., 1995).

In Notfallsituationen, wie bei Blutverlust, Unterkühlung, Hypoglykämie, Hypoxie, Verbrennung oder bei extremer körperlicher und emotionaler Belastung, erhöht sich die Ausschüttung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark. Die Plasmakonzentration von Noradrenalin und Adrenalin ist damit keine konstante Größe, sondern passt sich den physiologischen Notwendigkeiten an. Die Plasmaspiegel betragen beim gesunden Erwachsenen im Liegen etwa 200 pg/ml Noradrenalin und 40 pg/ml Adrenalin. Schon im Stehen bzw. bei mittelschwerer körperlicher Arbeit steigt der Adrenalinpiegel auf 150-200 % des Ausgangswertes, während der Noradrenalinpiegel auf 200-400 % des Ausgangswertes ansteigt. Ein öffentlicher Vortrag beispielsweise lässt den Noradrenalin-Plasmaspiegel auf ca. 160 % ansteigen, während der Plasmaspiegel von Adrenalin auf 220 % ansteigt, ein deutliches Zeichen einer Hormonfreisetzung aus dem Nebennierenmark (Kopin, I. J., 1988).

Die Rezeptorverteilung auf den Zielzellen und die Plasma- bzw. Gewebekonzentration von Katecholaminen unter dem Einfluss verschiedener äußerer Faktoren determinieren also die biologischen Wirkungen der Katecholamine.

4. Wechselwirkungen zwischen Katecholaminen und dem Immunsystem

Lange Zeit wurden das Nervensystem zusammen mit dem endokrinen System und das Immunsystem als weitgehend voneinander unabhängige Systeme angesehen. Erst in jüngerer Zeit konnte gezeigt werden, dass das Nervensystem und das Immunsystem an verschiedenen Knotenpunkten in enger anatomischer und funktioneller Wechselbeziehung stehen (Ader et al., 1993; Besedovsky et al., 1996; Felten et al., 1994; Ottaway et al., 1994; Weihe et al., 1991). Botenstoffe des Nervensystems wirken auf Zellen des Immunsystems (Madden et al., 1995), und diese wiederum beeinflussen das Nervensystem. Typische neuronale Botenstoffe scheinen auch in Immunzellen und typische Immunzellbotenstoffe ebenfalls in Neuronen gebildet werden zu können. Damit muss ein Netzwerk von außerordentlicher Komplexität angenommen werden, das neuronale, endokrine, immunologische und psychologische Aspekte miteinander verbindet. Im Folgenden sollen Beispiele neuroimmuner Interaktion aufgezeigt werden.

4.1. Stress und Immunfunktion

4.1.1. Akuter psychischer Stress und Immunfunktion

In zahlreichen Studien konnte demonstriert werden, dass akuter psychischer Stress Effekte auf immunologische Funktionen besitzt. Schon 1938 konnte Farris zeigen, dass die Zahl der zirkulierenden Lymphozyten bei Studenten, während sie eine akademische Prüfung absolvierten, deutlich anstieg (Farris, E. J., 1938).

Einige kürzlich durchgeführte Untersuchungen verwendeten eine andere Stress erzeugende Situation als Modell für akuten psychischen Stress. Bei diesen Untersuchungen wurden Tandem-Fallschirmspringer, also Anfänger dieses Sports, die während ihres Sprunges von einem erfahrenem Sprungmaster gesichert werden,

während der Vorbereitung auf ihren ersten Sprung beobachtet. Die physiologischen Veränderungen vor, während und nach ihrem ersten Sprung wurden untersucht. Dabei zeigte sich neben dem erwarteten Anstieg der Herzfrequenz auch ein signifikanter Anstieg der zirkulierenden NK-Zellen (CD16⁺ und CD56⁺) und der NK-Aktivität. Eine Stunde nach dem Sprung lagen die NK-Zellzahlen und die Aktivität deutlich unter den Ausgangswerten, vier Stunden später wieder im Normbereich (Benschop et al., 1996 a).

In einer anderen Studie wurden Patienten untersucht, die eine Farbe benennen mussten, in der ein bestimmtes Wort geschrieben wurde (Stroop-Colour-Word-Conflict Test). Um die Fehlerquote zu erhöhen, wurde beispielsweise das Wort „rot“ in gelben Buchstaben dargeboten und die Geschwindigkeit der präsentierten Wörter erhöht (Bachen et al., 1992). In einer weiteren Studie wurden Patienten beim Lösen schwieriger Rechenaufgaben untersucht (Naliboff et al., 1991). In beiden Studien zeigte sich erneut ein Anstieg der NK-Zellen um 35 % bzw. um 60-100 %. Auch die NK-Aktivität war deutlich erhöht.

Um die Mechanismen dieser psychoimmunologischen Interaktion weiter zu untersuchen, folgten Experimente, bei denen Versuchspersonen unter kontrollierten Bedingungen Adrenalin oder Noradrenalin injiziert wurde. So konnte Crary 1983 zeigen, dass der unter mentalem Stress beobachtbare Anstieg der zirkulierenden NK-Zellen tatsächlich auf Adrenalin zurückzuführen ist (Crary et al., 1983). Der bei der Gabe von Adrenalin beobachtete Effekt ließ sich durch die gleichzeitige Gabe eines nicht-selektiven β -Adrenozeptor-Blockers unterdrücken, nicht jedoch durch die Gabe eines spezifischen β_1 -Adrenozeptorblockers (Schedlowski et al., 1996; Benschop et al., 1994; Benschop et al., 1996 b). Damit konnte zweifelsfrei demonstriert werden, dass es vor allem β_2 -Adrenozeptoren sind, die den Anstieg der NK-Zellzahl und die Erhöhung der NK-Aktivität vermitteln.

4.1.2. Körperliche Belastung und Immunfunktion

Die Auswirkungen von körperlichen Belastungen auf das Immunsystem scheinen denen von mentalen Belastungen weitestgehend zu entsprechen. Unter der Annahme, dass auch oder vor allem Katecholamine für den beobachteten Anstieg der NK-Zellen verantwortlich sind (Crary et al., 1983), ist dies auch erforderlich. Während

viele der Studien, die Veränderungen im Immunsystem nach mentalem Stress untersuchen, aber bei der Beobachtung einer Erhöhung der NK-Zellzahl stehen bleiben, konnte in anderen Studien neben der Leukozytose durch NK-Zellen auch noch eine Granulozytose festgestellt werden (Übersicht bei Lötzerich et al., 1991). Dazu kommen Befunde über eine verbesserte oder zumindest unveränderte Phagozytosefähigkeit (Ortega et al., 1993).

Sowohl die Erhöhung der NK-Zellzahl als auch die Granulozytose können im Sinne einer „fight and flight“-Reaktion interpretiert werden, da so die unspezifische Abwehr für einige Stunden stark aktiviert wird, um den Organismus bei Verletzungen besser vor Infektionen schützen zu können. Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass sich bei Unfallverletzten die Plasmaspiegel von Katecholaminen und Cortisol erhöhen, welche hauptsächlich für die zeitweise Vermehrung der Abwehrzellen im Blut verantwortlich sind. Die schnelle Mobilisierung der Zellen des Immunsystems kann also als Selektionsvorteil während der Evolution gewertet werden.

4.2. Adrenozeptoren auf Zellen des Immunsystems

Grundlage für die Wirkung von Katecholaminen auf immunkompetente Zellen ist die Existenz adrenerger Rezeptoren auf deren Zelloberfläche. Vor allem β_2 -Adrenozeptoren wurden auf verschiedenen Subpopulationen von Lymphozyten (Maisel et al., 1989) sowie auf eosinophilen Granulozyten (Yukawa et al., 1990) gefunden, und β_2 -Rezeptoren scheinen auch die Hauptauslöser für die stress-induzierte Leukozytose zu sein.

Die Konzentration und Funktionalität der Rezeptoren ist aber keineswegs konstant, sondern wird durch physiologische und pathophysiologische Determinanten moduliert. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Interleukin-1 β die Expression β -adrenerger Rezeptoren in vitro signifikant erhöht (Krause et al., 1995). In einer anderen Studie wurde demonstriert, dass die Konzentration von β_2 -Adrenozeptoren auf den Zellen der PBMC-Fraktion in Patienten mit rheumatoider Arthritis signifikant kleiner ist als auf den entsprechenden Zellen gesunder Spender. Weiterhin haben Patienten mit hoher systemischer Krankheitsaktivität noch weniger β -Adrenozeptoren auf ihren Immunzellen als Patienten mit niedriger systemischer

Krankheitsaktivität (Baerwald et al., 1992); bei diesen Patienten konnte aber eine Verschiebung der Reaktivität hin zu α_1 -adrenerg vermittelten adrenalin-induzierten Effekten gezeigt werden (Wahle et al., 1999).

4.3. Effekte von Katecholaminen auf neutrophile Granulozyten

Schon 1978 konnte beobachtet werden, dass die Rezeptordichte von β -adrenergen Rezeptoren auf polymorphkernigen Leukozyten nach der Administration einer Katecholamine enthaltenden Therapie sinkt (Galant et al., 1978). In den folgenden Jahren wurden viele Befunde über die funktionelle Aktivität von neutrophilen Granulozyten nach adrenerger Stimulation erhoben.

Adrenalin und Noradrenalin führen zu einer Verminderung der Produktion von Sauerstoffradikalen, zu verminderter Phagozytosefähigkeit und Chemotaxis, scheinen also neutrophile Granulozyten in ihrer Aktivität grundsätzlich zu hemmen (Wenisch et al., 1996). Dieser Effekt ist durch Adenosin noch potenzierbar (Bazzoni et al., 1991), die genauen Mechanismen hierfür sind aber noch unklar. So wurde beispielsweise 1999 publiziert, dass die β_2 -medierte Reduktion der Chemotaxis nicht über LFA-1 oder Mac-1 vermittelt ist (Silvestri et al., 1999).

Bezüglich der Produktion von Zytokinen sind die Befunde widersprüchlich. Hier wird nach adrenerger Stimulation sowohl eine Hochregulation von TNF- α mRNA (Abraham et al., 1999) als auch eine Abregulation derselben berichtet (Bergmann et al., 1999). Widersprüchliche Befunde bezüglich neutrophiler Granulozyten finden sich in der Literatur häufig und sind vermutlich auf methodische Schwierigkeiten bei der Isolierung und Kultivierung zurückzuführen.

5. Adhäsionsmoleküle

Zell-Zell-Interaktionen werden von einer Vielzahl an Adhäsionsmolekülen vermittelt und kontrolliert. Einige Proteine dieser Klasse sind hauptsächlich am Erreichen des Bestimmungsortes von Leukozyten (homing) oder an ihrer Wanderung beteiligt. Andere Moleküle spielen allgemeinere Rollen bei der Erzeugung der Immun-

reaktionen und den Wechselwirkungen zwischen T-Effektorzellen und ihren Zielzellen.

5.1. Einteilung und Struktur der Adhäsionsmoleküle

Die vier wichtigsten Klassen der Adhäsionsmoleküle, von denen bekannt ist, dass sie eine Rolle bei Interaktionen von Leukozyten spielen, sind die Selektine, einige dem Mucin verwandte Proteine, die Integrine sowie Mitglieder der Immunglobulin-superfamilie (Hogg et al., 1993). Viele Adhäsionsmoleküle wurden zuerst als Zelloberflächenproteine durch monoklonale Antikörper oder durch Tests von Zell-Zell-Wechselwirkungen definiert. Biochemisch konnten sie häufig erst später charakterisiert werden. Deshalb ist aus dem Namen der Adhäsionsmoleküle nicht unbedingt ersichtlich, welcher Strukturfamilie sie angehören.

Die Selektine (CD62) sind von besonderer Bedeutung für das Homing der Leukozyten. Sie können entweder auf Leukozyten (L-Selektin, CD62L) oder auf dem vaskulären Endothel (P-Selektin, CD62P, und E-Selektine, CD62E) exprimiert werden. Selektine sind Proteine ähnlicher Grundstruktur, die sich durch die lektinähnliche Kette in ihrer extrazellulären Domäne voneinander unterscheiden. Lektine binden an spezifische Zuckergruppen. L-Selektin bindet an den Kohlenhydratanteil, sulfatisiertes Sialyl-Lewis^X, von mucinähnlichen Proteinen, die man als vaskuläre Adressine bezeichnet und die auf dem vaskulären Endothel exprimiert werden.

Eine zweite Gruppe von Adhäsionsmolekülen, die biochemisch dem Mucin ähneln, bilden die vaskulären Adressine. Zwei Vertreter aus der Gruppe, CD34 und das glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 (GlyCAM-1), werden in den Lymphknoten auf postkapillären hochendothelialisierten Venolen als sulfatisiertes Sialyl-Lewis^X exprimiert. Mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1), ein weiteres Protein dieser Familie, erscheint auf den Endothelzellen der Schleimhäute verschiedener Organe (beispielsweise des Darmes) und dirigiert dort den Eintritt von Lymphozyten in das lymphatische Schleimhautgewebe. Die Wechselwirkung zwischen L-Selektinen und den vaskulären Adressinen ist verantwortlich für das spezifische Homing naiver T-Zellen in lymphatischen Organen.

Die Integrine umfassen eine große Gruppe von Zelloberflächenproteinen, welche die Zell-Zell-Adhäsion sowie die Adhäsion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix bei der Immunantwort ermöglichen. Integrine bestehen aus einer großen α -Kette, die über nichtkovalente Wechselwirkungen mit einer kleineren β -Kette assoziiert vorliegt. Die verschiedenen Unterfamilien der Integrine definieren sich grob durch ihre gemeinsame β -Kette. Die Expression von β_1 -Integrinen, einer vor allem auf T-Zellen exprimierten Integrinfamilie, steigt während der späten Phase der T-Zell-Aktivierung deutlich an, weshalb man sie auch als very late activation antigens (VLA) bezeichnet. Den Leukozytenintegrinen ist die β_2 -Kette gemeinsam. Ein Vertreter der β_2 -Integrine ist das lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), das auf allen T-Zellen sowie auf Neutrophilen und Makrophagen exprimiert wird. Macrophage antigen-1 (Mac-1) und p150.9 sind ebenfalls auf Makrophagen zu finden und gehören auch zu den β_2 -Integrinen. Sowohl LFA-1 als auch Mac-1 binden an das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM) der Immunglobulinsuperfamilie, welche die vierte Gruppe der Adhäsionsmoleküle bildet.

Die Antigenrezeptoren der Lymphozyten, die Korezeptoren CD4, CD8 und CD19 sowie die konstanten Anteile der MHC-Moleküle gehören alle zur Gruppe der Immunglobulinsuperfamilie. Sie sind entscheidend für das Auslösen und das Vorantreiben der spezifischen Immunantwort. Zwei sehr ähnliche interzelluläre Adhäsionsmoleküle, ICAM-1 und ICAM-2, werden sowohl auf dem Endothel als auch auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert. Die Bindung an diese Moleküle ermöglicht es den Leukozyten, die Blutbahn zu verlassen und in die umliegenden Gewebe einzuwandern.

Adhäsionsmoleküle sind also Proteine unterschiedlicher Struktur, die an vielen verschiedenen Phasen des Immungeschehens Anteil haben. Sie lassen sich grob in die in Tabelle 3 verkürzt dargestellten Gruppen unterteilen.

Gruppe	Name	Gewebevorkommen	Ligand
Selektine binden Kohlenhydrate, Leukozyten-Endothel-Wechselwirkung	L-Selektin	Ly, PMN, PBMC	Sulfatisiertes Sialyl-Lewis ^X , GlyCAM-1, CD34, MAdCAM-1
	P-Selektin	Aktiviertes Endothel, Thrombozyten	Sialyl-Lewis ^X
	E-Selektin	Aktiviertes Endothel	Sialyl-Lewis ^X
mucinähnliche vaskuläre Adressine binden an L-Selektin, Leukozyten-Endothel-Wechselwirkung	CD34	Endothel	Chemotaxis und Opsonisierung
	GlyCAM-1	Venolen mit hohem Endothel	Rekrutierung von Leukozyten
	MAdCAM-1	Venolen in lymphatischem Schleimhautgewebe	Adhärenz der Neutrophilen
Integrine binden an Zelladhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrix mit starker Bindung	$\alpha_L\beta_2$ (LFA-1, CD11a/CD18)	PBMC, PMN, dZ	ICAMs
	$\alpha_M\beta_2$ (Mac-1, CR3, CD11b/CD18)	PMN, Mo, Ma	ICAMs, iC3b, Fibrinogen
	$\alpha_X\beta_2$ (CR4, CD11c/CD18)	dZ, Mo, Ma	IC3b
	$\alpha_4\beta_1$ (VLA-4, CD49d/CD29)	PMN	VCAM-1
Immunglobulin-superfamilie verschiedene Funktion bei der Zelladhäsion, Ziel von Integrinen	CD2 (LFA-2)	TZ	LFA-3
	ICAM-1 (CD 54)	Aktivierte Gefäße, Ly, dZ	LFA-1, Mac-1
	ICAM-2 (CD102)	Ruhende Gefäße, dZ	LFA-1
	LFA-3 (CD58)	Ly, APC	CD2

Tab. 3 zeigt eine Auswahl an Adhäsionsmolekülen. Ausschließlich in dieser Tabelle verwendete Abkürzungen: dZ dendritische Zellen, Ly Lymphozyten, Ma Makrophagen, Mo Monozyten, TZ T-Lymphozyten. (modifiziert nach Janeway et al., 1997)

5.2. Adhäsionsmoleküle als Mediatoren der Leukozytenwanderung

Die koordinierte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Leukozyten und ihrer Rezeptoren auf aktivierten Endothelzellen ist einer der ersten Schritte bei der gerichteten Leukozytenwanderung. Die Adhäsion von Leukozyten läuft im Wesentlichen in drei Stufen ab („three step model“ von Butcher, E. C., 1991; Diavoco et al., 1996; Springer, T. A., 1994).

Schwache Interaktionen zwischen Selektinen und ihren Carbohydratrezeptoren vermitteln ein Rollen der Leukozyten auf den Endothelzellen (Rolling-Mechanismus). Eine Aktivierung der Zellen, die z. B. durch fMLP oder Chemokine induziert werden kann, führt zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen der β_2 -Integrinfamilie (Aktivierung). Die dadurch ausgelöste verstärkte Adhärenz der Leukozyten auf den Endothelzellen führt anschließend zur Diapedese und der Einwanderung in das Gewebe in Richtung des chemotaktischen Gradienten (Extravasation). Bei vielen Vorgängen, die zur Extravasation von Leukozyten führen, spielen Chemokine eine zentrale Rolle (Baggiolini et al., 1994; Baggiolini et al., 1997; Tonetti et al., 1998)

5.3. Kurze Darstellung der drei untersuchten Adhäsionsmoleküle

Die drei in dieser Arbeit untersuchten Adhäsionsmoleküle sind auf neutrophilen Granulozyten exprimiert und in unterschiedlichen Stadien des Adhäsionsprozesses involviert.

5.3.1. Lewis^X (CD15)

Lewis^X wurde erstmals bei der Suche nach embryonalen Antigenen in einer Teratokarzinom-Linie (F9) der Maus entdeckt. Das stage-specific embryonic antigen (SSEA-1) konnte als Bindungspartner des Antikörpers anti-SSEA-1 identifiziert werden. Strukturell handelt es sich bei dem antikörper-spezifischen Anteil des Moleküls um eine Trisaccharid-Sequenz. Sie besteht aus dem Monosaccharid Fukose, das über eine α 1-3 Bindung mit dem N-Acetylglukosamin des Blutgruppen-

Rückgrats (Galaktose, β 1-4 verbunden mit N-Acetylglukosamin) kovalent gebunden ist.

Diese Struktur bildet zusammen mit hochmolekularen Proteinen Glykoproteine aus, die vor allem von Monozyten und Granulozyten exprimiert werden. Lewis^X (CD15) und verwandte Oligosaccharidsequenzen auf Glykoproteinen und Glykolipiden fungieren als Liganden für Selektine und sind damit beim Rolling-Mechanismus wichtig.

5.3.2. CD44

Die mRNA von humanem CD44 kodiert für eine 361 Aminosäuren lange Primärstruktur. Durch posttranslationale Modifikationen wächst das Protein bis auf eine Größe von 80-95 kD. Es besteht aus einer distalen extrazellulären Domäne, einer proximalen Membranregion (zusammen etwa 248 Aminosäuren), der transmembranen Domäne (23 Aminosäuren) und einem zytoplasmatischen Endstück von variabler Länge (3 oder 70 Aminosäuren). Die N-terminale Region stellt die Bindungsregion für den Liganden Hyaluronsäure und weist einen hohen Grad an Interspezies-Homologie auf.

CD44 findet sich auf den meisten im Blutstrom zirkulierenden Zellen, z.B. auf Erythrozyten, Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen, Makrophagen und Granulozyten. Zusätzlich weisen auch Fibroblasten und Zellen im ZNS dieses Oberflächenmolekül auf. Als Hyaluronsäurerezeptor (Aruffo et al., 1990) scheint CD44 im Prozess der Diapedese und der gerichteten Migration mitzuwirken (Haynes et al., 1991). Bei Wundheilungsprozessen, während entzündlicher Vorgänge und bei der Karzinogenese akkumuliert CD44, in einigen Fällen zusammen mit Hyaluronsäure, im betroffenen Gewebe.

5.3.3. CD54 (ICAM-1)

Als Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie besitzt CD54 die typische Struktur eines transmembranen Glykoproteins. Der extrazelluläre Anteil besteht aus fünf Immunglobulin-Domänen, die dem Molekül eine stabile und starre Rahmenstruktur verleihen.

ICAM-1 kann auf allen Leukozyten sowie auf einigen anderen Zellen (Endothel und Epithel) exprimiert sein. Der Level der Expression kann dabei starken Schwankungen unterliegen, was der Hauptmechanismus für die Regulation der Aktivität des Moleküls zu sein scheint. Inflammatorische Zytokine wie IL-1, TNF- α und IFN führen zu einer verstärkten Expression des Zelladhäsionsmoleküls. ICAM-1 ist bei der Aktivierung von Zellen des Immunsystems beteiligt, indem es an Adhäsionsmoleküle der β_2 -Integrinfamilie (vor allem LFA-1) bindet (Bevilacqua, M. P., 1993). ICAM-1 entfaltet seine Wirkung, indem es antigen-unabhängig die Verweildauer von Zellen in enger Nähe zueinander erhöht, so dass andere Interaktionen zwischen Rezeptoren und Liganden unterschiedlicher Art erst möglich werden.

6. Zytokine und Chemokine

Als Zytokine bezeichnet man eine hormonähnliche Gruppe von Polypeptiden, die regulatorische Signale zwischen Zellen vermitteln. Sie entfalten ihre Wirkung durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor auf der Zielzelle. Die folgende Proteinbiosynthese nimmt sowohl Einfluss auf die Zellproliferation und Zelldifferenzierung als auch immunregulatorisch auf die Effektorphase der natürlichen und der spezifischen Immunität. Man unterscheidet zwischen Monokinen, die von Makrophagen und Monozyten produziert werden, und Lymphokinen, die lymphozytären Ursprungs sind.

Nach Lindley et al. (1993) bezeichnet man chemotaktisch wirkende Zytokine als Chemokine. Ihre wichtigste Funktion ist es, Leukozyten an bestimmte Stellen im Gewebe zu leiten und zu aktivieren (Kunkel et al., 1995). Sie spielen daher eine wichtige Rolle als Mediatoren bei der Regulation einer gerichteten Leukozytenmigration und den dadurch ausgelösten Entzündungsprozessen.

6.1. Die Nomenklatur der Chemokine

Auf dem „Keystone Symposium on Chemokines“ schlug eine Arbeitsgruppe unter der Leitung von Dr. Osamu Yoshie (Kinki University, Japan) eine neu erarbeitete, systematische Nomenklatur der Chemokine vor. Sie wurde in Analogie zur damals

bereits bestehenden Nomenklatur der Rezeptoren von Chemokinen entwickelt. Die Liganden der Rezeptoren, also die Chemokine selbst, erhalten den Namen des Rezeptors, gefolgt von einem L für Ligand. Am Namen des Chemokins kann man nun erkennen, in welche Klasse es gehört und an welchen Rezeptor es bindet (Rossi et al., 2000). Die Einführung der neuen Nomenklatur hat zur Folge, dass für eine gewisse Zeit Moleküle mit unterschiedlichen Namen benannt werden. In dieser Arbeit wird primär die alte Nomenklatur verwendet. Um auch der neuen Nomenklatur Rechnung zu tragen, werden die systematischen Namen der in der vorliegenden Arbeit genannten Chemokine an dieser Stelle aufgezählt (siehe Tab. 4).

„Alter“ Name	„Neuer“, systematischer Name
Fraktalkin	CX3CL1
GRO- α	CXCL1
IL-8	CXCL8
IP-10	CXCL10
Lymphotaktin	XCL1
MCP-1	CCL2
MCP-2	CCL8
MCP-3	CCL7
MCP-4	CCL13
Mig	CXCL9
MIP-1 α	CCL3
MIP-1 β	CCL4
NAP-2	CXCL7
RANTES	CCL5

Tab. 4 zeigt die „alte“ und die „neue“, systematische Nomenklatur der in dieser Arbeit genannten Chemokine.

6.2. Strukturelle und funktionelle Einteilung der Chemokine

Charakteristisch für Chemokine sind vier konservierte Cysteinreste, die durch Ausbildung von Disulfidbrücken für die Tertiärstruktur der Chemokine verantwortlich sind. Eine erste Unterteilung in Subgruppen wurde anhand der Position der ersten beiden Cysteinreste vorgenommen (Baggiolini et al., 1994). Bei den CXC-Chemokinen (z. B. IL-8, growth related antigen- α (GRO- α), IFN-inducible protein-10 (IP-10)) sind die ersten beiden Cysteinreste durch eine weitere, variierende Aminosäure (X) voneinander getrennt, während die Cysteinreste der CC-Chemokine (z. B. monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES)) in der Aminosäuresequenz direkt aufeinander folgen. Es hat sich gezeigt, dass diese strukturelle Einteilung im Wesentlichen auch mit dem Wirkungsspektrum der Chemokine bezüglich ihrer biologischen Aktivität und der damit verbundenen Zellselektivität übereinstimmt.

Mit der Aufklärung der Bedeutung des ELR-Motivs (Glutaminsäure-Leucin-Arginin) in der Primärstruktur für die Rezeptorselektivität konnte die Gruppe der CXC-Chemokine weiter unterteilt werden. Die meisten CXC-Chemokine (z. B. IL-8, GRO- α) enthalten in der aminoterminalen Region das ELR-Motiv. Diese Chemokine wirken vor allem auf neutrophile Granulozyten. Im Gegensatz dazu stehen die CXC-Chemokine ohne das ELR-Motiv (z. B. IP-10, macrophage IFN-inducible gene (Mig)) und die CC-Chemokine, deren Wirkspektrum vor allem auf mononukleäre Zellen ausgerichtet ist.

Daneben gibt es noch zwei weitere Gruppen von Chemokinen. Die C-Subfamilie umfasst bisher nur das Lymphotaktin, welches nur auf Lymphozyten chemotaktisch wirkt (Kelner et al., 1994). Die vor kurzem klonierten Chemokine Fraktalkin (Bazan et al., 1997) und Neurotaktin (Pan et al. 1997) bilden zusammen die Familie der CX₃C-Chemokine. Neurotaktin konnte bislang nur im Maussystem nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser strukturellen und funktionellen Unterschiede können die bisher klonierten und charakterisierten Chemokine in fünf Gruppen unterteilt werden. Eine Übersicht der Einteilung der Chemokine ist Tab. 5 zu entnehmen.

Gruppe	Beispiel	Zielzellen
CC	MCP-1, MIP-1 α	Mononukleäre Leukozyten
ELR-CXC	IL-8, GRO- α	Neutrophile Granulozyten
Non-ELR-CXC	IP-10, Mig	Mononukleäre Leukozyten
C	Lymphotaktin	Lymphozyten
CX₃C	Fraktalkin	Mononukleäre Leukozyten
	Neurotaktin	Neutrophile Granulozyten

Tab. 5 zeigt eine Einteilung der Chemokine (nach Kaufmann, A. 1998)

6.3. Chemokin-produzierende Zellen des Immunsystems

6.3.1. Chemokine in Monozyten

Monozyten sind in der Lage, eine große Menge an CXC- und CC-Chemokinen zu produzieren. Als Induktoren der Sekretion von IL-8 wirkt neben Endotoxin (Schröder et al., 1987), inflammatorischen Substanzen wie IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-7, GM-CSF, IL-3, Phytohämagglutinin oder Immunkomplexen (Baggiolini et al., 1994) auch die Adhärenz an Plastikoberflächen (Kasahara et al., 1991). In aseptisch präparierten und unstimulierten Monozyten ist hingegen keine IL-8 mRNA detektierbar. Die Regulation der Produktion von MCP-1 ist noch nicht völlig aufgeklärt, da die Synthese von MCP-1 durch inflammatorische Substanzen zwar stimuliert wird, gleichzeitig ein gewisser Basis-Level aber auch ohne Stimulation vorhanden ist. Neben diesen beiden Chemokinen produzieren Monozyten auch GRO- α , IP-10, MIP-1 β und einige andere, jedoch in geringeren Mengen.

6.3.2. Chemokine in Lymphozyten

Lymphozyten spielen vor allem für die CC-Chemokin-Synthese eine Rolle. Weit weniger bedeutungsvoll als mononukleäre Makrophagen sind sie für die Produktion von CXC-Chemokinen (Baggiolini et al., 1994).

6.3.3. Chemokine in Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind zumindest in geringem Ausmaß zur Freisetzung von Chemokinen fähig. IL-8 wird als Antwort auf verschiedene Stimuli wie z. B. LPS, TNF- α , GM-CSF oder Adhärenz gebildet (Strieter et al., 1992; Fujishima et al., 1993). Besondere Bedeutung kommt dabei den klassischen chemotaktischen Substanzen wie fMLP, C5a, PAF und LTB₄ zu (Cassatella et al., 1992, Strieter et al., 1992). Da IL-8 auf neutrophile Granulozyten chemotaktische Wirksamkeit zeigt, scheinen diese Zellen ihre eigene Rekrutierung zu regulieren. Auch die Expression von GRO- α , MCP-1, MIP-1 α und anderen wurde bereits beschrieben (Cassatella, M. A., 1995), jedoch sind diese Aussagen sehr umstritten. Es wird auch die These vertreten, dass neutrophile Granulozyten ausschließlich auf die Synthese von IL-8 beschränkt seien (Altstaedt et al., 1996).

6.4. Biologische Aktivitäten der Chemokine

Zu den charakteristischen Aktivitäten der Chemokine gehören das Auslösen von Chemotaxis (Aktivierung des kontraktiven Zytoskeletts), Exozytose (Freisetzung intrazellulärer Granula), erhöhte Rezeptorexpression und verstärkte Adhärenz der Zellen, Bildung von bioaktiven Lipiden (Arachidonsäurestoffwechsel) und die Freisetzung von toxischen Sauerstoffmetaboliten. Dadurch können die Chemokine in ihrem funktionellen Verhalten mit den klassischen chemotaktischen Agonisten wie C5a, fMLP, LTB₄ oder PAF verglichen werden.

6.4.1. Effekte auf Monozyten

Chemotaktische Effekte auf Monozyten werden durch eine Vielzahl von CC-Chemokinen wie MCP-1 (Rollins et al., 1991), RANTES (Schall et al., 1990), MCP-

2, MCP-3 und MIP-1 α (Wang et al., 1993) und MCP-4 (Ugucioni et al., 1996) hervorgerufen. MCP-1 induziert weiterhin die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, die Expression der β_2 -Integrine CD11b/CD18 und CD11c/CD18 und die Produktion von IL-1 und IL-6 (Jiang et al., 1992). CXC-Chemokine besitzen keine chemotaktische Wirkung auf Monozyten (Schröder et al., 1987). Aus der Gruppe der CX₃C-Chemokine ist für Fraktalkin eine chemotaktische Wirkung beschrieben (Bazan et al., 1997).

6.4.2. Effekte auf neutrophile Granulozyten

Effekte auf neutrophile Granulozyten werden vor allem durch CXC-Chemokine hervorgerufen, allein die in den α -Granula der Thrombozyten gespeicherten CXC-Chemokine sind gegenüber neutrophilen Granulozyten inaktiv (Walz et al., 1990). Als einziges CC-Chemokin scheint MIP-1 α einen Effekt auf neutrophile Granulozyten auszuüben, der sich in einem Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration zeigt. Aus der Gruppe der CX₃C-Chemokine wirkt allein Neurotakin chemotaktisch.

6.4.3. Effekte auf Lymphozyten

Die Effekte auf Lymphozyten werden vor allem durch CXC-Chemokine ohne das ELR-Motiv hervorgerufen. Sowohl IP-10 (Taub et al., 1993) als auch Mig (Liao et al., 1995) wirken chemotaktisch auf Lymphozyten. Einige CC-Chemokine sind in die selektive Rekrutierung einzelner Subpopulationen von T-Lymphozyten eingebunden. Auch das CX₃C-Chemokin Fraktalkin besitzt chemotaktische Aktivität gegenüber Lymphozyten.

6.4.4. Nicht-chemotaktische Effekte

Neben den beschriebenen chemotaktischen Effekten auf verschiedene Zellarten besitzen Chemokine eine Reihe nicht-chemotaktischer Effekte. So sind beispielsweise die CXC-Chemokine IL-8 und GRO- α an der Regeneration von Geweben und der Wundheilung beteiligt, während die CC-Chemokine MIP-1 α und

MIP-1 β in Kombination mit anderen Interleukinen die Stammzellreifung im Knochenmark sowohl stimulieren als auch inhibieren können.

6.5. Kurze Darstellung der drei untersuchten Zytokine

6.5.1. TNF- α

TNF- α wurde ursprünglich als Faktor beschrieben, der zu hämorrhagischen Nekrosen in Tumoren führt (Carswell et al., 1975). Das Zytokin wird überwiegend von aktivierten Monozyten und Makrophagen gebildet. LPS ist der stärkste Stimulus, aber auch andere bakterielle Produkte und Viren wirken induzierend. Der Faktor wird als transmembranes Typ-II-Protein von 25 kD synthetisiert und anschließend proteolytisch gespalten. Die sezernierte Form liegt im Serum als Homotrimer von 51 kD vor.

Die Bindung von TNF- α an seine Rezeptoren führt über die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NF- κ B oder AP-1, zu einer gesteigerten Transkriptionsrate der induzierbaren Gene. Es wirkt als endogenes Pyrogen, bei neutrophilen Granulozyten steigert es die Phagozytose, die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität und die Adhärenz an Endothelzellen.

6.5.2. IL-6

Interleukin 6 ist ein Zytokin von 26 kD, das von vielen verschiedenen Zellen, vor allem Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen, produziert wird. Als Stimuli wirken dabei vor allem IL-1, TNF- α und bakterielle Lipoproteine.

IL-6 ist ein Zytokin mit pleiotropen Funktionen, es wirkt vor allem als B-Zellen stimulierender Faktor auf die Ausdifferenzierung und die Immunglobulin-Sekretion bereits aktivierter B-Zellen. Weiterhin induziert es in Hepatozyten die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen, wodurch die weitere Entzündungsreaktion unterstützt wird. Zusammen mit IL-1 wirkt es mitogen auf T-Zellen (Gemsa et al., 1997). Im Gegensatz zu TNF- α oder LPS führt es aber nur zu einer sehr geringfügigen Gewebsschädigung (Abbas et al., 1994).

6.5.3. IL-8

Interleukin 8 ist ein CXC-Chemokin von nur 8 kD, welches zunächst als 99 Aminosäuren langes Vorläufermolekül produziert wird, von dem in mehreren Reifungsschritten die Leadersequenz von 27 Aminosäuren Länge abgespalten wird. Neben der reifen sezernierten Form (72 Aminosäuren) lassen sich in Zellüberständen auch eine ebenso potente 69 Aminosäuren lange Form sowie zwei Zwischenstadien (77 bzw. 79 Aminosäuren) finden, die etwas schwächere Aktivität besitzen. Die Hauptproduzenten sind Monozyten, aber auch Makrophagen, Fibroblasten, Melanozyten, Hepatozyten, Granulozyten und Chondrozyten produzieren das Chemokin.

Wie alle CXC-Chemokine aktiviert IL-8 spezifisch Granulozyten, indem es vorübergehend einen Anstieg der Konzentration von Kalzium im Zytosol und die Freisetzung von Enzymen aus den primären und sekundären Granula bewirkt. Außerdem führt es zu einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen, Induktion der Chemotaxis und verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen (Baggiolini et al. 1994).

7. Zielsetzung

Die Wechselwirkungen zwischen dem Organismus als Ganzem und dem Immunsystem als Teil dieses Ganzen sind Gegenstand der aktuellen medizinischen Forschung. In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von neuen Erkenntnissen über die molekularen Grundlagen des komplexen Wechselspiels zwischen dem endokrinen System mit seinen Hormonen, dem Nervensystem mit seinen Neurotransmittern und dem Immunsystem mit seinen verschiedenen spezifischen Zellen bekannt geworden.

Über die Steuerung der Funktion von neutrophilen Granulozyten ist nach wie vor eher wenig bekannt. Obwohl sie die zahlreichsten Vertreter der Immunzellen sind und ihre Bedeutung deshalb nicht hoch genug eingeschätzt werden kann, können sie erst langsam den Ruf von „bloßen Fresszellen ohne immunmodulatorische Funktion“ ablegen. Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur Klärung des Wirkmechanismus von Adrenalin auf neutrophile Granulozyten. Hierbei interessieren besonders die folgenden Fragen:

1. Gibt es Auswirkungen von Adrenalin auf der Ebene der Signaltransduktion von Adrenozeptoren? Ändern sich die intrazellulären Konzentrationen von Kalzium bzw. cAMP in neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit Adrenalin?
2. Ist Adrenalin in der Lage, die Expression von Adhäsionsmolekülen (CD15, CD44, CD54) auf unstimulierten bzw. auf LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten zu verändern?
3. Produzieren neutrophile Granulozyten nach LPS-Stimulation die Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-8, und ist deren Produktion durch Adrenalin modulierbar?

Dazu musste eine Methode zur Aufreinigung und Kultivierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut gesunder Spender gefunden werden. Auch die Aufgabe, intrazellulär vorliegende Zytokine mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachzuweisen, erwies sich als große Herausforderung, weil diese Methode in neutrophilen Granulozyten bislang selten zur Anwendung gekommen war.

II. Material und Methoden

1. Materialien

1.1. Medien, Geräte

Soweit nicht anders vermerkt, wurde in allen Versuchen das Zellkulturmedium RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Deutschland) verwendet, welches mit nachfolgend aufgeführten Zusätzen zu RPMI^{sup} vervollständigt wurde. Die angegebenen Mengen beziehen sich auf 1000 ml RPMI.

L-Glutamin	200 mM	5 ml
Natriumpyruvat	100 mM	5 ml
HEPES-Pufferlösung	1 mM	5 ml
Penicillin/Streptomycin	10000 U/ml bzw. 10000 mg/ml	5 ml
Nichtessentielle Aminosäuren	100 x	5 ml

1.2. Zellen

Die Präparation und Isolation humaner Monozyten und neutrophiler Granulozyten erfolgte aus Venenblut gesunder Blutspender (buffy coats), das freundlicherweise von Prof. Dr. V. Kretschmer, Zentrum für Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universitätsblutbank Marburg, zur Verfügung gestellt wurde.

1.3. Standardbedingungen der Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden als offenes System in einem CO₂-Auto-Zero-Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37 °C, ca. 80 % relative Luftfeuchte und Begasung mit 5 % CO₂ inkubiert. Zellkulturarbeiten und andere sterile Arbeitsschritte wurden in einer Laminar-Flow-Box (HLB 2448, Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden, soweit nicht anders angegeben, in einer Tisch-Zentrifuge (Hettich-Rotanda RP, Rotor max. 4000 Umdrehungen/min; Hettich, Tuttlingen, Deutschland) durchgeführt.

1.4. Chemikalien

1.4.1. Medien und Medienzusätze

HEPES-Pufferlösung 500 mM (100x)	Biochrom
humanes AB-Serum	Sigma
L-Glutamin 200 mM (100x)	Biochrom
Natriumpyruvat 100 mM	Biochrom
nichtessentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml bzw. 10000 mg/ml	Biochrom
RPMI 1640	Biochrom
TCH TM Serum-Äquivalent	ICN Biomedicals

1.4.2. Farbstoffe

Diff-Quick [®]	Baxter
Fura-2	MolecularProbes
Trypanblau	Merck

1.4.3. Monoklonale Antikörper

Anti CD4 FITC	mouse IgG ₁ κ RPA-T4	Becton Dickinson
Anti CD8 PE	mouse IgG ₁ κ RPA-T8	Becton Dickinson
Anti CD14 FITC	mouse IgG _{2a} RMO52	Immunotech
Anti CD15 PE	mouse IgM κ 80H5	Immunotech
Anti CD44 PE	mouse IgG _{2b} κ G44-26	Becton Dickinson
Anti CD54 PE	mouse IgG ₁ κ HA58	Becton Dickinson
Anti CD66b FITC	mouse IgG ₁ κ 80H3	Immunotech
Anti IL-6 PE	rat IgG _{2a} MQ2-6A3	Becton Dickinson

Anti IL-8	mouse IgG _{2b} G265-8	Becton Dickinson
Anti IL-8 PE	mouse IgG _{2b} G265-8	Becton Dickinson
Anti TNF- α PE	mouse IgG ₁ MAb11	Becton Dickinson
Dynabeads [®] Pan-T (CD2)	mouse IgG ₁	Dynal

1.4.4. Sonstige

Brefeldin A (als GolgiPlug [™])	Becton Dickinson
CaCl ₂ /MgCl ₂ -Lösung	Virologie, Uni Marburg
Dextran T500	Amersham
Epinephrinhydrochlorid (als Suprarenin [®])	Hoechst
Ficoll-Trennlösung	Biochrom
Interleukin-1 β	R&D Systems
Interleukin-8	R&D Systems
LPS von E. coli 0127, B8W	Difco
Monensin (als GolgiStop [™])	Becton Dickinson
Natriumchlorid	Roth
Norepinephrinhydrochlorid (als Arterenol [®])	Hoechst
Paraformaldehyd	Merck
PBS ^{def} (ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺ -Ionen)	Biochrom
Saponin	Merck
TNF- α	R&D Systems

2. Methoden

2.1. Isolierung und Anreicherung humaner Granulozyten

Zur Gewinnung humaner Granulozyten wurden frische buffy coats (Abteilung für Transfusionsmedizin, Klinikum der Philipps-Universität Marburg) aus peripherem Venenblut gesunder Blutspender verwendet. Buffy coats entstehen bei der Separation bestimmter Blutzellfraktionen (in Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate) und enthalten in hoch angereicherter Form Granulozyten (PMN) sowie mononukleäre Blutzellen (PBMC). Die Abtrennung der PMN von den PBMC erfolgte mittels der Ficoll-Hypaque-Methode, bei der aufgrund von Dichteunterschieden mononukleäre Zellen von anderen Blutzellen getrennt werden (Boyum, A., 1968).

2.1.1. Die Ficoll-Hypaque-Methode

Die Aufarbeitung wurde in 50 ml Probenröhrchen (Greiner, Nürtingen, Deutschland) durchgeführt. 13 ml warmes Ficoll (Ficoll-Trennlösung, Dichte 1.077 g/ml; Biochrom, Berlin, Deutschland) wurden mit 27 ml unverdünntem Blut vorsichtig überschichtet und mit 400 x g bei Raumtemperatur für 30 min und ohne Bremse zentrifugiert. Dabei setzen sich die Erythrozyten und Granulozyten als Sediment ab, die mononukleären Zellen werden in einer Interphase oberhalb des Ficolls angereichert und das Serum bildet zusammen mit den Thrombozyten den Überstand. Der Überstand wurde bis knapp über die Granulozytenfraktion mit einer Pipette abgesaugt und verworfen, das Sediment in ein neues Probenröhrchen überführt und mit PBS^{def} auf 25 ml aufgefüllt.

Nun wurden 25 ml einer 3 %igen Dextran-Lösung (3 % Dextran in PBS^{def}) dazu gegeben, welche die Erythrozyten verkleben und schnell sedimentieren lässt. Nach 15 min wurde der Überstand mit den Granulozyten abgenommen und in ein neues Probenröhrchen überführt. Die Zellen wurden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (350 x g, 4 °C, 7 min) pelletiert und anschließend in 5 ml PBS^{def} resuspendiert.

Durch Zugabe von 22,5 ml eiskalter, hypotoner, 0,2 %iger NaCl-Lösung wurden die restlichen Erythrozyten lysiert, da deren osmotische Resistenz wesentlich geringer ist als die der Granulozyten. Um ein Platzen der Granulozyten zu verhindern, wurden

nach 30 sek 22,5 ml einer hypertonen, 1,6 %igen NaCl-Lösung zugegeben, so dass die Zellen nun wieder in einer isotonen, 0,9 %igen NaCl-Lösung vorlagen. Jetzt wurden die Zellen erneut pelletiert und die hypotone Lyse zwei Mal wiederholt, bevor die verbliebenen Zellen resuspendiert und in 30 ml RPMI^{sup} aufgenommen wurden.

2.1.2. Zellzahlbestimmung

Für den nächsten Schritt der Aufreinigung, die T-Zell-Deletion, musste zunächst die Zellzahl bestimmt werden. Dafür wurde die CASY1-Apparatur (Modell TT, Schärfe System, Reutlingen, Deutschland) verwendet. Die Apparatur misst mittels der sogenannten Pulsflächenanalyse, einer Abwandlung des Widerstandsmessprinzips, die Zellgröße eines einzelnen Messereignisses. Jede Zelle verdrängt bei ihrem Durchfluss durch die Messkapillare eine genau bestimmte Menge einer geeichten Elektrolytlösung. Die dadurch entstehende Widerstandserhöhung ist ein direktes Maß für das Volumen der Zelle. Das Gerät wurde auf eine spezielle Standardroutine programmiert, die neben verschiedenen Umrechnungsfaktoren auch eine Mindestgröße detektierbarer Zellen festlegt. Dadurch werden kleinere Partikel, zum Beispiel verunreinigende Staubpartikel, bei der Messung nicht erfasst.

Die Apparatur wurde zwei Mal mit reinem PBS^{def} equilibriert. Anschließend wurden in speziellen Messküvetten 10 ml PBS^{def} vorgelegt und 20 µl Zellsuspension zugegeben (1:500 Verdünnung). In drei aufeinander folgenden Messungen wurden jetzt die Zellzahl und die Zellgröße jedes einzelnen Messereignisses bestimmt. Dadurch wird gleichzeitig auch die Konzentration der Zellsuspension gemessen. Mit Hilfe eines weiteren Größenlimits konnte der Reinheitsgrad der isolierten Granulozyten und das Ausmaß der Verunreinigung durch Lymphozyten näherungsweise bestimmt werden.

2.1.3. Immunomagnetische Elimination von T-Lymphozyten

Nach Durchführung der Ficoll-Hypaque-Methode stellten T-Lymphozyten regelhaft die Hauptverunreinigung der Granulozytenfraktion dar. Sie wurden mit Hilfe von magnetisierbaren Antikörpern, sogenannten Dynabeads[®] (Dynabeads[®] M-450 Pan-T, Dynal, Hamburg, Deutschland) entfernt (Vartdal et al., 1987).

Dynabeads[®] sind einheitliche, 4,5 µm große, magnetisierbare Polystyren-Kügelchen, die mit einem monoklonalen Antikörper muriner Herkunft beschichtet wurden, der spezifisch entweder das CD4- (T_H-Zellen), CD8- (T_K-Zellen) oder CD2- (pan T-Zellen) Antigen auf der Lymphozytenmembran erkennt. Bei Inkubation eines heterogenen Zellgemisches mit den magnetisierbaren Antikörpern kommt es zur Rosettenbildung mit den Antigen tragenden Zellen. Die Rosetten werden dann mit Hilfe eines Magneten von den restlichen Zellen getrennt.

Da der Zellverlust recht hoch war, wurde das Doppelte der benötigten Zellzahl in einem Volumen von 10 ml RPMI^{sup} eingesetzt. Die Dynabeads[®] wurden im Verhältnis 4:1 (Beads:Lymphozytenzahl) zugesetzt, was einem Pipettiervolumen von ca. 400 µl entsprach. Anschließend wurde das Zell-Beads-Gemisch bei 4 °C für 60 min auf zwei frei gelagerten, sich drehenden Rollen inkubiert, so dass die Suspension ständig vermischt wurde. Die gebildeten Zell-Bead-Rosetten wurden mit Hilfe eines Magneten vom übrigen Zellgemisch abgetrennt. Der Überstand mit den darin enthaltenen Granulozyten wurde in ein neues Probenröhrchen gegeben und mit PBS^{def} gewaschen. Die pelletierten Zellen wurden nun in RPMI^{sup} resuspendiert, gezählt und auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

Es wurden nur Präparationen für Versuche eingesetzt, deren Reinheit bei über 90 % lag und deren Monozytenanteil kleiner 1 % war. Die Zellen wurden in einer Dichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen (1 ml pro well) ausplattiert.

2.2. Isolierung und Anreicherung humaner Blutmonozyten

In einigen Versuchen zur intrazellulären Färbung von Zytokinen wurden humane Blutmonozyten zur Etablierung verschiedener Methoden verwendet.

2.2.1. Separation der PBMC-Fraktion nach Dichtegradientenzentrifugation

Ausgangsmaterial für die Isolierung von humanen Blutmonozyten war die Interphase der Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung des PMN-Sedimentes aus buffy coats (Material und Methoden: 2.1.1. Die Ficoll-Hypaque-Methode). Sie wurde sorgfältig abpipettiert, in einem neuen Probenröhrchen mit 4 °C kaltem PBS^{def} verdünnt und zwei Mal gewaschen. Zur Durchführung der Waschschriffe wurden zwei

Zentrifugationsschritte bei 4 °C mit 350 x g für 7 min durchgeführt. Das Sediment wurde jeweils mit kaltem PBS^{def} vorsichtig resuspendiert und auf 50 ml aufgefüllt. Für die anschließende Aufreinigung der Monozyten durch die Elutriationsmethode wurde die PBMC-Fraktion nach der letzten Zentrifugation in insgesamt 40 ml RPMI^{sup} aufgenommen und direkt im Anschluss elutriert.

2.2.2. Elutriation (Gegenflusszentrifugation)

Die Elutriation bietet die Möglichkeit, Zellen aufgrund ihrer Größe und Dichte zu trennen. Dies wird möglich durch die Erzeugung zweier entgegengesetzt wirkender Kräfte. Durch die Rotation der Zentrifuge wird eine Sedimentationskraft hervorgerufen (Zentrifugalkraft), der ein von einer Pumpe erzeugter, kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom in entgegengesetzter Richtung entgegenwirkt (Zentripetalkraft).

Jede Zelle in der Separationskammer wird in eine Zone wandern, in der ein Gleichgewicht zwischen ihrer Sedimentationsrate und der durch die Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums erzeugten Zentripetalkraft herrscht. Innerhalb der Separationskammer wird durch ihre spezielle Geometrie ein Fließgeschwindigkeitsgradient erzeugt. Hierdurch ist es möglich, Zellen mit verschiedenen Sedimentationsraten in Suspension zu halten. Durch die schrittweise Erhöhung der Flüssigkeitsrate und der dadurch hervorgerufenen Erhöhung der Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums oder durch die Verringerung der Rotordrehzahl können nach und nach relativ homogene Zellseparationen aus der Kammer ausgespült werden. Jede folgende Separation besteht aus größeren Zellen als die vorhergehende Fraktion (Grabske et al., 1975; Figdor et al., 1983).

Zwischen Flüssigkeitsrate und Rotordrehzahl besteht folgender Zusammenhang (Beckmann, Instruction Manual):

$$F = X \times D^2 \times (\text{RPM} \times 10^{-3})^2$$

Dabei ist F die Flüssigkeitsrate in ml/min, X der Kammerfaktor von 0,0511, D der Zelldurchmesser in mm und RPM die Anzahl der Rotorumdrehungen/min. Belässt man die Rotordrehzahl konstant, wird es mit Hilfe dieser Formel möglich, die Größe

der Zellen zu berechnen, die bei einer bestimmten Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums aus der Kammer ausgespült werden.

Für die Elutriationsversuche wurde das JE-6B Elutriationssystem mit dazu gehörigem Rotor und der Standardseparationskammer verwendet (Beckmann, Coulter, Fullerton, CA, USA). Die Standardkammer besitzt ein Volumen von 4,2 ml. Die Durchführung der Elutriation erfolgte bei einer konstanten Rotorgeschwindigkeit von 3000 Umdrehungen/min und konstanter Temperatur von 4 °C. Zur Separation der Zellen wurde die Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums schrittweise erhöht. Als Elutriationsmedium wurde PBS^{def} verwendet. Pro Elutriationsschritt wurden 300-500 x 10⁶ PBMCs eingesetzt (Kaufmann, A., 1998).

Für die Aufreinigung der humanen Monozyten wurde die aus buffy coats gewonnene PBMC-Fraktion (Material und Methoden: 2.2.1. Separation der PBMC-Fraktion nach Dichtegradientenzentrifugation) mit einer Pumpleistung von 7 ml/min in die Separationskammer eingezogen. Im Anschluss wurde bei 15 ml/min 5 min gespült, um Thrombozyten und Erythrozyten zu entfernen. Durch die weitere schrittweise Erhöhung der Fließgeschwindigkeit bis zu einer Pumpleistung von 28,5 ml/min wurden die in der PBMC-Fraktion enthaltenen Lymphozyten und NK-Zellen fast vollständig ausgewaschen. Mit der Erhöhung der Pumpleistung auf 36 ml/min wurde die Monozytenfraktion in 100 ml Elutriationsmedium separiert.

Die elutrierten Zellfraktionen wurden bei 350 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, das Sediment resuspendiert und zunächst in 10 ml RPMI^{sup} aufgenommen. Es folgte die Zellzahlbestimmung mit Hilfe der CASY1-Apparatur (Material und Methoden: 2.1.2. Zellzahlbestimmung).

2.3. Bestimmung der Vitalität

Die Bestimmung der Vitalität der separierten und angereicherten neutrophilen Granulozyten erfolgte mit Hilfe der Trypanblau-Färbung. Bei dieser Methode kann man über eine Ausschlussfärbung tote von lebenden Zellen trennen. Nur bei letzteren sind aktive Transportmechanismen intakt, die den Farbstoff ausschließen. Dagegen färben sich tote Zellen blau an. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau (0,25 %ige Trypanblau-Lösung, Serva, Heidelberg, Deutschland) gemischt und die Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt.

2.4. Bestimmung der Zellreinheit

Zur Bestimmung der Zellreinheit wurden drei verschiedene Methoden angewandt: die Färbung mit Diff-Quick, die Zellzahlanalyse mit Hilfe der CASY1-Apparatur und die Analyse in der Durchflusszytometrie.

2.4.1. Färbung mit Diff-Quick®

Die Färbung mit Diff-Quick® erlaubt eine schnelle und einfache Differenzierung der Blutleukozyten. Etwa 7×10^5 Zellen wurden auf einen Objektträger gebracht, indem sie in einem Zytospin-Gerät (Zytospin 2, Shandon, Pittsburgh, PA, USA) bei 500 rpm für 5 min zentrifugiert wurden. Die Präparate wurden nach dem Trocknen mit den Lösungen aus dem Kit fixiert (Methanol), entsprechend den Angaben des Herstellers gefärbt (Eosin G- und Thiazin-Färbelösungen) und anschließend im Lichtmikroskop ausgezählt.

2.4.2. Analyse in der Durchflusszytometrie

Noch genauer als durch die Färbung mit Diff-Quick® ist die Reinheit durch eine Analyse im Durchflusszytometer bestimmbar. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde sowohl die Reinheit der Präparation von neutrophilen Granulozyten bestimmt als auch das Maß der Verunreinigung durch Monozyten. Als Marker für neutrophile Granulozyten wurde ein mit Fluorescein-Isothiocyanat gekoppelter Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD66b verwendet (FITC conjugated monoclonal mouse IgG₁ κ anti human CD66b, clone 80H3; Immunotech, Hamburg, Deutschland). Als Marker für humane Monozyten diente ein ebenfalls mit Fluorescein-Isothiocyanat konjugierter Antikörper gegen das Oberflächenprotein CD14 (FITC conjugated monoclonal mouse IgG_{2a} anti human CD14, clone RMO52; Immunotech, Hamburg, Deutschland). Die Analyse wurde in Form eines Histogramms dargestellt.

2.4.3. Analyse in der CASY1-Apparatur

In der CASY1-Apparatur wurde mittels Pulsflächenanalyse die Zellgröße jeder gemessenen Zelle bestimmt. Durch die Einführung eines zusätzlichen Größenlimits

konnte auch der Reinheitsgrad der isolierten Granulozyten bestimmt werden. Dazu wurde die Anzahl der Zellen, die größer als 7,65 µm gewesen sind, durch die Anzahl der aufgenommenen Messereignisse (alle Zellen) geteilt. Das Ergebnis korrelierte sehr gut mit der mikroskopischen Auswertung nach Färbung mit Diff-Quick® und ebenfalls sehr gut mit der Auswertung in der Durchflusszytometrie. Da es das einfachste der drei Verfahren ist, wurde es standardmäßig zur Auswertung des Reinheitsgrades der isolierten Granulozyten verwendet.

2.5. Kultivierung neutrophiler Granulozyten

Für einen Großteil der Versuche mussten neutrophile Granulozyten über einen längeren Zeitraum inkubiert und stimuliert werden. Da die Lebenszeit von Granulozyten stark beschränkt ist, wurden die Zellen nicht länger als 24 Stunden inkubiert.

2.5.1. Inkubation neutrophiler Granulozyten

Die aufgereinigten neutrophilen Granulozyten wurden nach Zählung und Bestimmung der Reinheit in der CASY1-Apparatur auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde je 1 ml in die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte ausplattiert und nach Zugabe von 2 % TCH™ (Serum-Äquivalent) unter Standardbedingungen bei 37 °C inkubiert. Die Verwendung einer 24-Loch-Platte mit niedriger Adhärenz (Falcon®, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) sollte eine Voraktivierung der Zellen durch Adhärenz an Plastikoberflächen verhindern.

2.5.2. Stimulation neutrophiler Granulozyten

Nach einer Ruhephase von 60 min unter Standardbedingungen wurden die neutrophilen Granulozyten mit verschiedenen Substanzen stimuliert. In den meisten Versuchen wurde LPS (von E. coli 0127, B8W, Difco, Detroit, MI, USA) in hoher Dosis (100 ng/ml) als Stimulans eingesetzt, was zuvor im Ultraschallbad (Elma, Transsonic Digital, T480/H-2, Fremont, CA, USA) bei höchster Stufe für 3 min behandelt wurde, um etwaige Micellen zu zerstören. In einigen anderen Versuchen

wurden die Zellen mit LPS in anderer Konzentration, TNF- α , IL-1 β oder PMA stimuliert.

Um den Effekt von Katecholaminen auf die Expression von Oberflächenproteinen und Zytokinen zu untersuchen, wurden stimulierte und unstimulierte Zellen mit verschiedenen Endkonzentrationen von Adrenalin oder Noradrenalin inkubiert. Dazu wurde den Zellsuspensionen nach der einstündigen Ruhephase eine definierte Menge Adrenalin oder Noradrenalin (Suprarenin[®] bzw. Arterenol[®]; Hoechst AG, Frankfurt am Main, Deutschland) zugesetzt. Die erreichten Endkonzentrationen lagen zwischen 5×10^{-4} M und 5×10^{-9} M und deckten damit sowohl physiologische als auch unphysiologisch hohe Konzentrationen ab.

2.5.3. Inkubation neutrophiler Granulozyten zur Untersuchung der Neusynthese von Zytokinen

Da die Untersuchungen zur Neusynthese von Zytokinen durch neutrophile Granulozyten mit Hilfe intrazellulärer Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt werden sollten, wurde in den entsprechenden Versuchen den Zellsuspensionen ein Proteintransportinhibitor zugefügt. Hierfür stehen die beiden Stoffe Brefeldin A (als GolgiPlug[™], Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) und Monensin (als GolgiStop[™], Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) zur Verfügung. Beide Substanzen greifen, wenn auch an unterschiedlichen Stellen, an intrazellulären Proteintransportprozessen an, so dass synthetisierte Zytokine im Golgi-Komplex akkumulieren und damit besser detektierbar sind (Assenmacher et al., 1994; Elson et al., 1995; Jung et al., 1993; Prussin et al., 1995).

In den meisten Versuchen wurden 5 Stunden vor Ende der Inkubationszeit 10 μ l einer zehnfach verdünnten Lösung von Brefeldin A zugegeben. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da sich eine längere Inkubation mit Brefeldin A als zytotoxisch gegenüber neutrophilen Granulozyten herausstellte und nach der Produktinformation schon die Inkubation für 4-6 Stunden signifikante Auswirkungen auf die Detektierbarkeit von Zytokinen hat. Der zytotoxische Effekt von Monensin war noch stärker als der von Brefeldin A.

2.5.4. Entnahme von neutrophilen Granulozyten aus den 24-Loch-Platten

Um verschiedene Versuche mit neutrophilen Granulozyten vorzunehmen, wurden zu bestimmten Zeitpunkten die 24-Loch-Platten aus dem Brutschrank entnommen. Nun wurde 1 ml 4 °C kaltes PBS^{def} dazugegeben, um eventuell adhärenzte Zellen von der Plastikoberfläche zu lösen. Durch vorsichtiges Resuspendieren wurden auch die restlichen Zellen vom Rand gelöst und mit einer Pipette in ein Probenröhrchen übertragen. Ein abschließender Zentrifugationsschritt bei 350 x g, 4 °C für 7 min diente der Trennung von neutrophilen Granulozyten und Überstand, welcher anschließend sorgfältig dekantiert wurde. In dieser Form wurden die Neutrophilen für die verschiedenen Versuche weiter verarbeitet.

2.6. Besonderheiten bei der Kultivierung humaner Monozyten

Bei der Kultivierung humaner Monozyten mussten einige Unterschiede zur Kultivierung von neutrophilen Granulozyten beachtet werden. Humane Monozyten sind durch viel geringere Mengen LPS zur Produktion von Zytokinen stimulierbar als neutrophile Granulozyten (Cassatella, M. A., 1995). Deshalb wurden den inkubierten Monozyten nur 10 ng/ml LPS (statt 100 ng/ml) zugesetzt. Des Weiteren adhärenzieren humane Monozyten in wesentlich stärkerem Ausmaß an Plastikoberflächen als Neutrophile. Deshalb wurden die Monozyten in speziellen Teflongefäßen (Teflongefäße, 15 ml, mit rundem Innenboden; Savillex Corp., Minnetonka, MN, USA) inkubiert. Um bei der Entnahme eventuell entstandene Adhärenz zu lösen, wurden die Teflongefäße zunächst mit ihrem Unterboden für 25 min in Eiswasser gestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension zwei Mal vorsichtig resuspendiert und in ein Probenröhrchen pipettiert. Nun wurde der Inhalt des Teflongefäßes noch einmal mit 1 ml PBS^{def} resuspendiert, um die restlichen Monozyten zu lösen.

2.7. Messung des Kalzium-Influx

Kalzium-Ionen gehören zu den intrazellulären Botenstoffen und sind an einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen beteiligt. Die Änderung der intrazellulären Konzentration freier, also nicht-komplexierter, Kalzium-Ionen beeinflusst sowohl physiologische als auch pathologische Prozesse. Um die im nanomolaren Bereich

liegende Kalziumkonzentration quantitativ erfassen zu können, müssen hochempfindliche Techniken, wie zum Beispiel die Fluorimetrie, eingesetzt werden. Die Fluorimetrie bedient sich Ca^{2+} -selektiver, membrangängiger Fluoreszenz-Indikatoren und einer speziellen Apparatur, die Licht verschiedener Wellenlängen messen kann.

2.7.1. Prinzip der Messung

Da in den Messungen der intrazelluläre Kalziumionen-Spiegel gemessen werden soll, wird ein Farbstoff benötigt, der die Zellmembran passieren kann, ohne sie zu zerstören, und der in ausreichendem Maße für Kalzium spezifisch ist. Die ersten Fluoreszenzfarbstoffe, die diese Anforderungen erfüllten, waren die lipophilen Esterderivate bereits bekannter Indikatoranionen (Tsien et al., 1981). Der in dieser Studie verwendete Farbstoff Fura-2 wurde 1985 etabliert (Grynkiewicz et al., 1985) und ist ein Acetoxymethyl-Ester (AM-Ester). Er besitzt stärkere Fluoreszenzeigenschaften früheren Farbstoffen gegenüber sowie eine verbesserte Spezifität gegenüber Kalzium. Die benötigte Indikatorkonzentration liegt bei nur 20-30 μM . Intrazellulär wird die Estergruppe des Fura-2-AM durch zytoplasmatische Esterasen abgespalten, worauf Fura-2 als nun polares Ca^{2+} -spezifisches Indikator-Anion seine Membrangängigkeit verliert.

Die Anlagerung eines freien Ca^{2+} -Ions führt zu einer Verschiebung der Emissions- und Absorptionsspektren (Cobbold et al., 1987). Das Absorptionsmaximum für das freie Indikator-Anion liegt bei 385 nm, für das mit Kalzium komplexierte liegt es bei 340 nm. Das Emissionsmaximum bleibt konstant bei 510 nm. Deshalb werden die intrazellulär vorliegenden Farbstoffe während der Messungen alternierend mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 385 nm angeregt, während die Emission konstant bei 510 nm gemessen wird (Maeyama et al., 1991). Über folgende Formel kann aus dem Quotient der Emissionen nach den jeweiligen Exzitationen die intrazelluläre Konzentration von freien Kalzium-Ionen bestimmt werden:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \times \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \times \frac{F_0}{F_S}$$

Dabei ist K_D die Dissoziationskonstante von Fura-2 mit dem Wert 224, R das gemessene Verhältnis der aktuellen Fluoreszenzintensitäten, R_{\min} das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Fura-2 in Abwesenheit von Ca^{2+} (bestimmt durch die Zugabe von EDTA), R_{\max} das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von mit Ca^{2+} gesättigtem Fura-2, F_0 die Emissionsintensität bei 510 nm und Exzitation bei 385 nm von freiem Fura-2 und F_S der entsprechende Wert von mit Ca^{2+} gesättigtem Fura-2.

2.7.2. Vorbereitung der Messung

Nach dem Standardprotokoll wurden 5×10^6 Zellen aus den 24-Loch-Platten entnommen und mit $350 \times g$ bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 7 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ein Fura-2-Ansatz, bestehend aus $967,5 \text{ } \mu\text{l}$ PBS^{def}, $20 \text{ } \mu\text{l}$ BSA und $12,5 \text{ } \mu\text{l}$ Fura-2AM (MolecularProbes, Eugene, Oregon, USA), angesetzt. Der Überstand über dem Zellpellet wurde nach der Zentrifugation durch Invertieren der Röhren dekantiert und die Zellen in 1 ml des Fura-2-Ansatzes sorgfältig resuspendiert. Es folgte eine Inkubation unter Standardbedingungen für 25 min. Dabei passiert der lipophile Farbstoff die Zellmembran, wird zytoplasmatisch von Esterasen hydrolytisch gespalten und kann dann als Indikator-Anion die Zelle nicht mehr verlassen. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem freien Indikator-Anion und dem mit Ca^{2+} -Ionen komplexierten Indikator-Anion ein.

Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension noch zwei Mal gewaschen, indem das Volumen mit PBS^{def} (+ 0,1 % BSA) auf jeweils 10 ml aufgefüllt und in der schon beschriebenen Art zentrifugiert ($350 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 7 min), der Überstand dekantiert und das Zellpellet resuspendiert wurde. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in 2 ml PBS^{def} aufgenommen und lagen damit in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml vor.

Aus diesem Pool wurden jetzt je $100 \text{ } \mu\text{l}$ (also 250000 Zellen) in ein well einer für die Fluorimetrie geeigneten 96-well-Platte (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. In jedes well wurden $10 \text{ } \mu\text{l}$ einer definierten $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ -Lösung (Virologie, Uni Marburg) pipettiert. Nun wurde die Platte bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 min im Messgerät FluoStar (bmg, München, Deutschland) inkubiert.

2.7.3. Messvorgang

Der eigentliche Messvorgang findet computergestützt im FluoStar statt. Eine Messreihe dauert 4-6 min und besteht aus wiederholten Messungen von Lichtemissionen der Wellenlänge 510 nm nach alternierender Stimulation des Fluoreszenzfarbstoffes mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 385 nm. Wie beschrieben (Material und Methoden: 2.7.1. Prinzip der Messung) führen Veränderungen des zytoplasmatischen Kalzium-Spiegels zu einer Verschiebung der Absorptionsmaxima des Fura-2.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde zunächst für 40-80 sek der Kalzium-Spiegel in unstimulierten, aber mit der $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ -Lösung bereits equilibrierten Zellen gemessen. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Substanzen stimuliert. Dabei wurde untersucht, ob mit Katecholaminen inkubierte Zellen gegenüber den klassischen Stimuli (fMLP, IL-8) ein verändertes Muster des Kalzium-Influx zeigen. Außerdem wurden Katecholamine als Stimuli verwendet und die darauf folgenden Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bestimmt. Nach der Stimulation wurde die Messung noch 2-3 min weiter geführt.

Alle Messungen wurden im plate mode (Plattenmodus) durchgeführt, was bedeutet, dass der Messkopf bis zu 8 wells parallel, also intermittierend, misst. Zwischen den Einzelmessungen wurde die 96-well-Platte immer wieder horizontal bewegt, um eine bessere Durchmischung mit der $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ -Lösung zu erhalten.

2.8. Messung des cAMP-Spiegels

3',5'-cyclo-Adenosin-monophosphat (cAMP) ist einer der wichtigsten intrazellulären Botenstoffe. Auch bei der Signaltransduktion von adrenergen Rezeptoren spielt zyklisches AMP eine wichtige Rolle. Während die Bindung an α_2 -Rezeptoren den cAMP-Spiegel sinken lässt, bewirkt die Bindung an β -Adrenozeptoren über die Aktivierung der Adenylatcyclase eine Erhöhung der zytoplasmatischen cAMP-Konzentration. Physiologischerweise wird cAMP von intrazellulär vorhandenen Phosphodiesterasen zu AMP hydrolytisch gespalten.

2.8.1. Prinzip der Messung

Das in dieser Arbeit angewandte Testprinzip für die Messung der Konzentration von cAMP ist das Prinzip eines kompetitiven enzym-konjugierten immunologischen Bindungsversuchs (kompetitiver ELISA). Das in der Probe enthaltene cAMP konkurriert mit einer genau definierten Menge von zugegebenem enzymmarkierten cAMP um die Bindungsstellen eines polyklonalen Antikörpers. Während der Inkubationszeit wird der gegen cAMP gerichtete Antikörper über einen zweiten Antikörper auf einer Plastikoberfläche gebunden. In einem Waschschrift wird dann der Überschuss des Konjugates sowie freies cAMP entfernt. Nun wird ein Substrat hinzugegeben, das durch das an den ersten Antikörper gebundene Enzym in einer Farbreaktion umgesetzt wird. Die Intensität der Farbe und damit die Extinktion ist proportional zur Menge des Enzyms und antiproportional zum unbekanntem cAMP-Gehalt in der Probe.

2.8.2. Durchführung des cAMP-Assays

Die Durchführung des cAMP-Assays erfolgte mit Hilfe eines kompletten Testsystems von R&D Systems (Cyclic AMP, low pH, Immunoassay; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland). Soweit nicht anders erwähnt, stammen alle in diesen Experimenten verwendeten Chemikalien aus dem Testsystem.

Zur Probenvorbereitung wurden $2,5 \times 10^6$ Neutrophile nach einer Inkubationszeit von 5-120 min in verschiedenen Konzentrationen von Adrenalin auf Eis gestellt, um alle Stoffwechselforgänge zu unterbrechen. Die Zellsuspensionen wurden mit $350 \times g$ bei $4^\circ C$ für 7 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in $150 \mu l$ PBS^{def} resuspendiert. Durch die Zugabe von $150 \mu l$ 0,1N Salzsäure wurden die neutrophilen Granulozyten lysiert. Anschließend wurden in jedes Probenloch (mit Ausnahme des Loches für die Negativ-Kontrolle) der mitgelieferten 96-Loch-Platte $50 \mu l$ Neutralisierungslösung, $100 \mu l$ Zelllysat bzw. $100 \mu l$ der vorbereiteten Standardreihe, $50 \mu l$ des enzym-konjugierten cAMPs und $50 \mu l$ des anti-cAMP-Antikörpers gegeben, und die gesamte Platte wurde für 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. An dieser Stelle konkurriert nun das cAMP zellulärer Herkunft mit dem enzym-konjugierten cAMP des Testsystems.

Nach der Inkubation wurden die Vertiefungen der 96-Loch-Platte mit einem Waschpuffer, einer gering konzentrierten Proteinlösung, zwei Mal gewaschen. Jedem Loch wurden jetzt 200 µl pNPP zugefügt, was ein Substrat für das an den ersten Antikörper konjugierte Enzym alkalische Phosphatase ist. Der ganze Ansatz wurde erneut für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin in einem Platten-Lesegerät ausgewertet, indem die optische Dichte jeder Vertiefung bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt wurde.

2.9. Durchflusszytometrie im FACScan®

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften einzelner Zellen werden simultan gemessen. Mit der Durchflusszytometrie können, unabhängig von der untersuchten Zellart, die Größe und Struktur einer Zelle, DNA/RNA-Anteile, antigenetische Zusammensetzung von Zelloberflächen und Zytoplasma, Proteingehalt sowie einige weitere strukturelle und funktionelle Eigenschaften einzelner Zellen bestimmt werden (Carulli et al., 1996; Marshall et al., 1997; Yuan et al., 1993).

2.9.1. Arbeitsprinzip eines Durchflusszytometers

Das Arbeitsprinzip eines Durchflusszytometers beruht auf der gleichzeitigen Messung von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen an einzelnen Zellen. Relative Zellgröße, Granularität sowie drei verschiedene Fluoreszenzfarben können für mehr als zehntausend Zellen in weniger als einer Minute ermittelt werden. Über einen angeschlossenen Computer werden die erhobenen Daten verarbeitet und die Ergebnisse in einfacher und klarer Form ausgegeben. So sind verschiedene Zellarten innerhalb einer Probe mit zuverlässig und objektiv quantifizierbaren Ergebnissen getrennt analysierbar.

2.9.2. Aufbau eines Durchflusszytometers

Grundvoraussetzung zur Messung mit einem Durchflusszytometer ist das Vorliegen der zu untersuchenden Probe als Einzelzellsuspension in einer Konzentration von etwa $0,5-20 \times 10^6$ Zellen/ml. Abb. 4 gibt eine Übersicht über den Aufbau eines Durchflusszytometers.

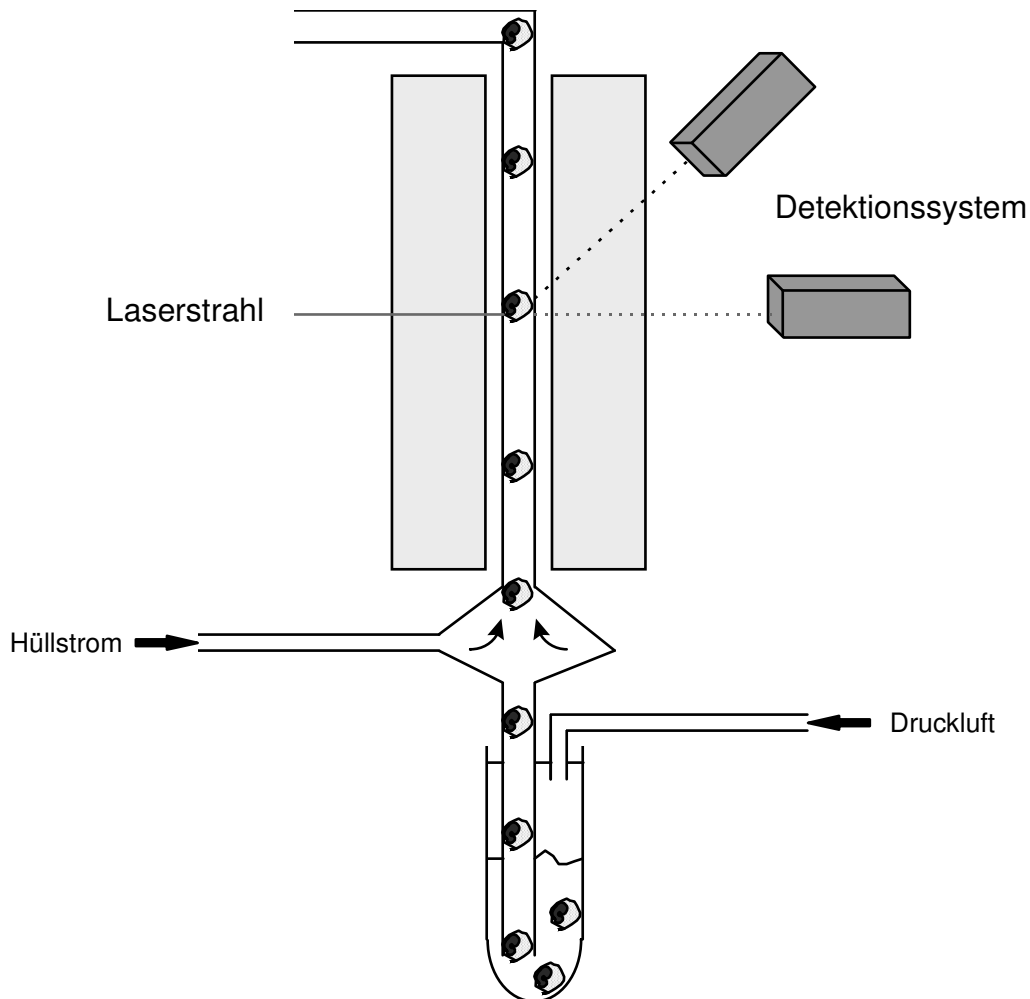


Abb. 4 gibt den systematischen Aufbau eines Durchflusszytometers wieder.

Zur Analyse wird die in einem speziellen Röhrchen vorliegende Zellsuspension über eine Stahlkapillare mittels Überdruck in die aus Quarzglas bestehende Messkuvette eingeführt. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen durch eine die Messkuvette umgebende Trägerflüssigkeit beschleunigt. Durch diesen sogenannten Hüllstrom wird nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung der

Probenstrom stabilisiert und die Zellen hintereinander angeordnet wie die Perlen einer Perlenkette. Die so angeordneten Zellen passieren im Zentrum der Messküvette den Fokus eines Laserstrahls mit einer Geschwindigkeit von ca. 300 Zellen/sek. Der Laserstrahl, ein Argon-Laser der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$, stellt als Analysepunkt die wichtigste Stelle im gesamten System dar. Dort werden die Zellen im Bruchteil einer Sekunde erfasst und analysiert.

2.9.3. Messung der Lichtstreuung

Der Begriff Lichtstreuung bezeichnet den physikalischen Prozess der Interaktion eines Partikels (zum Beispiel einer Zelle) mit dem einfallenden Licht. Dabei verändert sich nur die Richtung, nicht aber die Wellenlänge (Farbe) des anregenden Lichtes. Die Zellgröße, die Struktur der Zellmembran, die Größe und Beschaffenheit des Zellkerns und intrazelluläre granuläre Bestandteile beeinflussen die Lichtstreuung.

Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut. Der größte Anteil folgt der Richtung des einfallenden Lichtstrahls, das sogenannte Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC). Es ist in erster Linie ein Maß für die Zellgröße. Kleine Zellen streuen also weniger Licht. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht hängt hauptsächlich von der intrazellulären Granularität ab. Die Bezeichnung lautet Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC).

2.9.4. Messung der Fluoreszenz

Unter dem Begriff Fluoreszenz versteht man das durch Strahlung angeregte Leuchten eines Stoffes. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie über einen für sie charakteristischen Wellenlängenbereich. Mit dieser Energie werden Elektronen in ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Rücksprung des Elektrons zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon. Dieser Strahlungsübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Der Lichtbereich, über den eine fluoreszierende Verbindung angeregt werden kann, ist dessen Absorptionsspektrum. Das abgestrahlte Licht bestimmt das Emissionsspektrum. Es ist langwelliger als das Anregungslicht, weil die beim Emissionsübergang abgegebene Energie geringer ist als die beim Absorptionsübergang aufgenommene. Die emittierte Fluoreszenz wird gemessen und digi-

talisiert, wobei die gemessene Fluoreszenzintensität in direktem Zusammenhang mit der Menge des vorhandenen Farbstoffs auf oder in der Zelle steht.

2.9.5. Datenauswertung

Ein Durchflusszytometer erlaubt die simultane Messung von FSC, SSC und bis zu drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. Durch die beiden Parameter Zellgröße und Zellgranularität, also FSC und SSC, lassen sich verschiedene Zellpopulationen unterscheiden (Ritchie et al., 1983). Durch Setzen eines entsprechenden Aufnahme-limits (gate) ist es möglich, ausschließlich die Daten einer bestimmten Subpopulation der untersuchten Zellen aufzunehmen und irrelevante Zellen schon während der Messung von der Untersuchung auszuschließen (Abb. 5).

Bei der Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe ist darauf zu achten, dass die jeweiligen Absorptionsmaxima möglichst nahe beieinander liegen, um eine gleichzeitige und gleichmäßige Anregung mit nur einer Wellenlänge erlangen zu können. Die Emissionsmaxima dagegen sollten sich deutlich in ihrer Wellenlänge voneinander unterscheiden, um eine überschneidungsfreie Auswertung zu ermöglichen. Klassisches Beispiel einer guten Kombination zweier Fluorochrome ist die Zweifarben-Immunfluoreszenzanalyse mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), welches im grünen Bereich emittiert, und Phycoerythrin (PE), welches sein Emissionsmaximum im roten Bereich hat. Diese Kombination wurde auch für die vorliegende Untersuchung verwendet.

Bei der Datenauswertung der Fluoreszenzintensitäten ist zu berücksichtigen, dass alle Zellen in geringem Maße autofluoreszierend sind, also ein gewisses Maß an Fluoreszenzintensität aufweisen, auch wenn kein Fluorochrom-gekoppelter Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden hat. Aus diesem Grund muss das Durchflusszytometer so eingestellt werden, dass nur Fluoreszenzintensitäten gemessen oder ausgewertet werden, die über der durch Negativ-Kontrollen ermittelten höchsten Autofluoreszenzintensität liegen.

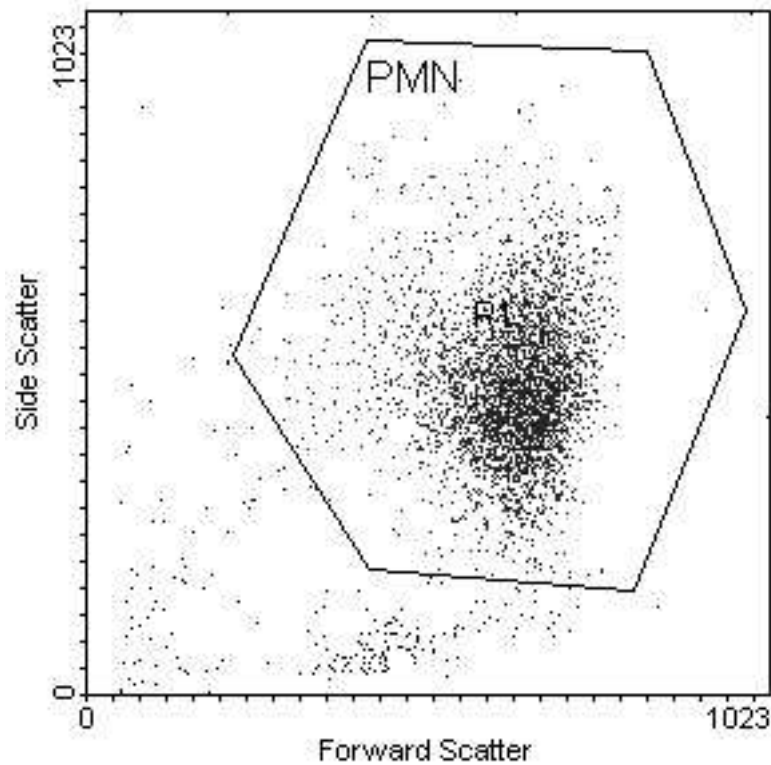


Abb. 5 zeigt die Darstellung im dot-plot Diagramm sowie ein Gate, welches die Population der Granulozyten farblich markiert. Als sogenanntes Live-gate schließt es anderen Zellen während der Datenaufnahme aus.

Die graphische Auswertung von gemessenen Daten lässt sich zum einen in einem dot-plot Diagramm (Abb. 5) darstellen. Hierbei werden zwei gemessene Parameter gegenüber gestellt und in ein zweidimensionales Koordinatensystem übertragen. Bei dieser Art der Darstellung entspricht jeder Punkt einer Zelle und zeigt die zwei gewählten Eigenschaften, im Fall der Doppelfärbung meist die beiden Fluoreszenzintensitäten. Im Gegensatz dazu wird bei der Darstellungsweise des Histogramms (Abb. 6) die gemessene Fluoreszenzintensität der Anzahl der Zellen, die genau diese Intensität aufweisen, gegenübergestellt.

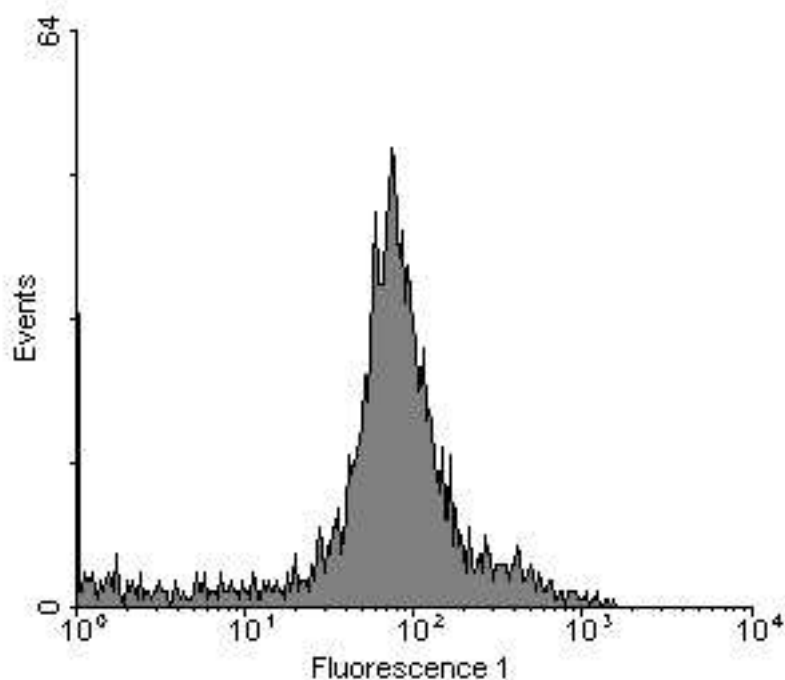


Abb. 6 zeigt ein Histogramm, aus dem die Anzahl der Zellen, die eine genau bestimmte Fluoreszenzintensität aufweisen, hervorgeht.

2.9.6. Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen

Von den aus den 24-Loch-Platten entnommenen Zellen wurden jeweils 2×10^5 Zellen in ein Polystyren-Rundbodenröhrchen (12 x 75 mm, Falcon[®]; Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) überführt und wie beschrieben vom Überstand befreit (Material und Methoden: 2.5.4. Entnahme von neutrophilen Granulozyten aus den 24-Loch-Platten). Anschließend wurden die Zellen in einer 2 %igen Lösung von Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) in PBS^{def} fixiert (20 min, bei Raumtemperatur). Für den nun folgenden Waschschrift wurden zunächst 2 ml Waschpuffer (PBS^{def} + 2 % AB-Serum; Sigma, München, Deutschland) zugegeben. Die fixierten Zellen wurden mit 400 x g bei 4 °C für 7 min zentrifugiert, der Überstand durch Invertieren der Probenröhrchen sorgfältig dekantiert und die pelletierten Zellen in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert.

Der eigentliche Färbeschritt bestand aus der Inkubation der Zellen mit FITC- bzw. PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenantigene. Um neutrophile Granulozyten zweifelsfrei identifizieren zu können,

wurden alle Färbungen als Doppelfärbungen durchgeführt. Daher wurde zu jedem Ansatz, in dem ein Adhäsionsmolekül oder ein intrazelluläres Zytokin mit Hilfe eines PE-markierten Antikörpers untersucht werden sollte, auch der für neutrophile Granulozyten spezifische FITC-markierte anti CD66b Antikörper zugegeben. Folgende Antikörperlösungen wurden verwendet:

Bestimmung der Reinheit und Differenzierung der verunreinigenden Zellen:

- 8 µl anti CD4 FITC + anti CD8 PE (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA)
- 5 µl anti CD14 FITC (Immunotech, Hamburg, Deutschland)
- 4 µl anti CD66b FITC (Immunotech, Hamburg, Deutschland)

Färbung von Adhäsionsmolekülen (Doppelfärbung mit 4 µl anti CD66b FITC)

- 4 µl anti CD15 PE (Immunotech, Hamburg, Deutschland)
- 4 µl anti CD44 PE (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA)
- 4 µl anti CD54 PE (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA)

Färbung intrazellulärer Zytokine (Doppelfärbung mit 4 µl anti CD 66b FITC)

- 0,5 µl anti IL-6 PE (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA)
- 0,5 µl anti IL-8 PE (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA)
- 1 µl anti TNF- α (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA)

Die verwendeten Antikörperlösungen wurden mit Waschpuffer auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und in die entsprechenden Ansätze gegeben. Um zu durchmischen, wurden die Probenröhrchen vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur und in völliger Dunkelheit inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten (Zugabe von 2 ml Waschpuffer, Zentrifugation mit 400 x g bei 4 °C für 7 min, Dekantieren des Überstandes und vorsichtiges Resuspendieren des Zellpellets) wurden die neutrophilen Granulozyten in einem Volumen von 500 µl PBS^{def} aufgenommen. In den meisten Fällen folgte direkt im Anschluss die durch-

flusszytometrische Analyse im FACScan[®]. Wo das nicht möglich war, wurden die Zellen in 500 µl einer 1 %igen Lösung von Paraformaldehyd in PBS^{def} in völliger Dunkelheit und bei 4 °C aufbewahrt. In diesen Fällen fand die Analyse im FACScan[®] innerhalb der nächsten zwölf Stunden statt. Im FACScan[®] wurden 10000 auf die Population der Neutrophilen gegatete Messereignisse aufgenommen.

2.9.7. Besonderheiten bei der Färbung intrazellulärer Zytokine

Die Immunfluoreszenzfärbung von intrazellulär vorliegenden Zytokinen ist immer noch eine recht neue Methode, die in neutrophilen Granulozyten bisher selten zur Anwendung kam. Sie erlaubt die Identifikation einzelner Subpopulationen und die Untersuchung der Produktion von Zytokinen in diesen Populationen (Vikingsson et al., 1994; Prussin et al., 1995; Mascher et al., 1999).

Bei der Vielfalt der Variationen dieser Methode ist den meisten publizierten Anwendungen die Verwendung von Formaldehyd oder Paraformaldehyd zur Fixierung der Zellen und Saponin zum Perforieren der Zellmembran gemeinsam. Auch die Zugabe eines Proteintransportinhibitors (Monensin oder Brefeldin A) während der Inkubationszeit ist unumstritten, allerdings muss die Dauer dieser Zugabe kritisch betrachtet werden, da beide Substanzen zytotoxische Eigenschaften aufweisen (Tartakoff, A. M., 1983; Mollenhauer et al., 1990).

Auch in dieser Studie wurde den inkubierten Zellen ein Proteintransportinhibitor zugesetzt (Material und Methoden: 2.5.3. Inkubation neutrophiler Granulozyten zur Untersuchung der Neusynthese von Zytokinen). Die Färbeprozedur unterschied sich von der Immunfluoreszenzfärbung für Oberflächenproteine nur durch die Verwendung eines anderen Waschpuffers, der neben 2 % AB-Serum auch noch 0,2 % Saponin (Merck, Darmstadt, Deutschland) enthält. Dieser Puffer wurde für die Inkubation mit den Anti-Zytokin-Antikörpern und für alle folgenden Waschschritte verwendet, so dass die Antikörper sowohl in den Intrazellularraum gelangen als auch, falls keine Bindung an das spezifische Antigen erfolgte, wieder hinaustreten konnten.

2.9.8. Durchführung der Negativ-Kontrollen

Prinzipiell sind drei verschiedene Kontrollen möglich; zum einen die Isotyp-Kontrolle, zum zweiten die Vorinkubation der Zellen mit nicht-markiertem Anti-Zytokin-Antikörper und zum letzten die Vorinkubation der markierten Anti-Zytokin-Antikörper mit dem zu detektierenden Zytokin. In der vorliegenden Studie wurden die zwei letztgenannten Methoden verwendet, weil sie die beiden aussagekräftigsten sind. Beide Prozeduren dienen dem Ausschluss bzw. der Quantifizierung unspezifischer Bindungen des Antikörpers.

Für die Vorinkubation mit nicht-markiertem Anti-Zytokin-Antikörper wurden die Zellen mit einem fünffachen Überschuss dieses Antikörpers unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert. Nach einem Waschschriff (Zentrifugieren mit 350 x g bei 4 °C für 7 min, Dekantieren des Überstandes und Resuspendieren des Zellpellets) wurden die Zellen dann wie gewohnt mit dem PE-markierten Anti-Zytokin-Antikörper inkubiert. Falls der erste, nicht-markierte Antikörper spezifisch binden konnte, trifft der zweite, PE-markierte Antikörper nur noch auf bereits besetzte Antikörper-Bindungsstellen und wird in den folgenden Waschschriffen ausgewaschen (Jung et al., 1993).

Für die Vorinkubation mit dem zu detektierenden Zytokin wurde der PE-markierte, gegen IL-8 gerichtete Antikörper (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) mit einem ca. 80-fachen molaren Überschuss von IL-8 (20 µg IL-8, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) für 20 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Diese Antikörper-Lösung wurde dann für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet. Falls der PE-markierte Antikörper an das Zytokin binden konnte, sind die spezifischen Bindungsstellen des Antikörpers schon besetzt und können durch das zytoplasmatisch vorliegende Zytokin nicht mehr besetzt werden. Dadurch wird der Antikörper in den folgenden Waschschriffen ausgewaschen (Prussin et al., 1995).

2.10. Statistische Auswertung

Die Experimente zur Messung der Expression von Oberflächenproteinen auf neutrophilen Granulozyten wurden an Zellpopulationen von zehn gesunden Spendern durchgeführt. Zu jedem Messzeitpunkt wurden in jedem experimentellen Ansatz 10000 Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Experimente zur Messung der Produktion intrazellulärer Zytokine wurden an den Zellpopulationen acht gesunder Spender durchgeführt. Auch hier wurden in jedem experimentellen Ansatz 10000 Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Messgröße diente der Parameter der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), der ein Maß für die Dichte von fluoreszierenden Antikörpern auf oder in einer Zelle darstellt. Damit reflektiert er die Menge an Adhäsionsmolekülen oder Zytokinen, die pro Zelle vorhanden ist.

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaStat for Windows der Firma Jandel Corporation. Um zu prüfen, ob die Veränderung der Expression eines Adhäsionsmoleküls bzw. der Produktion eines Zytokins signifikant war, wurden Varianzanalysen mit Messwiederholungen (one way ANOVA with repeated measures) errechnet. In einigen Fällen waren die Daten nicht normalverteilt. Hier wurde der Friedman-Test (one way ANOVA on ranks) durchgeführt. Als signifikant wurde ein Ergebnis dann bewertet, wenn der errechnete p-Wert $< 0,05$ war. Die Nullhypothese für beide Tests lautete, dass sich die mit Adrenalin in drei unterschiedlichen Konzentrationen inkubierten Zellen nicht von den ohne Adrenalin inkubierten Zellen unterscheiden würden. Daher musste ein signifikantes Ergebnis näher definiert werden, um herauszufinden, welche der getesteten Gruppen sich signifikant von der Kontrollgruppe unterschied. Diese statistische Fragestellung wurde mit den Tests nach Bonferroni bzw. nach Dunn untersucht.

Die Experimente zur Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration und des cAMP-Spiegels wurden in geringer Zahl durchgeführt, so dass hierbei eine statistische Auswertung nicht sinnvoll war. Stattdessen wird in dieser Arbeit das Ergebnis eines repräsentativen Spenders graphisch dargestellt. Die Daten der anderen durchgeführten, nicht abgebildeten Versuche sind tabellarisch aufgeführt.

III. Ergebnisse

1. Vitalität, Menge und Reinheit der isolierten Zellen

Aus einem buffy coat konnten bis zu 1×10^9 Zellen neutrophile Granulozyten isoliert werden. Die Vitalität wurde mittels Trypanblau-Färbung bestimmt und lag bei 99 %. Die Reinheit der durch die Ficoll-Hypaque-Methode isolierten neutrophilen Granulozyten wurde in der CASY1-Apparatur bestimmt und lag zwischen 70 % und 85 %, sehr selten auch darüber. Zur exakten Bestimmung der verunreinigenden Zellen wurden die gerade isolierten Zellen durchflusszytometrisch untersucht (Material und Methoden: 2.4.2. Analyse in der Durchflusszytometrie). Dabei zeigte sich, dass die verunreinigenden Zellen fast ausschließlich Lymphozyten waren (grün gefärbte Population in Abb. 7). Sonstige verunreinigende Zellen waren nur in geringem Ausmaß vorhanden und ließen sich nicht einer Population zuordnen.

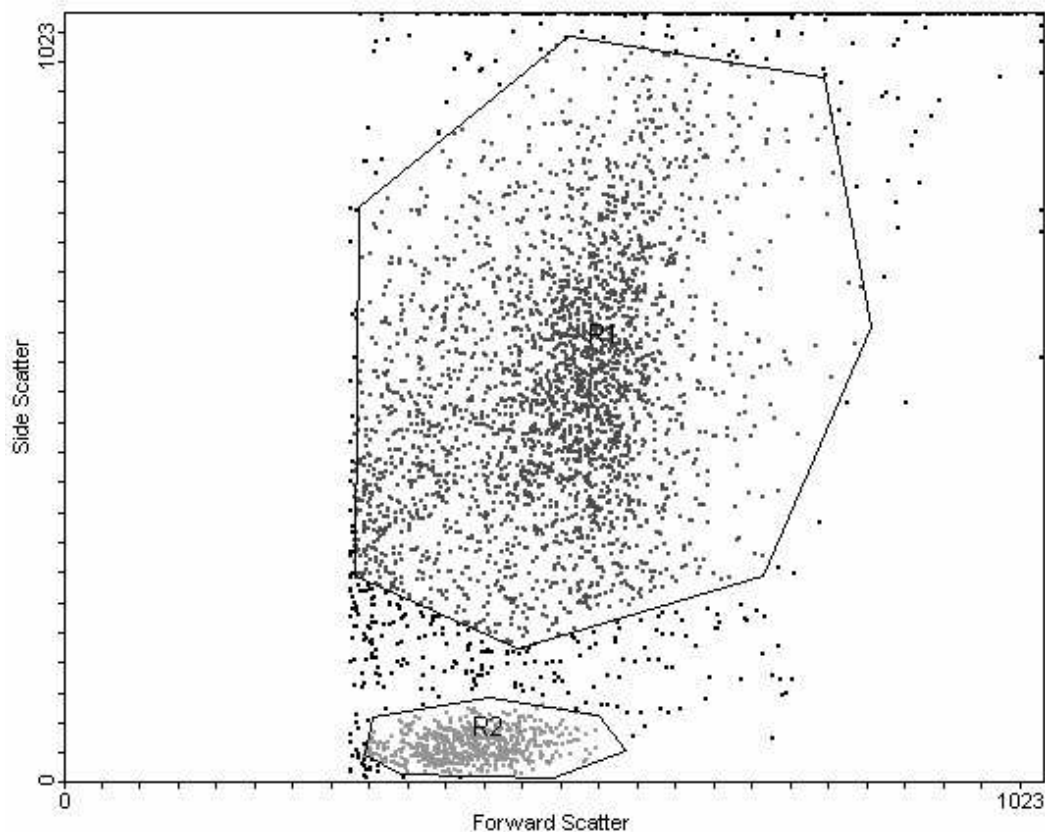


Abb. 7 zeigt zwei Populationen, die rot markierten neutrophilen Granulozyten sowie die grün markierten Lymphozyten. Andere, in der Abbildung nicht farbig markierte Zellen waren in so geringem Ausmaß vorhanden, dass sie nicht weiter differenziert werden mussten.

1.1. Immunomagnetische Elimination von T-Lymphozyten

Durch die beschriebene weitere Auftrennung mit Hilfe von magnetisierbaren Antikörpern gegen das für T-Zellen spezifische Antigen CD2 (Material und Methoden: 2.1.3. Immunomagnetische Elimination von T-Lymphozyten) konnte die Reinheit der isolierten Zellen erheblich gesteigert werden (siehe dazu die kleiner gewordene grün gefärbte Population der Lymphozyten in Abb. 8).

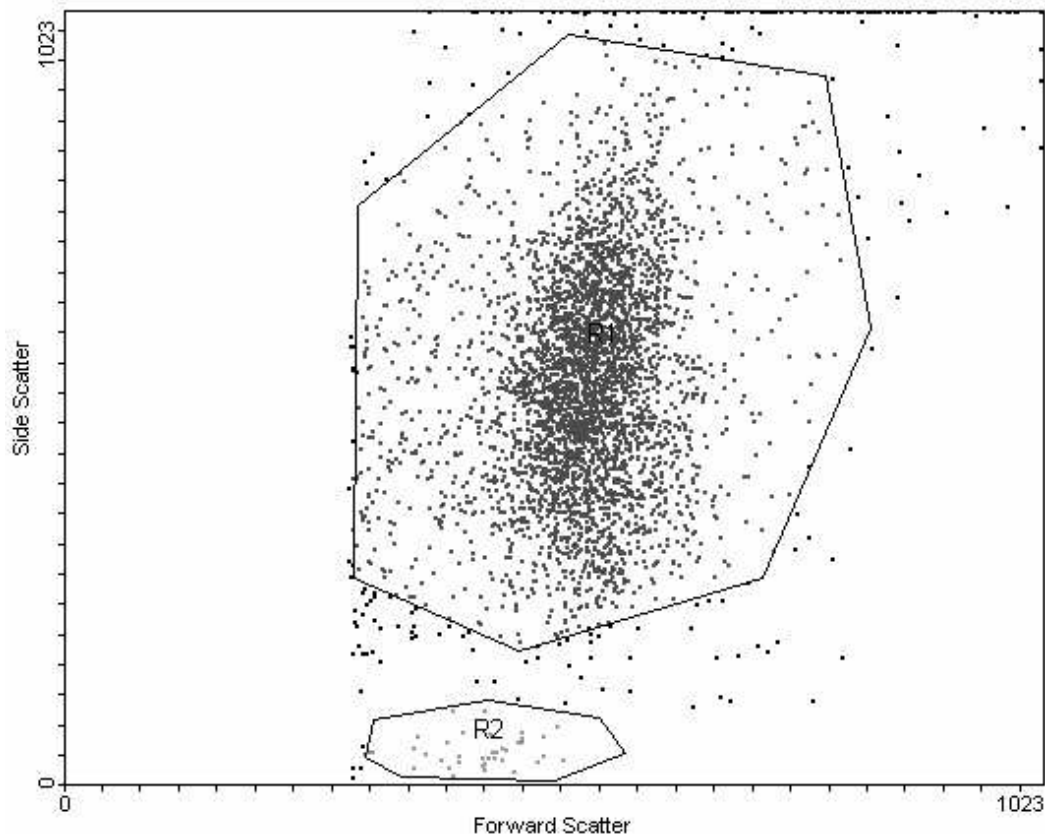


Abb. 8 zeigt die Zellen, nachdem der zusätzliche Schritt der T-Zell-Deletion durchgeführt wurde. Die Population der Lymphozyten (grün markiert) ist deutlich kleiner geworden. Auch in dieser Abbildung sind einige Zellen zu finden, die sich keiner der beiden markierten Populationen zuordnen lassen.

Die Reinheit der isolierten Zellen nach der Ficoll-Hypaque-Methode lag bei ca. 75 % und konnte mit Hilfe der nachgeschalteten T-Zell-Deletion auf ca. 95 % gesteigert werden (siehe Abb. 9). Für die nachfolgenden Versuche wurden nur Präparationen verwendet, deren Reinheitsgrad bei über 90 % lag. Bezüglich der verunreinigenden Zellen wurden die Präparationen ausgeschlossen, deren Monozytenanteil über 1 % lag. Bei Anwendung dieser Ausschlusskriterien mussten etwa 10 % der Präparationen ausgeschlossen werden.

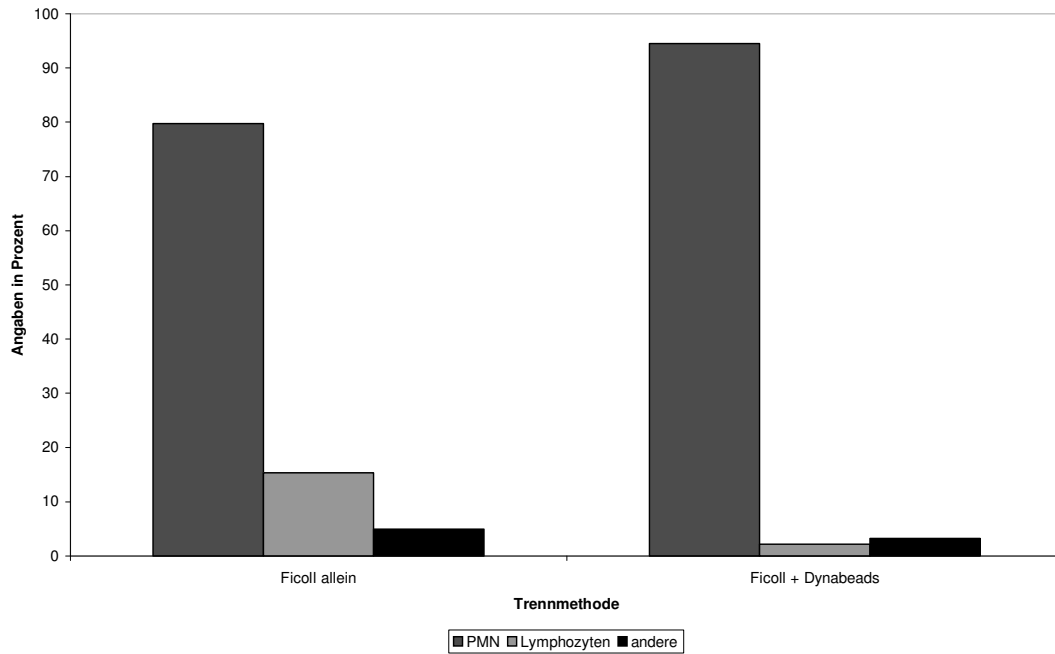


Abb. 9 stellt beispielhaft das Ergebnis der Aufreinigung einer Präparation allein durch die Ficoll-Hypaque-Methode dem Ergebnis der Aufreinigung mit nachgeschalteter T-Zell-Deletion gegenüber. Man erkennt, dass die Reinheit der neutrophilen Granulozyten in demselben Maße steigt, wie der Anteil von verunreinigenden Lymphozyten sinkt.

1.2. Elutriation von neutrophilen Granulozyten

Durch die Methode der Gegenflusszentrifugation können nicht nur periphere humane Monozyten isoliert und angereichert werden, sondern auch neutrophile Granulozyten (Material und Methoden: 2.2.2. Elutriation). Die Reinheit dieser Präparationen lag regelhaft bei über 90 % und war damit der alleinigen Ficoll-Hypaque-Methode überlegen.

Bezüglich der Expression von CD66b, dem für neutrophile Granulozyten spezifischen Oberflächenantigen, fand sich aber, dass durch Elutriation aufgereinigte Granulozyten das Oberflächenantigen in geringerem Maße exprimierten als neutrophile Granulozyten, die mittels Ficoll-Hypaque-Methode mit anschließender immunomagnetischer T-Zell-Elimination aufgereinigt wurden (siehe Abb. 10). Die Expression von CD66b eines Teiles der Neutrophilen war nach Elutriation so gering, dass nicht mehr zwischen spezifischer und unspezifischer Fluoreszenz unterschieden werden konnte. Dadurch konnte der Level der Expression von CD66b nicht mehr als Einschlusskriterium für die Auswertung der durchflusszytometrisch gewonnenen Daten verwendet werden.

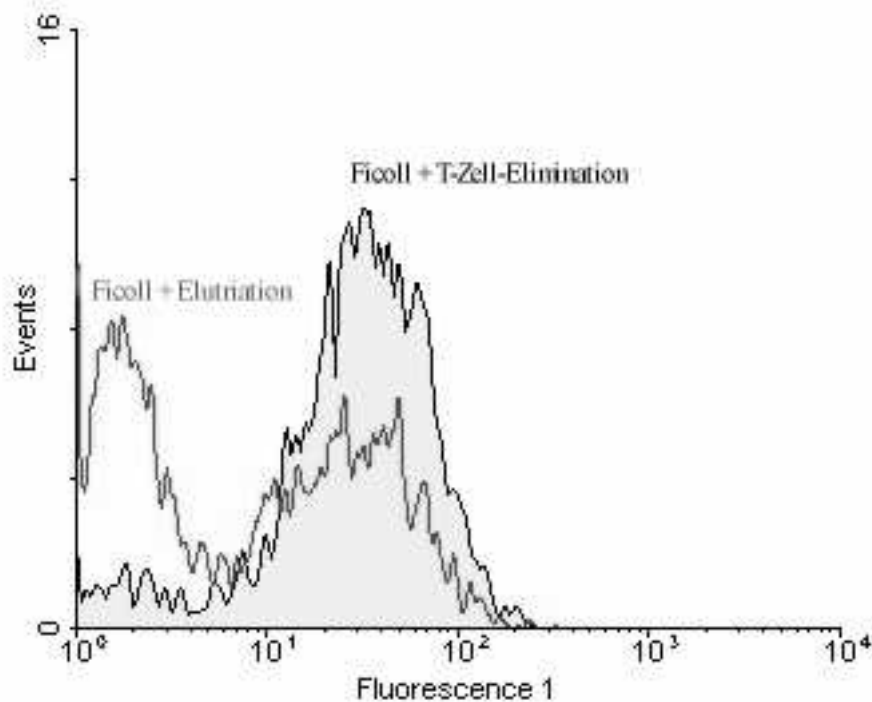


Abb. 10 zeigt die unterschiedliche Expression von CD66b (Fluoreszenz 1) von neutrophilen Granulozyten, die nach der Ficoll-Hypaque-Methode elutriert wurden (rotes Histogramm), und solchen, die nach der Ficoll-Hypaque-Methode zusätzlich der immunomagnetischen T-Zell-Elimination unterzogen wurden (schwarzes Histogramm). Man erkennt die deutlich schwächere Expression von CD66b bei den elutrierten Zellen.

Das Einschlusskriterium der positiven CD66b-Expression war für die Auswertung der Daten jedoch zwingend notwendig, um aus der Gruppe der im Aufnahmezeitraum (live gate) liegenden Zellen diejenigen herauszufiltern, die zwar in dieser Population lagen, aber trotzdem keine neutrophilen Granulozyten waren. Deshalb wurde die Präparation von Neutrophilen durch Elutriation nicht weiter durchgeführt. Stattdessen wurde die Ficoll-Hypaque-Methode mit anschließender T-Zell-Elimination und möglichem Einschlusskriterium der positiven CD66b-Expression verwendet, um neutrophile Granulozyten in ausreichender Reinheit zu isolieren und verbleibende Verunreinigungen in der Auswertung ausschließen zu können.

2. Intrazelluläre Botenstoffe nach Adrenalin-Stimulation

Um nachzuweisen, dass das in den Versuchen eingesetzte Adrenalin biologisch wirksam war und β -Adrenozeptoren stimulierte, wurden der intrazelluläre cAMP-Spiegel und der Kalzium-Influx nach Adrenalin-Stimulation gemessen.

2.1. Messung des intrazellulären cAMP-Spiegels

Wie beschrieben bindet Adrenalin hauptsächlich an β -Adrenozeptoren und führt dadurch zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. In diesem Versuch wurden neutrophile Granulozyten für 5-150 min mit Adrenalin in verschiedenen Konzentrationen inkubiert, anschließend vom Überstand befreit, lysiert und mittels ELISA auf cAMP hin untersucht (Material und Methoden: 2.8. Messung des cAMP-Spiegels). Abb. 11 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Spenders.

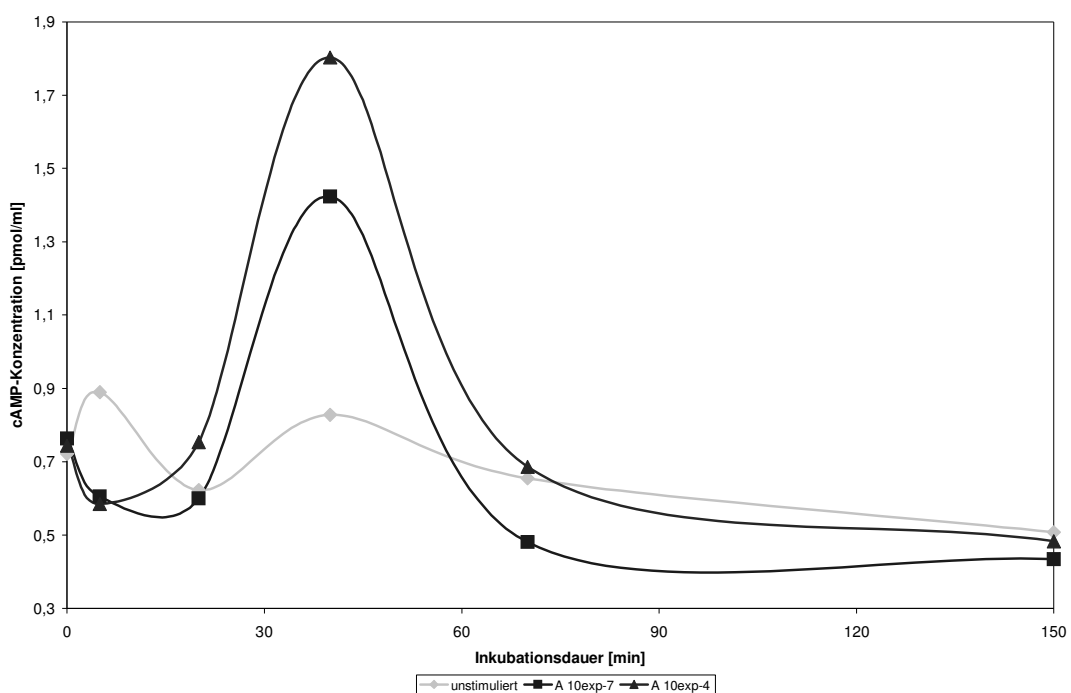


Abb. 11 zeigt die mittels ELISA gemessene intrazelluläre cAMP-Konzentration nach Stimulation neutrophiler Granulozyten mit Adrenalin unterschiedlicher Konzentration für 0-150 min. Dargestellt sind die Daten eines repräsentativen Spenders.

Zu sehen ist eine nach ca. 20 min einsetzende, fulminante Erhöhung des intrazellulären cAMPs, die mit einer Bindung von Adrenalin an β -Adrenozeptoren erklärt werden kann. Damit wurde ein deutlicher Hinweis dafür erbracht, dass β -Adrenozeptoren auf neutrophilen Granulozyten vorhanden sind und dass das über die Adenylatcyclase vermittelte second messenger System in Neutrophilen biologisch aktiv oder zumindest aktivierbar ist. Tab. 6 zeigt die Ergebnisse aus den vier durchgeführten Versuchen.

	Adrenalin-Konzentration	0 min	5 min	20 min	40 min	70 min	150 min
Spender I	Kontrolle	0,722	0,890	0,623	0,828	0,655	0,508
	10⁻⁷ M	0,763	0,605	0,600	1,423	0,481	0,434
	10⁻⁴ M	0,744	0,585	0,754	1,803	0,686	0,483
Spender II	Kontrolle	0,142	0,235	0,240	0,535	0,237	0,336
	10⁻⁷ M	0,124	0,201	0,101	0,447	0,232	0,287
	10⁻⁴ M	0,212	0,334	0,329	0,346	0,452	0,235
Spender III	Kontrolle	0,006	0,161	0,000	0,533	0,190	0,343
	10⁻⁷ M	0,335	0,000	0,003	0,283	0,598	0,543
	10⁻⁴ M	5,697	0,003	0,007	4,335	8,658	1,375
Spender IV	Kontrolle	0,210	0,282	0,022	0,741	1,008	1,847
	10⁻⁷ M	0,000	0,144	0,003	0,206	1,068	1,284
	10⁻⁴ M	0,135	0,084	1,162	1,853	6,406	1,808

Tab. 6 zeigt die mittels ELISA gemessene cAMP-Konzentration [pmol/ml] aus Zelllysaten nach Inkubation neutrophiler Granulozyten mit Adrenalin (10⁻⁷ M und 10⁻⁴ M) für 0-150 min.

2.2. Messung des Kalzium-Influx

Eine Bindung von Adrenalin auf α_1 -Adrenozeptoren führt zu einer deutlichen Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration (Einleitung: 3.2.1. α_1 -Adrenozeptoren). Um zu überprüfen, ob neutrophile Granulozyten biologisch aktive α_1 -Rezeptoren tragen, wurde der Kalzium-Influx nach Stimulation mit Adrenalin und Noradrenalin untersucht.

2.2.1. Etablierung der Methode

Da die Messung des Kalzium-Influx in neutrophilen Granulozyten eine selten verwendete Methode ist, mussten erst Positiv-Kontrollen durchgeführt werden, um die Funktionstüchtigkeit dieser Messmethode nachzuweisen. Dafür wurden neutrophile Granulozyten mit dem klassischen Stimulus fMLP und mit dem für Neutrophile spezifischen CXC-Chemokin IL-8 inkubiert. In Abb. 12 markiert der schwarze Pfeil den Zeitpunkt der Stimulation mit fMLP bzw. IL-8. Man erkennt, dass sowohl fMLP als auch IL-8 den erwarteten Kalzium-Influx auslösten.

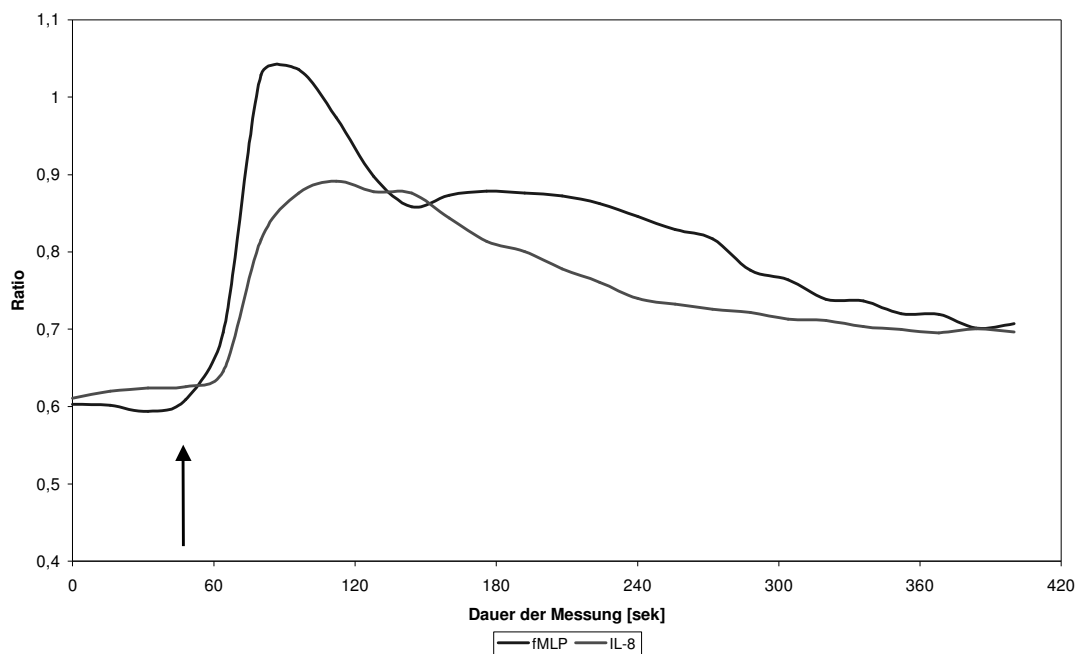


Abb. 12 zeigt den erwarteten Kalzium-Influx nach Stimulation mit fMLP (blauer Graph) bzw. Interleukin-8 (roter Graph). Der schwarze Pfeil markiert den Zeitpunkt der Stimulation. Die Ratio ist ein Maß für die Menge der in der Zelle vorliegenden Kalzium-Ionen.

2.2.2. Stimulation mit Adrenalin bzw. Noradrenalin

In diesen Versuchen wurden Zellen statt mit den klassischen Stimuli (fMLP oder IL-8) mit Adrenalin bzw. Noradrenalin in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. In Abb. 13 ist der Kalzium-Influx dargestellt, der aus der Stimulation mit Puffer bzw. mit Adrenalin oder Noradrenalin in zwei Konzentrationen resultierte. Die Reaktion, die nach einer Stimulation mit Adrenalin oder Noradrenalin auftrat, unterschied sich nicht von der Negativ-Kontrolle (Stimulation mit Puffer, schwarzer Graph).

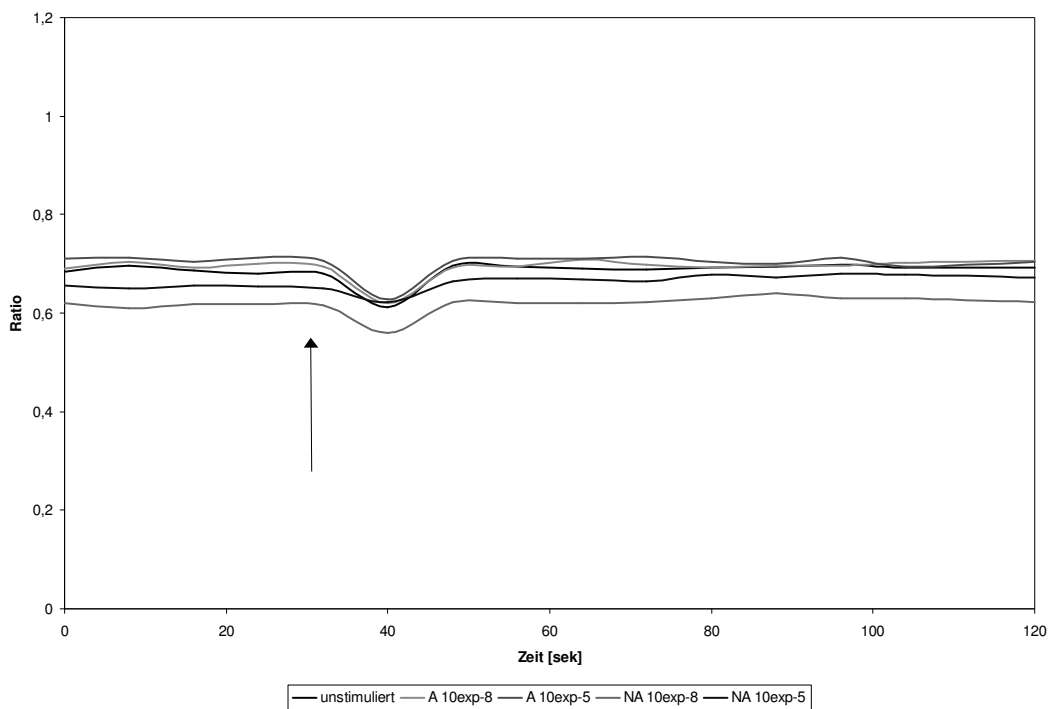


Abb. 13 zeigt, dass sich die Reaktion auf eine Stimulation mit Adrenalin (orangefarbener und roter Graph) bzw. Noradrenalin (hellblauer und dunkelblauer Graph) nicht von der Negativ-Kontrolle (Stimulation mit Puffer, schwarzer Graph) unterscheidet. Der schwarze Pfeil gibt den Zeitpunkt der Stimulation an.

Im gewählten Versuchsaufbau löste weder Adrenalin noch Noradrenalin einen Kalzium-Influx aus, obwohl die klassischen Stimuli dies im gleichen Versuchsaufbau taten. Dies kann als Hinweis dafür gedeutet werden, dass auf neutrophilen Granulozyten keine biologisch aktivierbaren α_1 -Adrenozeptoren vorhanden sind.

3. Expression von Oberflächenproteinen

Die Expression von Oberflächenproteinen wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt. Sowohl unstimulierte Zellen als auch mit 100 ng/ml LPS stimulierte Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Adrenalin unter Standardbedingungen inkubiert und nach 6, 12 und 18 Stunden untersucht. Ausgewertet wurden nur die Zellen, die erstens die für neutrophile Granulozyten typischen Streulichteigenschaften besaßen, also im FSC/SSC an entsprechender Stelle zu finden waren, und die zweitens bezüglich des Oberflächenproteins CD66b positiv waren, deren Fluoreszenzintensität also über der unspezifischen Intensität lag. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde die Messgröße der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) verwendet. Die MFI ist ein Maß für die Dichte von fluoreszierenden Antikörpern auf der Zelle und reflektiert daher die Dichte des Oberflächenmoleküls, an welches der verwendete Antikörper spezifisch bindet.

3.1. Stimulation mit LPS

Die Stimulation mit einer hohen Dosis LPS (100 ng/ml) führte erwartungsgemäß zu einer veränderten Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle. In den Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass eine Erhöhung dieser Dosis keine weiteren Veränderungen bewirkt. Daher wurde standardmäßig mit 100 ng/ml stimuliert. Die Ergebnisse sind in den Diagrammen dargestellt als Quotient der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) aus den mit LPS inkubierten Zellen und den ebenso lang ohne Zusatz von LPS inkubierten Zellen.

3.1.1. Expression nach 6-stündiger Stimulation mit LPS

Abb. 14 zeigt die Expression von CD15 nach 6-stündiger Inkubation mit 100 ng/ml LPS bei einem repräsentativen Spender. Man erkennt, dass die MFI der mit LPS inkubierten Zellpopulation größer ist als die MFI der unstimulierten Kontrollzellen.

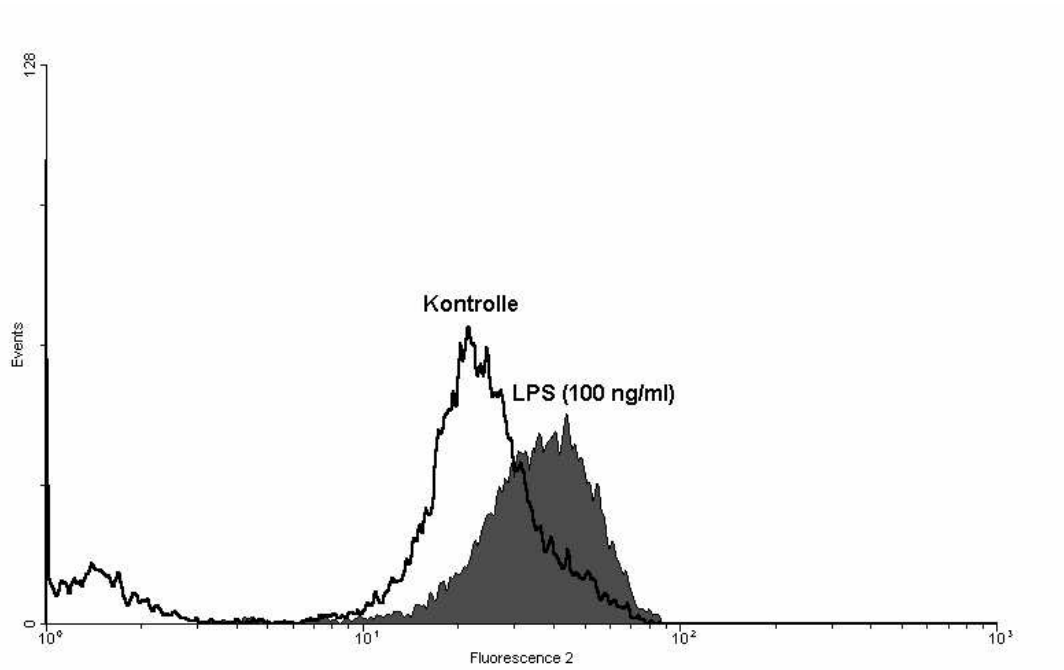


Abb. 14 zeigt die Expression von CD15 (Fluoreszenz 2) nach 6-stündiger Inkubation mit 100 ng/ml LPS (roter Graph) bei einem repräsentativen Spender. Die unstimulierten Kontrollen desselben Spenders (schwarzer Graph) weisen eine niedrigere MFI auf.

Die Expression von CD54 war nach 6-stündiger Inkubation mit LPS ebenfalls erhöht. Abb. 15 zeigt das Histogramm eines repräsentativen Spenders.

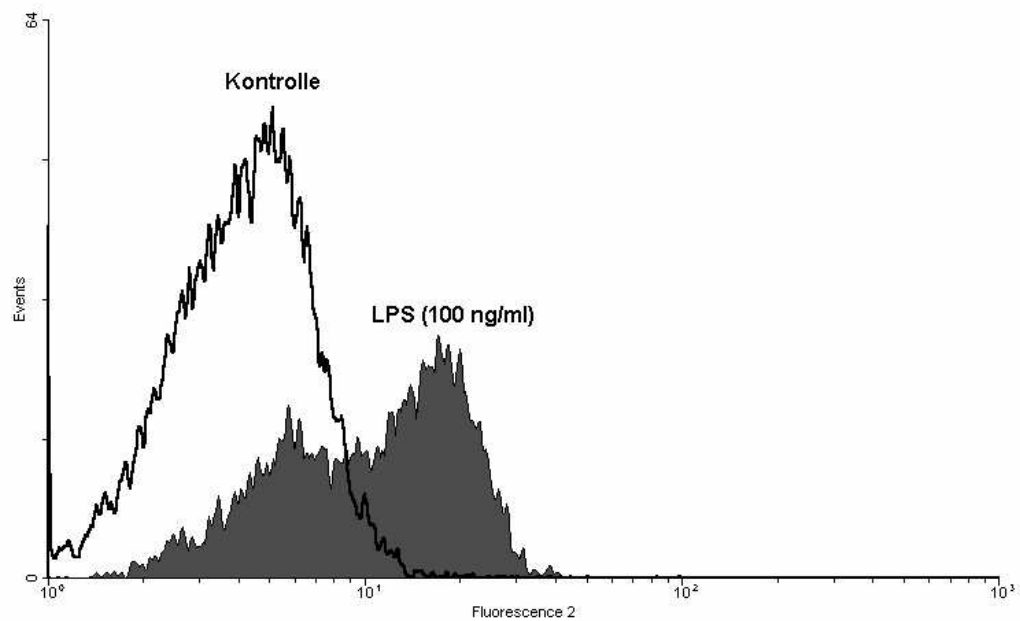


Abb. 15 zeigt die Expression von CD54 (Fluoreszenz 2) nach 6-stündiger Inkubation mit LPS (100 ng/ml) bei einem repräsentativen Spender. Die stimulierten Zellen (roter Graph) exprimieren mehr CD54 pro untersuchte Zelle als die Kontrollzellen (schwarzer Graph).

Zusammenfassend hat sich bei zehn Spendern nach 6-stündiger Inkubation neutrophiler Granulozyten mit 100 ng/ml LPS (siehe Abb. 16) die Expression von CD44 nur geringfügig und nicht signifikant verändert (90 % gegenüber den unstimulierten Zellen, $p = 0,14$), während die Expression von CD15 bereits auf ca. 130 % ($p < 0,05$) und die von CD54 (ICAM-1) sogar fast auf das Doppelte des Ausgangslevels gestiegen ist ($p < 0,005$).

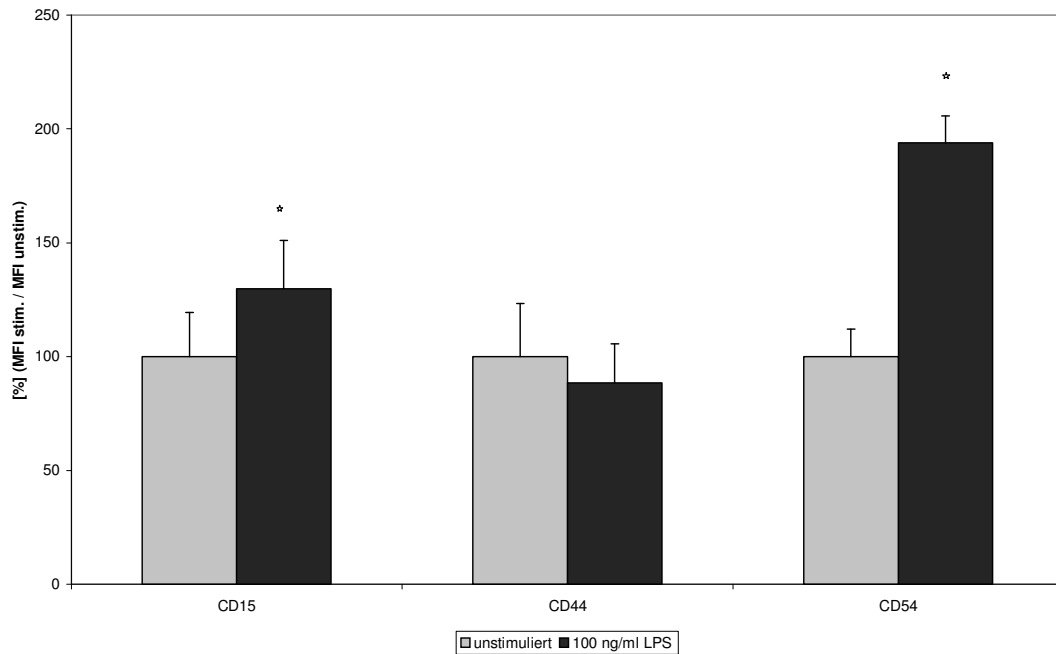


Abb. 16 zeigt die Expression von CD15, CD44 und CD54 nach 6-stündiger Inkubation mit und ohne Stimulus (100 ng/ml LPS) als Quotient aus stimulierten Zellen und unstimulierten Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler zehn gesunder Spender. Das Sternchen markiert einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ($p < 0,05$ mittels ANOVA). CD15 und CD54 sind signifikant erhöht ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,005$), während CD44 nicht signifikant verändert ist.

3.1.2. Expression nach 12-stündiger Inkubation mit LPS

Bezüglich CD15 zeigte sich nach 12-stündiger Inkubation, wie schon nach 6 Stunden, eine Hochregulation der Expression. Abb. 17 zeigt die Histogramme bei einem repräsentativen Spender.

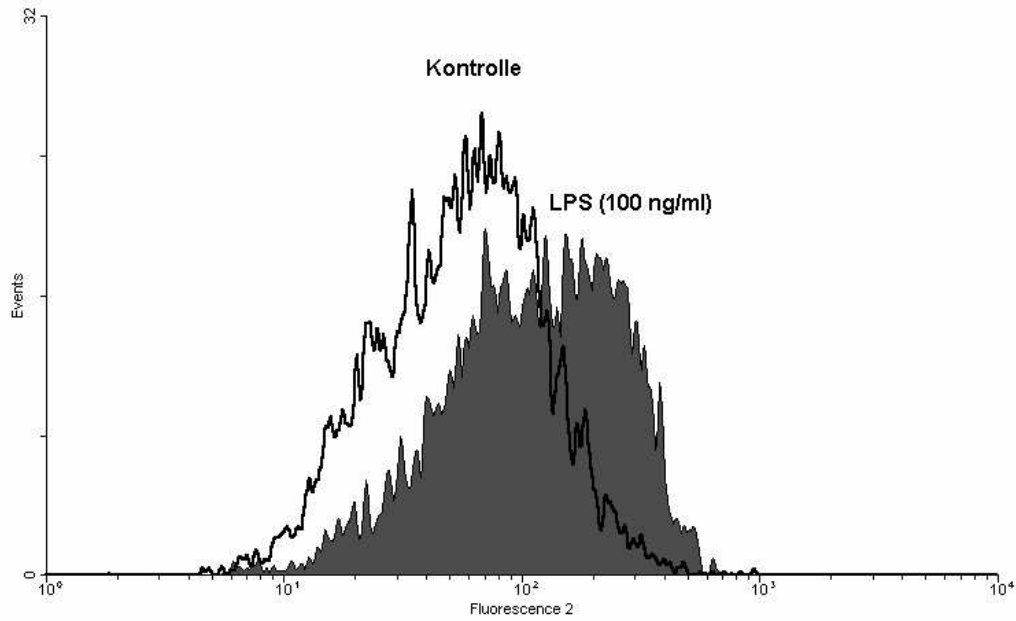


Abb. 17 zeigt an einem repräsentativen Spender die Hochregulation von CD15 (Fluoreszenz 2) nach 12-stündiger Inkubation mit LPS (100 ng/ml). Die Kontrollzellen (schwarzer Graph) haben eine niedrigere MFI als die stimulierten Zellen (roter Graph).

Für CD44 fand sich nach 12 Stunden auf den mit LPS (100 ng/ml) stimulierten Zellen erstmals eine erhöhte Expression des Oberflächenproteins. Man sieht in Abb. 18, dem Histogramm eines repräsentativen Spenders, dass der rote Graph (stimulierte Zellen) eine höhere MFI repräsentiert als der schwarze Graph (unstimulierte Kontrollzellen).

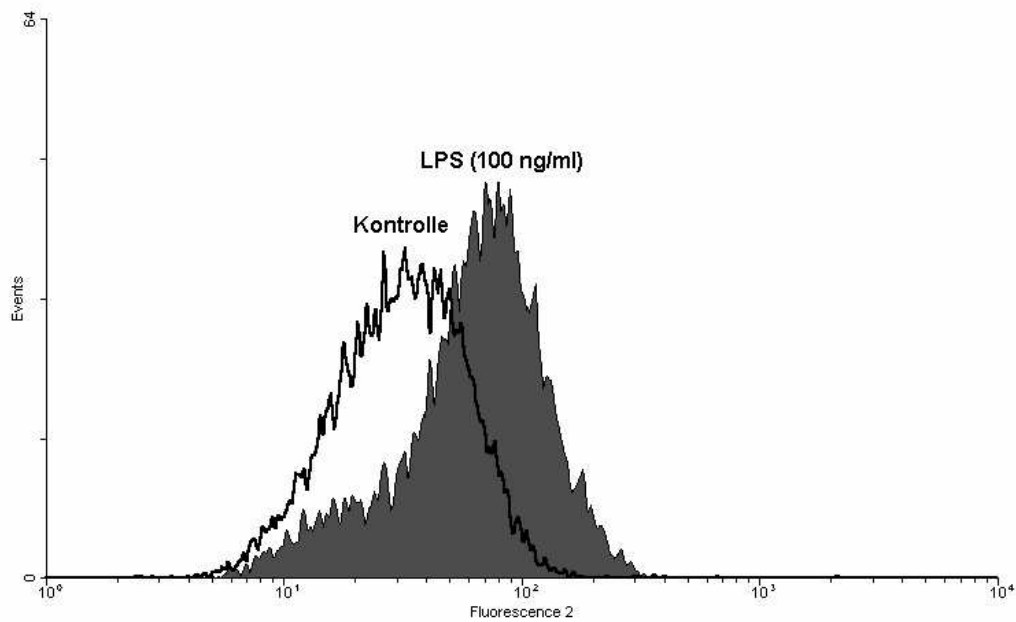


Abb. 18 zeigt bei einem repräsentativen Spender die Hochregulation von CD44 (Fluoreszenz 2) nach 12-stündiger Inkubation mit LPS (100 ng/ml). Die Kontrollzellen (schwarzer Graph) haben eine niedrigere MFI als die stimulierten Zellen (roter Graph).

Die Expression von CD54 ist, wie schon nach 6 Stunden, auch nach 12-stündiger Inkubation mit LPS signifikant erhöht ($p < 0,005$; Abb. 19).

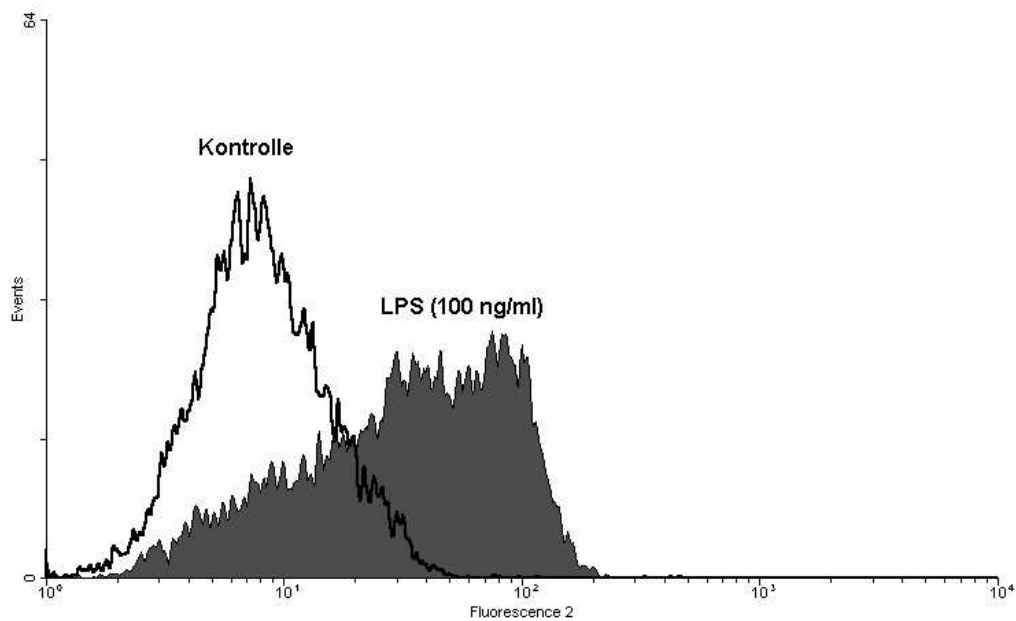


Abb. 19 zeigt für einen repräsentativen Spender, dass die Expression von CD54 (Fluoreszenz 2) nach 12-stündiger Inkubation mit LPS (roter Graph) gegenüber den ebenso lang inkubierten Kontrollen (schwarzer Graph) deutlich erhöht ist.

Fasst man die Ergebnisse der zehn untersuchten Spender zusammen, so kann man Folgendes feststellen: Nach 12-stündiger Inkubation (siehe Abb. 20) lag die Expression von CD15 bei fast 150 % der unstimulierten Kontrolle ($p < 0,005$), die von CD44 bei etwa 120 % der unstimulierten Kontrolle ($p < 0,05$). Die Expression von CD54 ist durch die Stimulation auf mehr als 300 % des Wertes der unstimulierten, 12-stündig inkubierten Kontrolle gestiegen ($p < 0,005$).

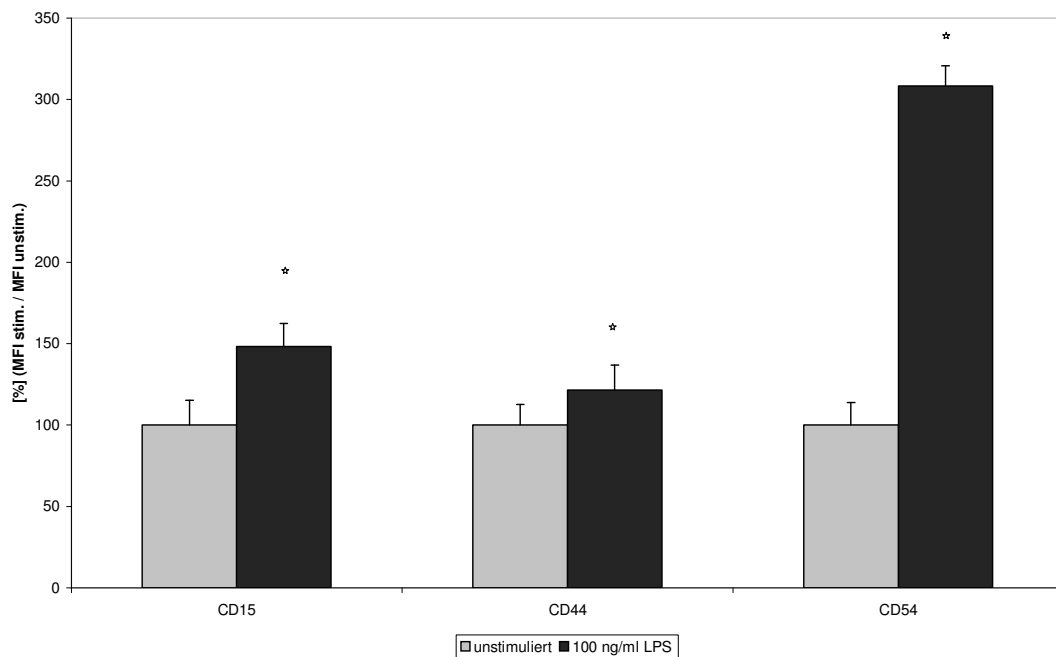


Abb. 20 zeigt die Expression von CD15, CD44 und CD54 nach 12-stündiger Inkubation mit und ohne Stimulus (100 ng/ml LPS) als Quotient aus stimulierten Zellen und den unstimulierten Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler zehn gesunder Spender. Das Sternchen markiert einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ($p < 0,05$ mittels ANOVA). CD15, CD44 und CD54 sind nach Inkubation mit LPS signifikant erhöht.

3.1.3. Expression nach 18-stündiger Inkubation mit LPS

Wie schon nach 6 und nach 12 Stunden war die Expression von CD15 auch nach 18 Stunden signifikant erhöht. Abb. 21 zeigt das Histogramm eines repräsentativen Spenders.

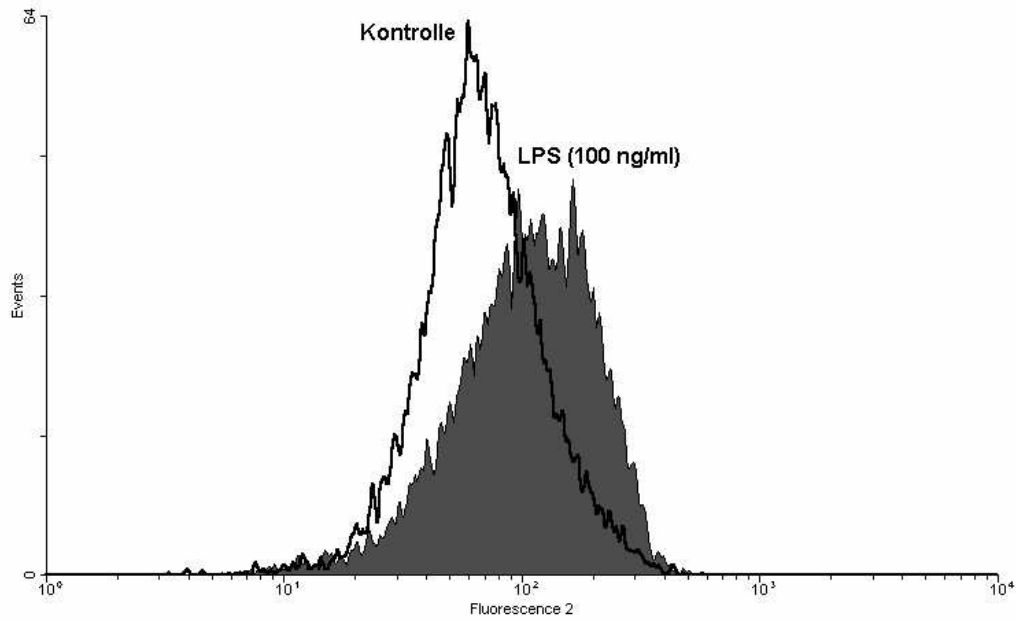


Abb. 21 zeigt, dass die Expression von CD15 (Fluoreszenz 2) auf stimulierten Zellen nach 18-stündiger Inkubation mit LPS (roter Graph) höher ist als auf den unstimulierten Zellen (schwarzer Graph).

Auch bezüglich der Expression von CD44 finden sich nach 18 Stunden ähnliche Ergebnisse wie nach 12 Stunden. Die mit LPS (100 ng/ml) inkubierten Zellen weisen eine signifikant höhere Expression von CD44 auf als unstimulierte, ebenso lang inkubierte Kontrollzellen desselben Spenders (siehe Abb. 22).

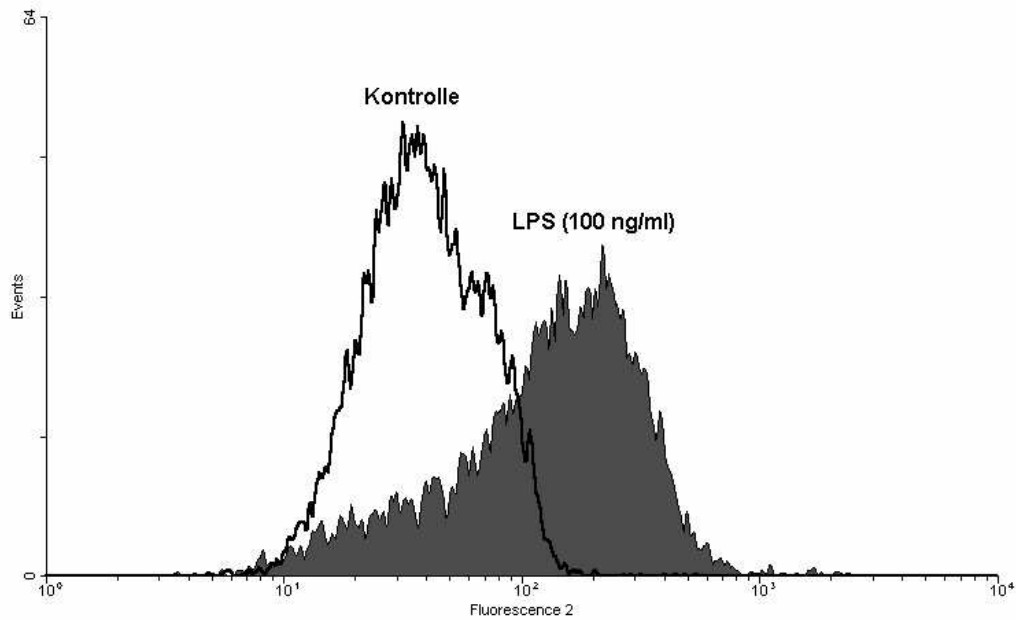


Abb. 22 zeigt, dass die Expression von CD44 (Fluoreszenz 2) nach 18-stündiger Inkubation mit LPS (roter Graph) gegenüber den Kontrollzellen (schwarzer Graph) gestiegen ist.

CD54 wird nach 18-stündiger Inkubation auf mit LPS stimulierten Zellen deutlich stärker exprimiert als auf unstimulierten Kontrollzellen. Dieses Ergebnis fand sich sowohl nach 6 und 12 als auch nach 18 Stunden (siehe Abb. 23)

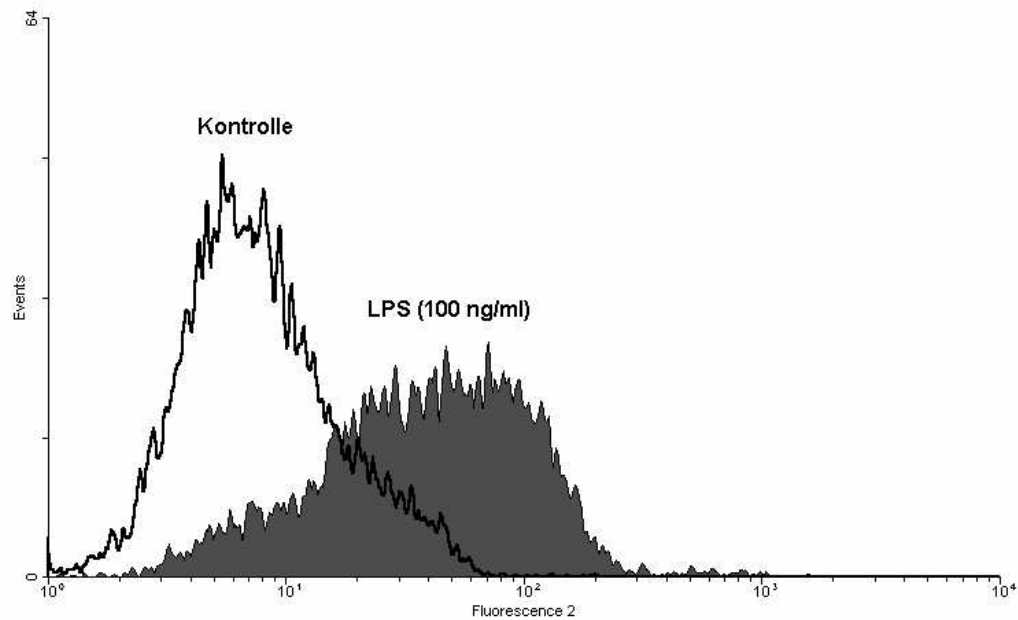


Abb. 23 zeigt an einem repräsentativen Spender, dass die Expression von CD54 (Fluoreszenz 2) nach 18-stündiger Inkubation mit LPS (rot) gegenüber den Kontrollzellen (schwarz) deutlich erhöht ist.

Fasst man die Ergebnisse der zehn untersuchten Spender zusammen, findet man, dass die Expression aller untersuchten Adhäsionsmoleküle nach 18-stündiger Inkubation mit 100 ng/ml LPS deutlich über dem Niveau der unstimulierten Zellen lag (siehe Abb. 24). Während die Level der Expression von CD15 und CD44 aber noch im Bereich zwischen 100 % und 200 % lagen (155 % bzw. 184 %), stieg die Expression von CD54 auf über das Vierfache (430 %) des unstimulierten Wertes ($p < 0,005$).

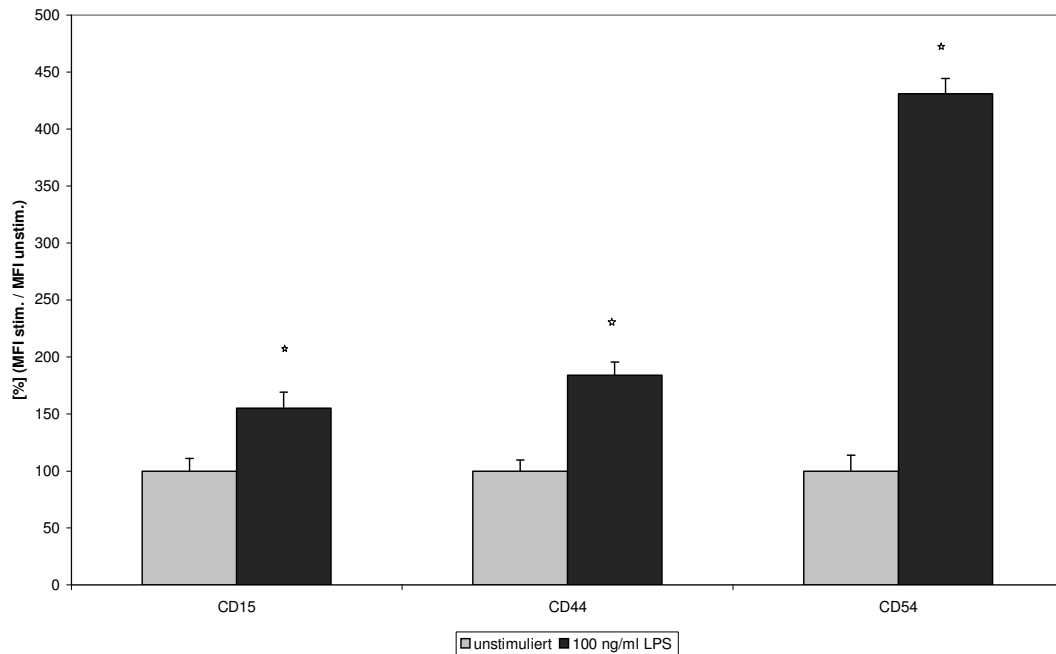


Abb. 24 zeigt die Expression von CD15, CD44 und CD54 nach 18-stündiger Inkubation mit und ohne Stimulus (100 ng/ml LPS) als Quotient aus stimulierten Zellen und den unstimulierten Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler zehn gesunder Spender. Das Sternchen markiert einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ($p < 0,05$ mittels ANOVA). Alle drei untersuchten Oberflächenproteine sind nach 18-stündiger Inkubation gegenüber den Kontrollen verstärkt exprimiert.

3.2. Stimulation unstimulierter Zellen mit Adrenalin

Während sich durch Zugabe von LPS die Expression der Adhäsionsmoleküle auf neutrophilen Granulozyten deutlich verändern ließ, konnten nach Zugabe von Adrenalin nur geringfügige Veränderungen festgestellt werden. Die Werte sind als Verhältnis der MFI von mit Adrenalin stimulierten Zellen zur MFI von unstimulierten, aber ebenso lang inkubierten Kontrollen aufgetragen.

3.2.1. 6-stündige Inkubation unstimulierter Zellen mit Adrenalin

Die Analyse der untersuchten Adhäsionsmoleküle nach 6-stündiger Inkubation unstimulierter (ohne LPS) neutrophiler Granulozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Adrenalin (Abb. 25) zeigte für die untersuchten zehn Spender keine signifikanten Veränderungen ($p > 0,05$). Die erhobenen Werte lagen alle im Bereich zwischen 90 % und 110 % des Ausgangswertes und blieben damit weitgehend konstant.

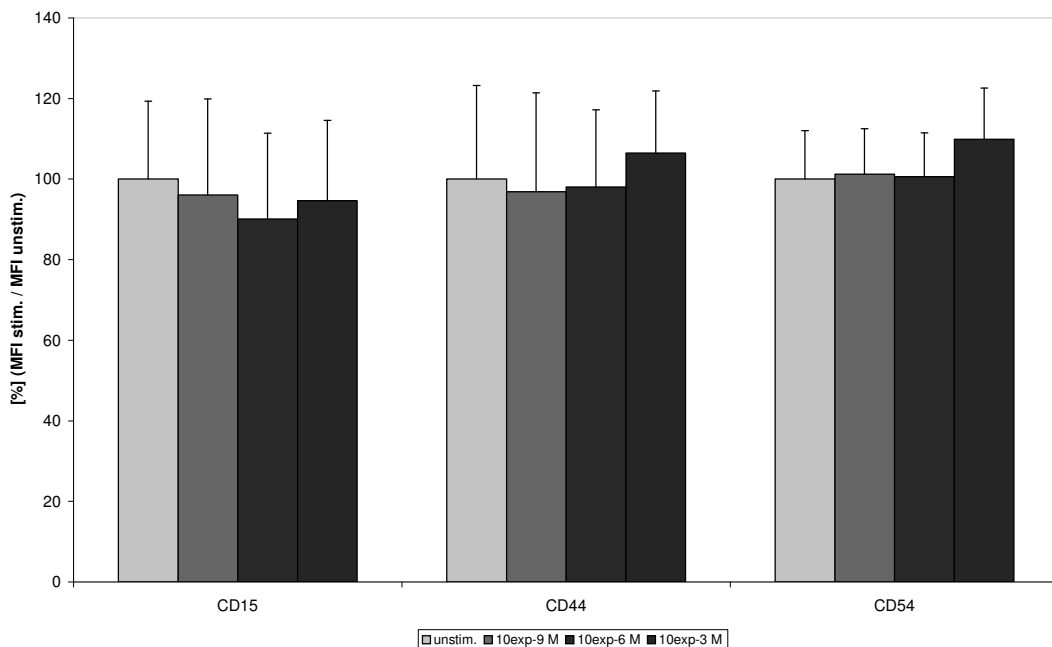


Abb. 25 zeigt die Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle nach 6-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Adrenalin. Die Werte stellen das Verhältnis der MFI von stimulierten zur MFI unstimulierten Zellen dar. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardfehler zehn gesunder Spender. Die statistische Untersuchung mittels ANOVA ergab keine signifikanten Ergebnisse ($p > 0,05$).

3.2.2. 12-stündige Inkubation unstimulierter Zellen mit Adrenalin

Nach 12-stündiger Inkubation von unstimulierten Zellen mit Adrenalin in unterschiedlichen Konzentrationen ließ sich eine verstärkte Expression von CD44 feststellen. Abb. 26 zeigt die Veränderung in der MFI bei einem repräsentativen Spender.

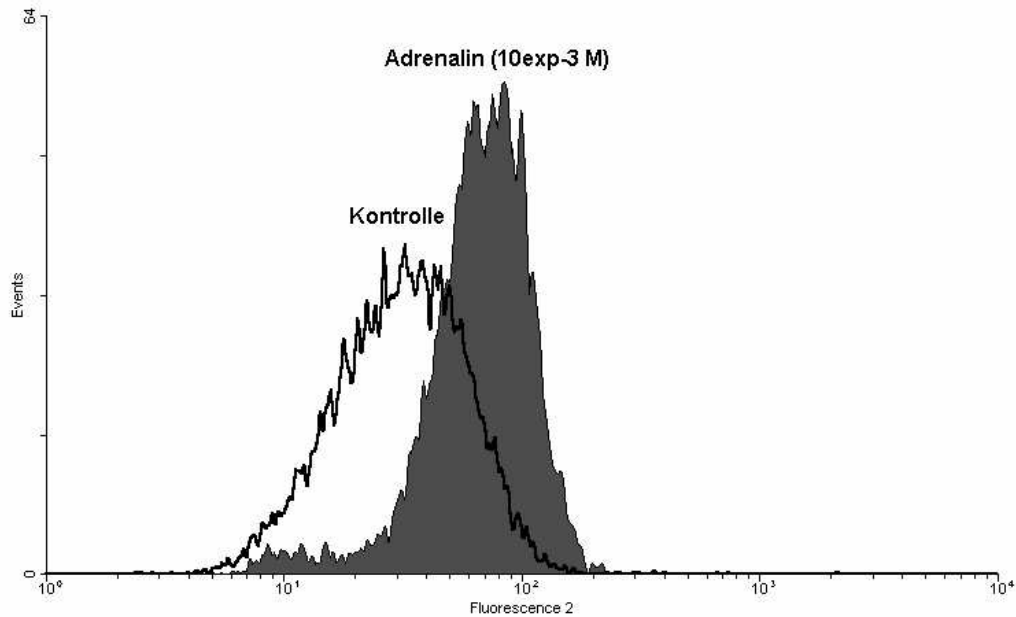


Abb. 26 zeigt an einem repräsentativen Spender, dass die Expression von CD44 (Fluoreszenz 2) nach 12-stündiger Inkubation unter dem Einfluss von Adrenalin in hoher Konzentration (10^{-3} M; roter Graph) gegenüber den Kontrollzellen (schwarzer Graph) gestiegen ist.

Auch die Expression von CD54 war nach 12-stündiger Inkubation mit Adrenalin in hoher Konzentration (10^{-3} M) signifikant erhöht. Abb. 27 zeigt das Histogramm eines repräsentativen Spenders.

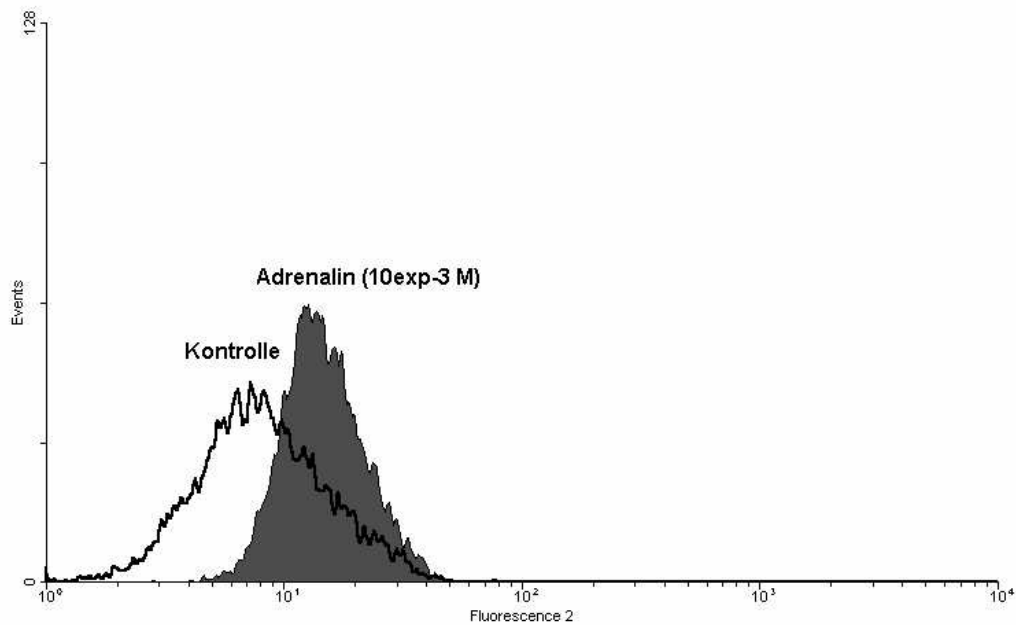


Abb. 27 stellt an einem repräsentativen Spender die nach 12-stündiger Inkubation mit Adrenalin in hoher Dosis (10^{-3} M) aufgetretene verstärkte Expression von CD54 (Fluoreszenz 2) dar. Man erkennt, dass die mit Adrenalin inkubierten Zellen (roter Graph) eine höhere MFI besitzen als die Kontrollen (schwarzer Graph).

Fasst man alle zehn untersuchten Spender zusammen, so stellt man fest, dass nach 12-stündiger Inkubation kein deutlicher Effekt durch die Zugabe von Adrenalin zu sehen war (siehe Abb. 28). Lediglich extrem hohe Konzentrationen von Adrenalin (10^{-3} M) führten zu einer Steigerung der Expression von CD44 und CD54 ($p < 0,05$). Niedrigere Konzentrationen von Adrenalin hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von CD44 und CD54 ($p > 0,05$). Die Expression von CD15 ließ sich durch Adrenalin ebenfalls nicht beeinflussen (Werte zwischen 87 % und 103 %; $p > 0,05$).

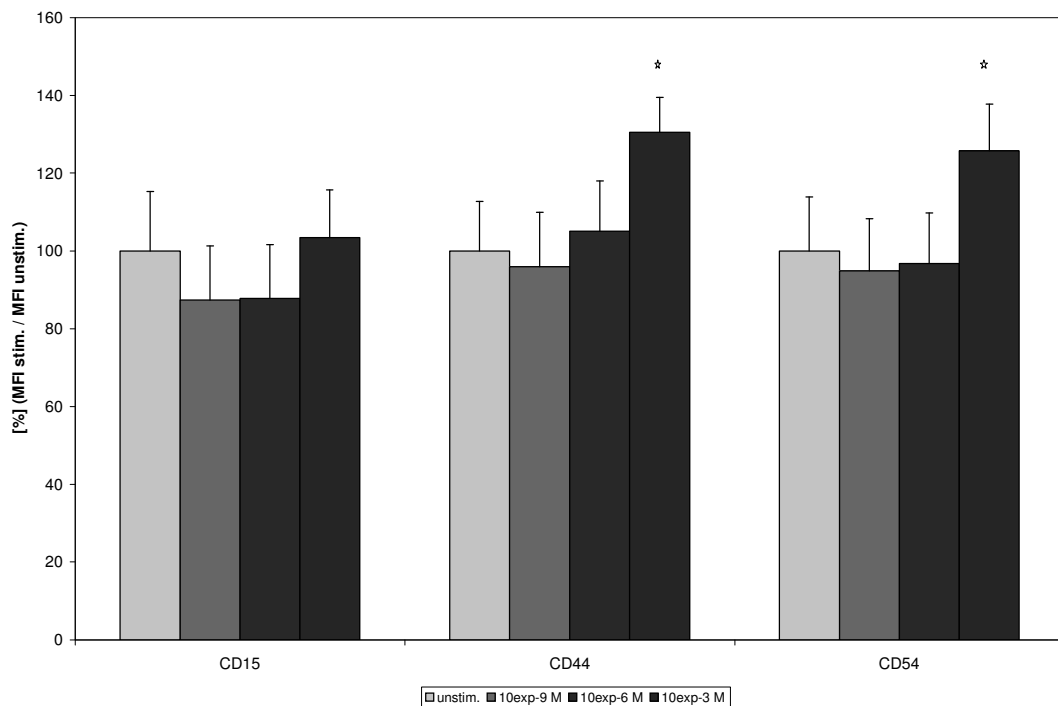


Abb. 28 zeigt die Expression der untersuchten Oberflächenproteine nach 12-stündiger Inkubation mit Adrenalin in unterschiedlicher Konzentration. Die Werte sind als Verhältnis der MFI von mit Adrenalin stimulierten Zellen zur MFI von unstimulierten Kontrollen, welche ebenfalls für 12 Stunden inkubiert wurden, aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte und relativen Standardfehler zehn gesunder Spender. Das Sternchen markiert einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ($p < 0,05$ mittels ANOVA). Adrenalin (10^{-3} M) bewirkt eine erhöhte Expression von CD44 und CD54.

3.2.3. 18-stündige Inkubation unstimulierter Zellen mit Adrenalin

Nach 18-stündiger Inkubation der PMN mit Adrenalin in unterschiedlicher Konzentration fand sich, wie schon nach 12 Stunden, eine verstärkte Expression von CD44 auf den mit Adrenalin in hoher Konzentration (10^{-3} M) inkubierten Zellen. Abb. 29 zeigt das Histogramm eines repräsentativen Spenders.

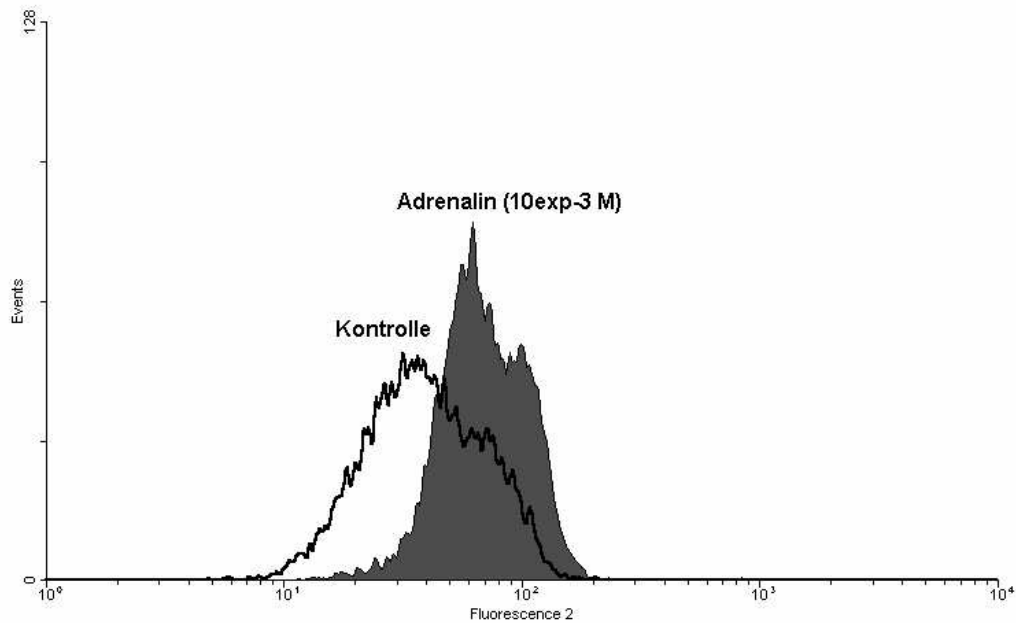


Abb. 29 zeigt am Histogramm eines repräsentativen Spenders, dass mit Adrenalin in hoher Dosierung (10^{-3} M) für 18 Stunden inkubierte Neutrophile (roter Graph) eine stärkere Expression von CD 44 (Fluoreszenz 2) aufweisen als ebenso lang inkubierte Kontrollen (schwarzer Graph).

Wie nach 12 Stunden war auch nach 18-stündiger Inkubation der Neutrophilen die Expression von CD54 in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Adrenalin (10^{-3} M) gegenüber den Kontrollen erhöht (Abb. 30).

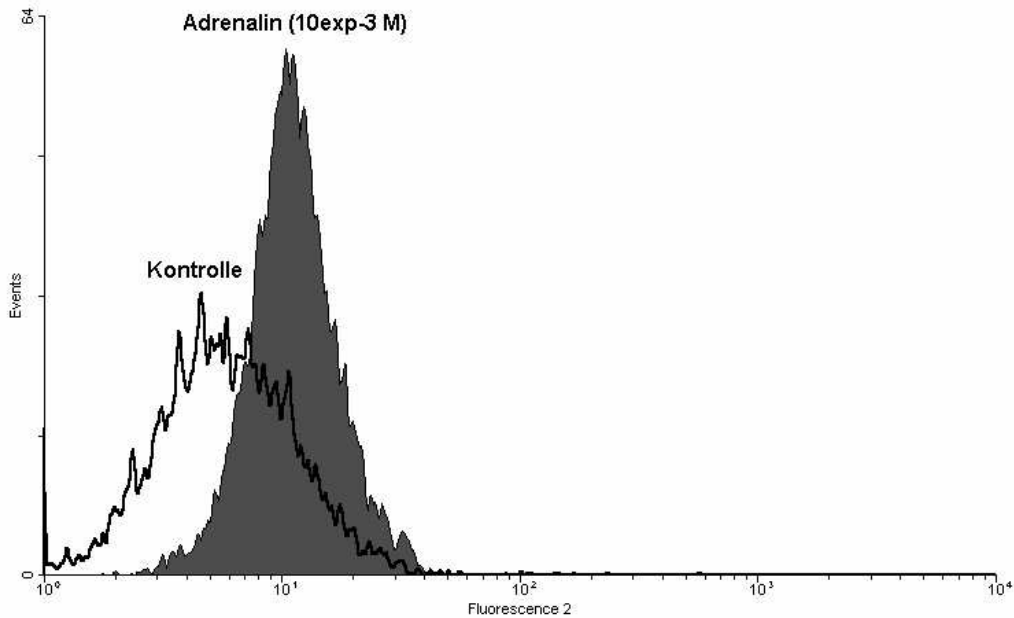


Abb. 30 zeigt das Histogramm eines repräsentativen Spenders. Nach 18-stündiger Inkubation mit Adrenalin in hoher Konzentration (10^{-3} M) weisen die Zellen (roter Graph) eine höhere Expression von CD54 (Fluoreszenz 2) auf als die Kontrollen (schwarzer Graph).

Fasst man alle untersuchten Spender zusammen, so findet man nach 18-stündiger Inkubation mit Adrenalin eine schwach ausgeprägte Dosisabhängigkeit der Expression von CD15, CD44 und CD54 (siehe Abb. 31). Mit $p > 0,05$ waren die Veränderungen bezüglich CD15 aber allesamt nicht signifikant. Die Expression von CD44 und von CD54 veränderte sich nur durch die Höchstdosis Adrenalin (10^{-3} M) signifikant ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,005$), und zwar auf 131 % bzw. 161 % der unstimulierten Kontrollzellen.

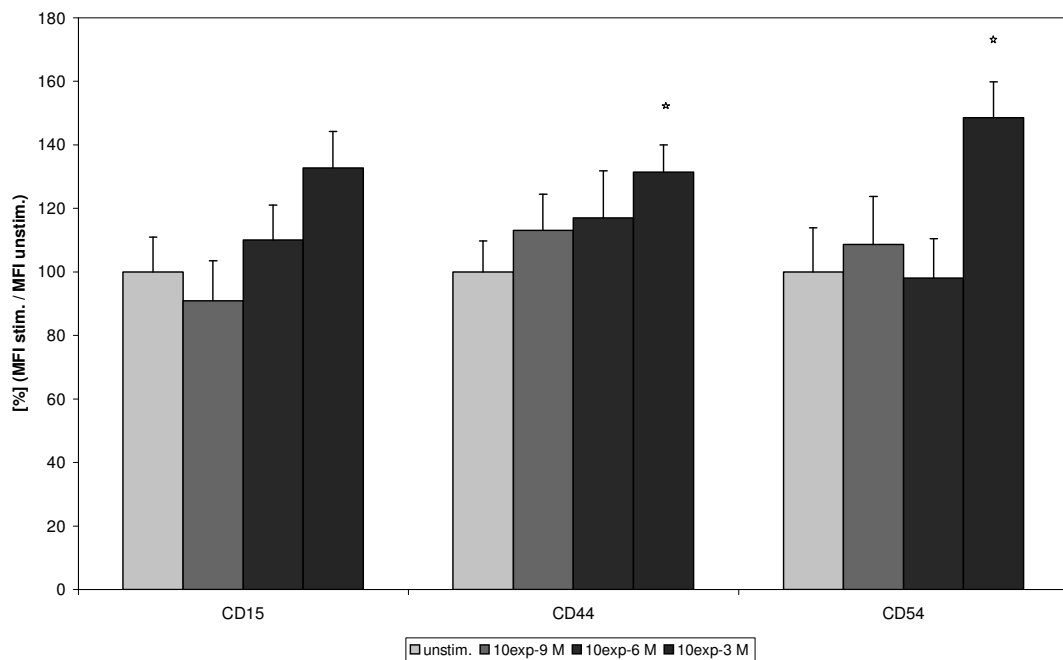


Abb. 31 zeigt die Expression von CD15, CD44 und CD54 auf nicht vorstimulierten, mit Adrenalin inkubierten neutrophilen Granulozyten nach 18-stündiger Inkubation. Die Werte zeigen das Verhältnis der MFI von stimulierten Zellen zu unstimulierten Zellen. Das Sternchen markiert einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ($p < 0,05$ mittels ANOVA). Die Expression von CD44 und CD54 wurde durch Adrenalin in hoher Dosierung (10^{-3} M) signifikant verstärkt ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,005$).

3.3. Stimulation vorstimulierter Zellen mit Adrenalin

Um dem pathophysiologischen Bild der Inflammation näher zu kommen, wurde in dieser Serie von Experimenten untersucht, ob Adrenalin auf mit LPS (100 ng/ml) vorstimulierte Zellen einen Einfluss hat. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis der MFI aus den mit Adrenalin inkubierten Zellen und den ohne Adrenalin inkubierten Kontrollzellen, welche aber (wie die mit Adrenalin inkubierten Zellen) durch LPS stimuliert wurden. In diesen Experimenten wurden also alle Gruppen mit LPS inkubiert und einige zusätzlich mit Adrenalin.

3.3.1. 6-stündige Inkubation vorstimulierter Zellen mit Adrenalin

Nach 6-stündiger Inkubation von vorstimulierten neutrophilen Granulozyten (100 ng/ml LPS) mit Adrenalin in unterschiedlichen Konzentrationen fand sich eine verminderte Expression von CD54 nach Inkubation in Anwesenheit von Adrenalin in hoher Dosierung (10^{-3} M). Abb. 32 zeigt das Histogramm eines repräsentativen Spenders.

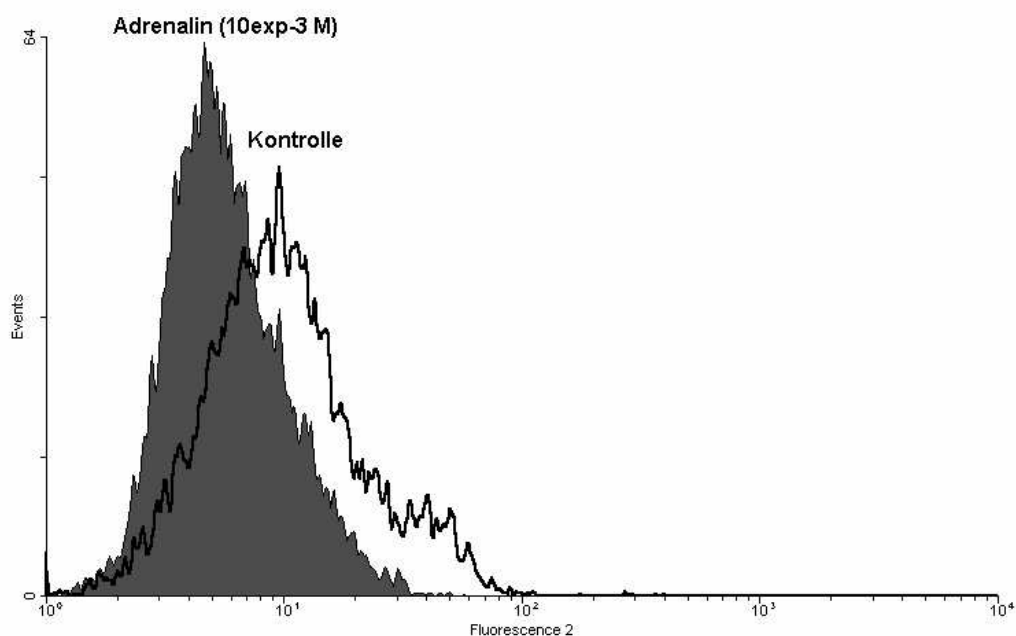


Abb. 32 zeigt das Histogramm eines repräsentativen Spenders nach 6-stündiger Inkubation von vorstimulierten Zellen (100 ng/ml LPS) mit Adrenalin in Höchstdosis (10^{-3} M). Die mit Adrenalin inkubierten Zellen (roter Graph) weisen eine niedrigere Expression von CD54 (Fluoreszenz 2) auf als ebenfalls vorstimulierte Zellen, welche in Abwesenheit von Adrenalin inkubiert wurden (schwarzer Graph).

Die 6-stündige Inkubation LPS-stimulierter (100 ng/ml) neutrophiler Granulozyten (n = 10) mit Adrenalin (siehe Abb. 33) brachte als einziges signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$) die Abregulation der Expression von CD54 in Anwesenheit von Adrenalin (10^{-3} M) auf durchschnittlich 74 % des Ausgangswertes. Die im Diagramm erkennbare Hochregulation von CD44 durch Adrenalin war mit $p > 0,05$ nicht signifikant.

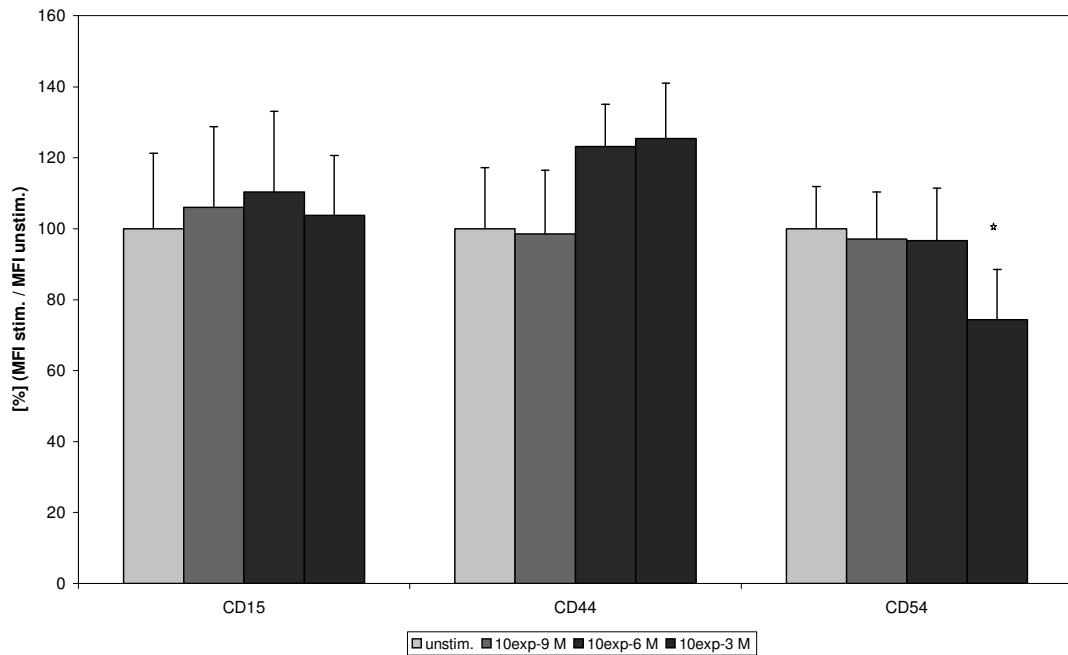


Abb. 33 zeigt für zehn Spender die Effekte von Adrenalin in unterschiedlicher Konzentration nach 6-stündiger Inkubation bezüglich der Expression von CD15, CD44 und CD54 auf mit LPS (100 ng/ml) vorstimulierten neutrophilen Granulozyten. Die Werte zeigen das Verhältnis aus mit Adrenalin inkubierten Zellen und ohne Adrenalin, aber ebenso lang inkubierten Kontrollen. Das Sternchen markiert einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ($p < 0,05$ mittels ANOVA). Man erkennt, dass nur die Expression von CD54 auf den Zellen, die mit Adrenalin in sehr hoher Konzentration (10^{-3} M) inkubiert wurden, signifikant vermindert ist ($p < 0,05$).

3.3.2. 12-stündige Inkubation vorstimulierter Zellen mit Adrenalin

Nach 12-stündiger Inkubation von vorstimulierten neutrophilen Granulozyten (100 ng/ml LPS) war die Expression von CD44 auf den Zellen, welche mit Adrenalin in hoher Dosierung (10^{-3} M) inkubiert worden waren, erhöht. Abb. 34 zeigt das Histogramm eines repräsentativen Spenders.

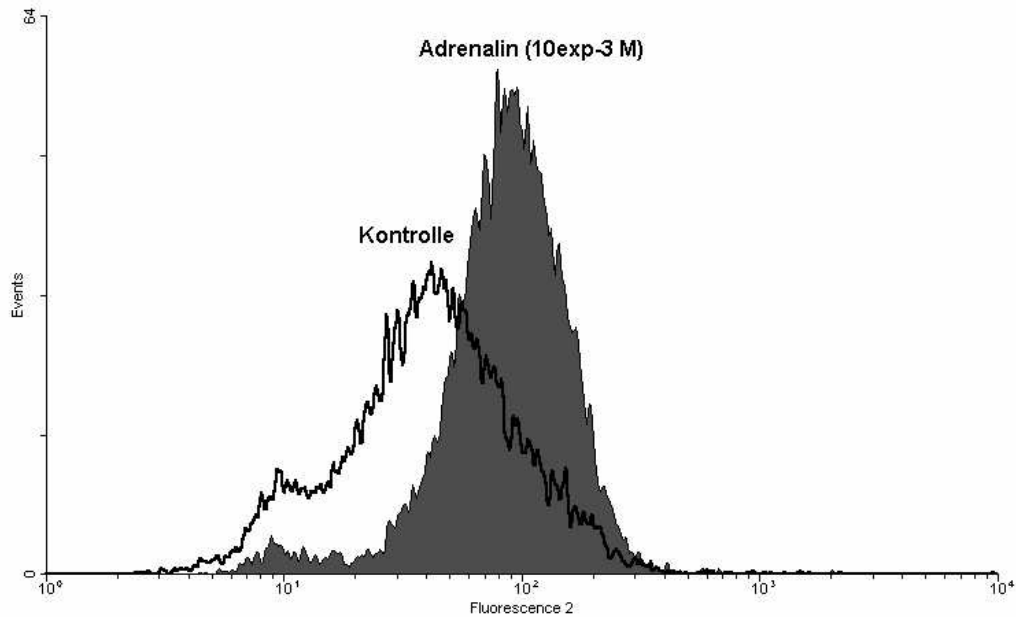


Abb. 34 zeigt das Histogramm eines repräsentativen Spenders nach Inkubation vorstimulierter neutrophiler Granulozyten (100 ng/ml LPS) mit Adrenalin (10^{-3} M) für 12 Stunden. Die mit Adrenalin inkubierten Zellen (roter Graph) weisen eine höhere Expression von CD44 (Fluoreszenz 2) auf als vorstimulierte, ohne Adrenalin inkubierte Zellen (schwarzer Graph).

Fasst man die zehn untersuchten Spender zusammen, so kann man feststellen: Auch die 12-stündige Inkubation vorstimulierter neutrophiler Granulozyten mit Adrenalin (siehe Abb. 35) brachte bezüglich der Expression von CD15 kein signifikantes Ergebnis hervor. Die Expression von CD44 wurde durch eine 10^{-3} M Konzentration von Adrenalin in den Kulturen auf 138 % des Wertes der unstimulierten Kontrollzellen hochreguliert ($p < 0,05$). Der Level der Expression von CD54 hingegen sank auf durchschnittlich 80 % des Kontrollwertes. Er lag damit im gleichen Bereich wie nach 6-stündiger Inkubation mit derselben Dosis von Adrenalin (74 %). Im Gegensatz zur verminderten Expression nach 6 Stunden war dieses Ergebnis aber nicht mehr signifikant ($p > 0,05$).

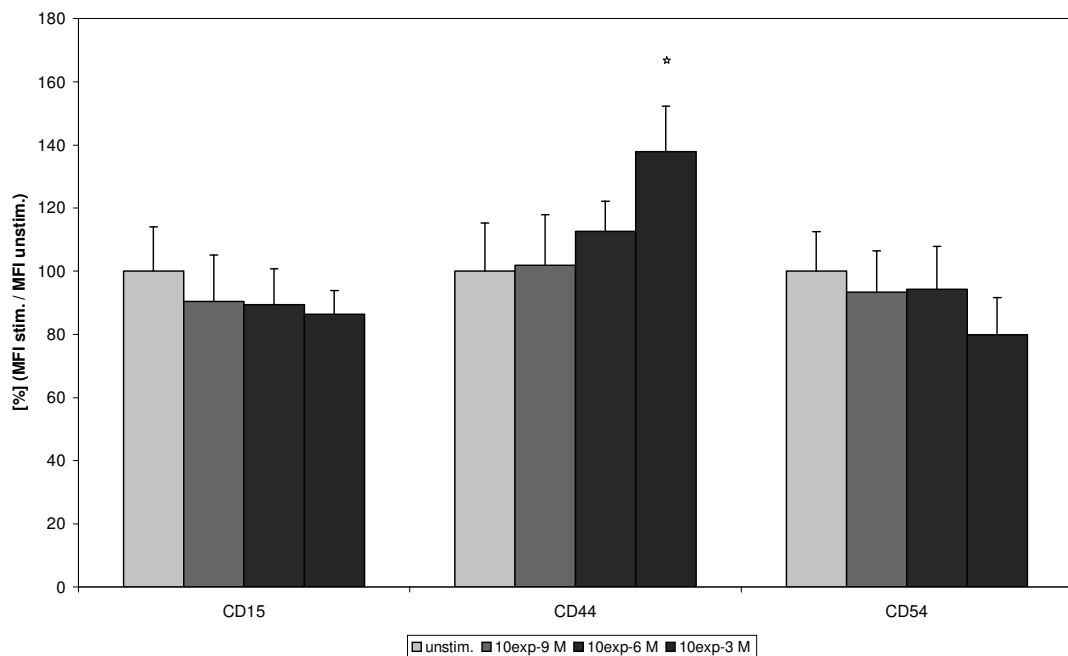


Abb. 35 zeigt das Ergebnis nach 12-stündigen Inkubation von vorstimulierten neutrophilen Granulozyten mit Adrenalin in unterschiedlicher Konzentration ($n = 10$). Dargestellt ist jeweils das Verhältnis der MFI aus den mit Adrenalin inkubierten Zellen und ohne Adrenalin inkubierten Kontrollzellen. Das Sternchen markiert einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ($p < 0,05$ mittels ANOVA). Nur die verstärkte Expression von CD44 auf mit Adrenalin in hoher Konzentration (10^{-3} M) inkubierten Zellen erwies sich statistisch als signifikant.

3.3.3. 18-stündige Inkubation vorstimulierter Zellen mit Adrenalin

Nach 18-stündiger Inkubation vorstimulierter neutrophiler Granulozyten mit Adrenalin fanden sich in der statistischen Auswertung der MFI von zehn gesunden Spendern keine signifikanten Ergebnisse mehr (Abb. 36). Die Expression von CD15 und CD54 war erneut gegenüber den Kontrollen nicht signifikant verändert. CD44 ließ sich durch eine 10^{-3} M Konzentration von Adrenalin wie schon nach 12 Stunden hochregulieren, jedoch war auch dieses Ergebnis mit $p > 0,05$ nicht mehr signifikant.

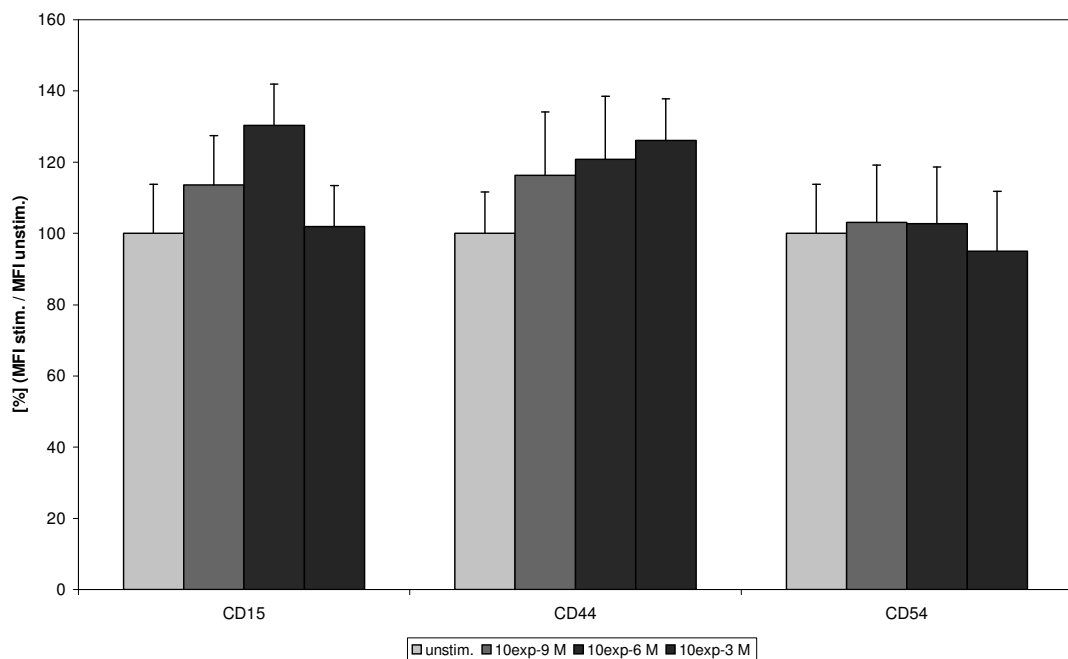


Abb. 36 zeigt die Expression der Oberflächenproteine CD15, CD44 und CD54 nach 18-stündiger Inkubation vorstimulierter Zellen in Anwesenheit von Adrenalin. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die relativen Standardfehler zehn gesunder Spender. Die MFI der mit Adrenalin inkubierten Zellen sind zu den MFI der ohne Adrenalin inkubierten Kontrollen ins Verhältnis gesetzt worden. Die statistische Auswertung mittels Varianzanalyse (ANOVA) ergab kein signifikantes Ergebnis.

4. Kinetik der Expression von Oberflächenproteinen

Neutrophile Granulozyten wurden für 6, 12 und 18 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die Mittelwerte und relativen Standardfehler von zehn gesunden Spendern wurden als zeitlicher Verlauf dargestellt und sind stets mit dem Kontrollwert vor Beginn der Inkubation verglichen worden. Dargestellt ist daher jeweils der Quotient aus dem gemessenen Wert und dem vor Beginn der Inkubation gemessenen Kontrollwert.

4.1. Stimulation mit LPS

Die schon beobachtete gesteigerte Expression der Oberflächenproteine auf LPS-stimulierten Zellen gegenüber unstimulierten Zellen ließ sich im zeitlichen Verlauf besonders gut zeigen. Auf unstimulierten Zellen fiel der Expressionslevel der drei untersuchten Adhäsionsmoleküle, während er auf den Zellen, die mit LPS stimuliert worden waren, langsamer oder gar nicht fiel.

4.1.1. Expression von CD15 im zeitlichen Verlauf nach LPS-Stimulation

Sowohl unstimulierte als auch stimulierte (100 ng/ml LPS) Zellen exprimierten nach 6-stündiger Inkubation CD15 in wesentlich geringerem Maße als vor Beginn der Inkubation (Abb. 37). Während der Level der Expression auf unstimulierten Zellen aber bis auf 55 % abfiel, sank er bei LPS-stimulierten Zellen nur auf 70 % des Ausgangswertes. Anschließend stieg die CD15-Expression beider Zellpopulationen wieder an; sie schien sich bei den stimulierten Zellen auf einem Wert nahe dem Ausgangswert zu stabilisieren (113 % nach 12 Stunden und 105 % nach 18 Stunden) und bei den unstimulierten Zellen auf einem Wert um 70 % (76 % nach 12 Stunden; 68 % nach 18 Stunden).

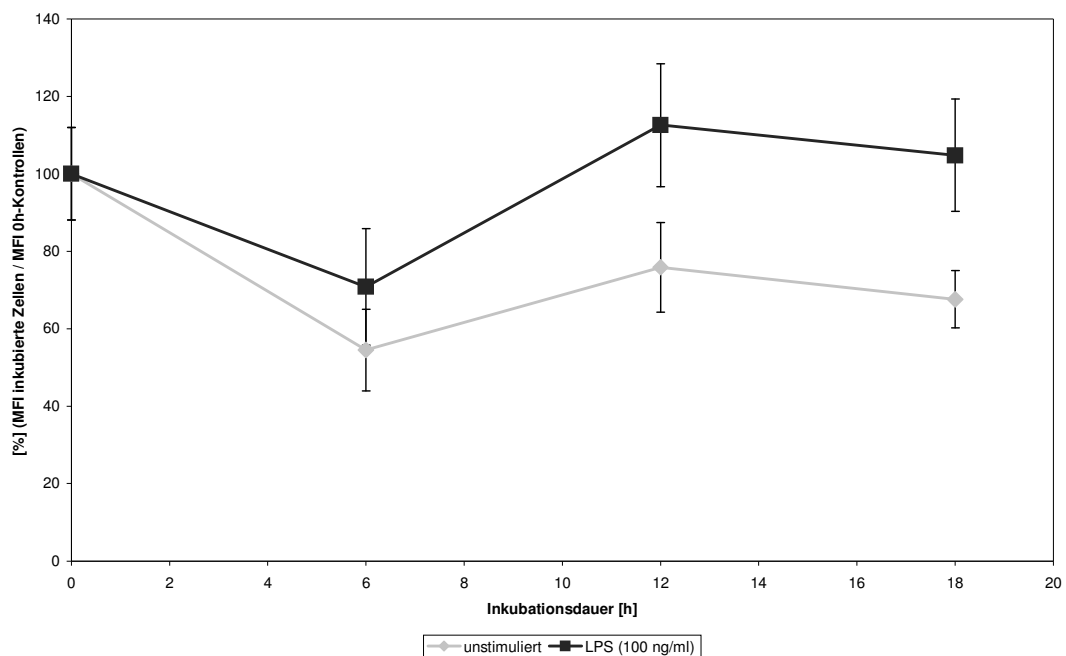


Abb. 37 zeigt den zeitlichen Verlauf der Expression von CD15 auf stimulierten (100 ng/ml LPS) und unstimulierten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und relativen Standardfehler der gemessenen MFI von zehn gesunden Spendern. Abgebildet ist der Quotient aus den gemessenen Mittelwerten und dem Ausgangswert (0 Stunden, 100 %).

4.1.2. Expression von CD44 im zeitlichen Verlauf nach LPS-Stimulation

Auch die Expression von CD44 fiel nach 6-stündiger Inkubation deutlich ab. Sowohl stimulierte als auch unstimulierte Zellen exprimierten weniger als die Hälfte des vor Beginn der Inkubation auf der Zelloberfläche befindlichen CD44 (Abb. 38). Im Anschluss differierten die Verläufe von stimulierten und unstimulierten Zellen. Die Expression auf unstimulierten Zellen fiel von 48 % nach 6 Stunden auf 43 % nach 12 Stunden. Nach 18 Stunden waren auf unstimulierten Zellen nur noch durchschnittlich 36 % des ursprünglichen Levels exprimiert. Stimulierte Zellen zeigten nach dem in den ersten 6 Stunden stattfindenden deutlichen Abfall der Konzentration von CD44 auf der Zelloberfläche die Tendenz, wieder auf einen höheren Level zurückzukehren. Von 42 % (6 Stunden) stieg das Verhältnis zu nicht inkubierten Kontrollzellen über 52 % (12 Stunden) auf 65 % nach 18 Stunden.

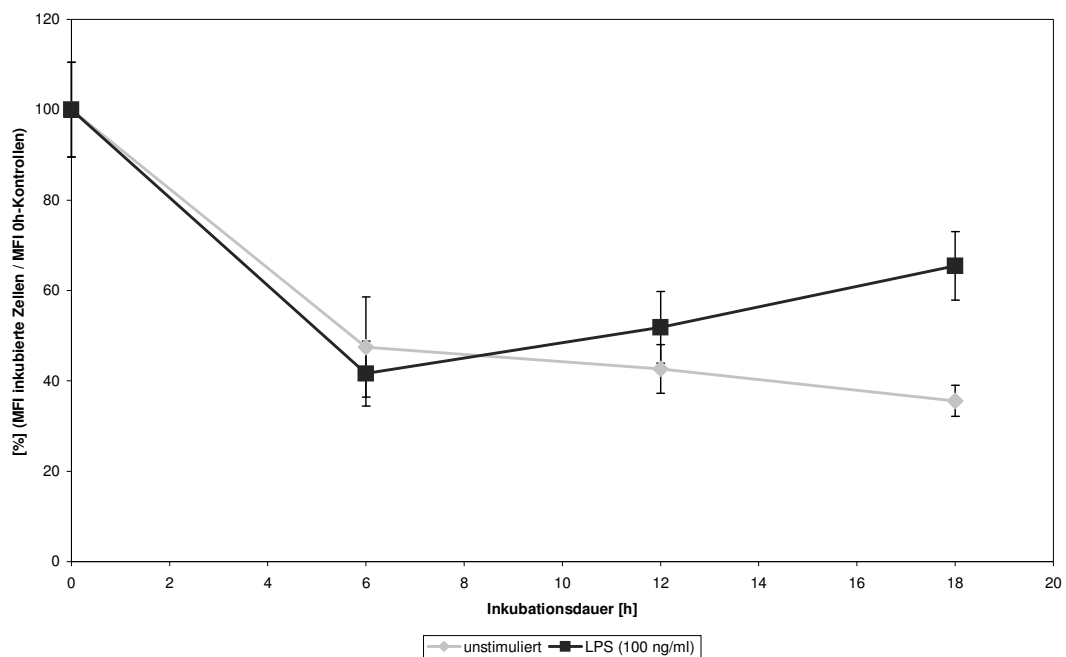


Abb. 38 zeigt die Expression von CD44 im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte und relativen Standardfehler der gemessenen MFI von zehn gesunden Spendern. Die Werte sind als relative Werte gegenüber dem Ausgangswert (0 Stunden, 100 %) aufgetragen.

4.1.3. Expression von CD54 im zeitlichen Verlauf nach LPS-Stimulation

Wie schon beschrieben (Ergebnisse: 2.1. Stimulation mit LPS) führte die Stimulation mit 100 ng/ml LPS besonders bei CD54 zu einer gesteigerten Expression. Dies spiegelt sich auch im zeitlichen Verlauf der Expression wider (siehe Abb. 39). Während die Expression von CD54 auf unstimulierten Zellen über 81 % nach 6 Stunden und 71 % nach 12 Stunden bis auf 52 % nach 18 Stunden fiel, stieg die Expression von CD54 auf stimulierten Zellen schon nach 6-stündiger Inkubation bis auf 160 % des Ausgangswertes an. In den folgenden 12 Stunden stieg der Level der Expression auf mehr als das Doppelte des Ausgangswertes (219 % nach 12 Stunden, 225 % nach 18 Stunden).

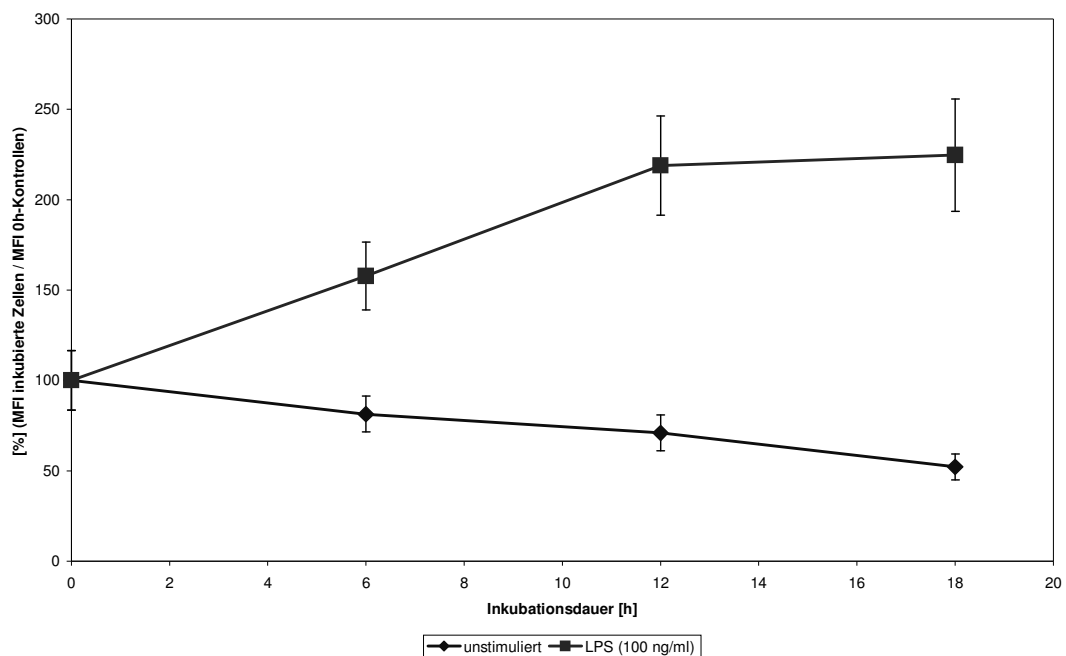


Abb. 39 zeigt die Expression von CD54 im zeitlichen Verlauf der Stimulation mit LPS (100 ng/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte und relativen Standardfehler der gemessenen MFI von zehn gesunden Spendern. Abgebildet ist der Quotient aus den gemessenen Mittelwerten und dem Ausgangswert (0 Stunden, 100 %).

4.2. Stimulation mit Adrenalin

4.2.1. Expression von CD15 im zeitlichen Verlauf nach Adrenalin-Gabe

Die Expression von CD15 schien sich unter dem Einfluss von Adrenalin gegenüber unstimulierten Kontrollzellen kaum zu verändern. Bis zum Wert nach 6 Stunden lagen die Graphen fast zusammen (siehe Abb. 40). Erst nach ungefähr 12 Stunden schien ein durch Adrenalin induzierter Effekt aufzutreten. In der Graphik liegen die unstimulierten Zellen zusammen mit den Zellen, die mit einer niedrigen Dosierung von Adrenalin (10^{-9} M und 10^{-6} M) stimuliert worden sind. Allein der Graph der mit der Höchstdosis Adrenalin (10^{-3} M) stimulierten Zellen liegt deutlich über den anderen. Bei hohen Standardfehlern war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant.

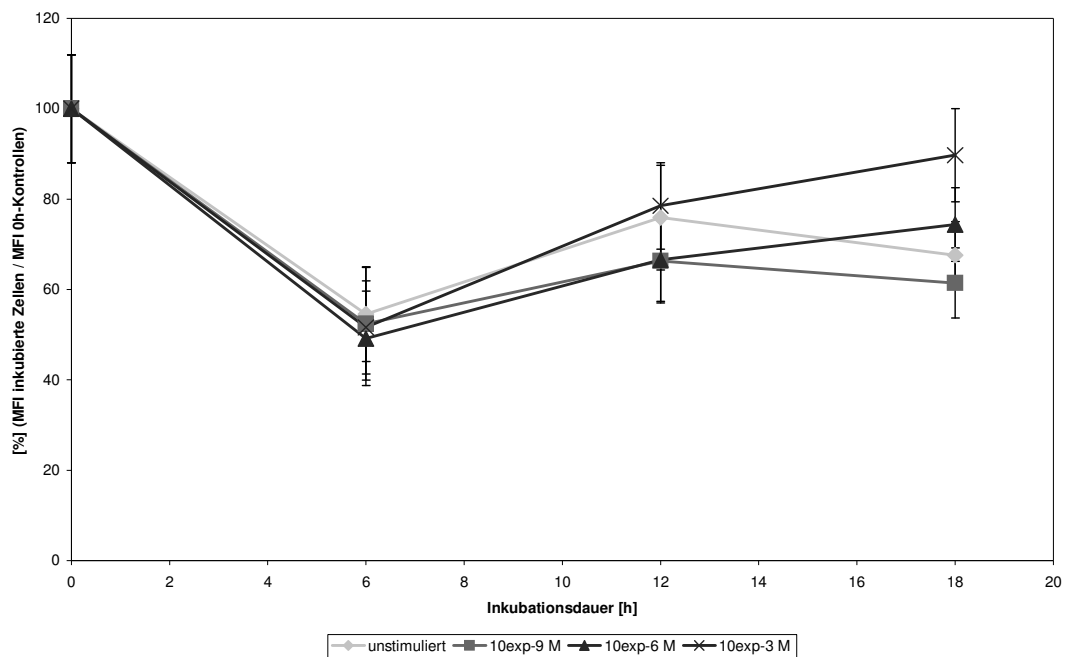


Abb. 40 zeigt den zeitlichen Verlauf der Expression von CD15 nach Stimulation mit Adrenalin. Dargestellt sind die Mittelwerte und relativen Standardfehler von zehn gesunden Spendern. Bei den gezeigten Werten handelt es sich um Quotienten aus den nach der Inkubation gemessenen Werten und den Kontrollwerten, welche vor der Inkubation gemessen wurden.

4.2.2. Expression von CD44 im zeitlichen Verlauf nach Adrenalin-Gabe

Auch die Expression von CD44 schien sich durch Adrenalin nicht wesentlich beeinflussen zu lassen (Abb. 41). Alle untersuchten Zellkulturen exprimierten nach 6-stündiger Inkubation deutlich weniger CD44 als vor Beginn der Inkubation. Die mit niedriger Adrenalindosis stimulierten Zellen (10^{-9} M und 10^{-6} M) lagen in der Folgezeit zusammen mit den unstimulierten Zellen bei etwa 40 % der unstimulierten Werte, während die mit der Höchstdosis (10^{-3} M) stimulierten Zellen signifikant darüber lagen (56 % nach 12-stündiger Inkubation, 46 % nach 18 Stunden).

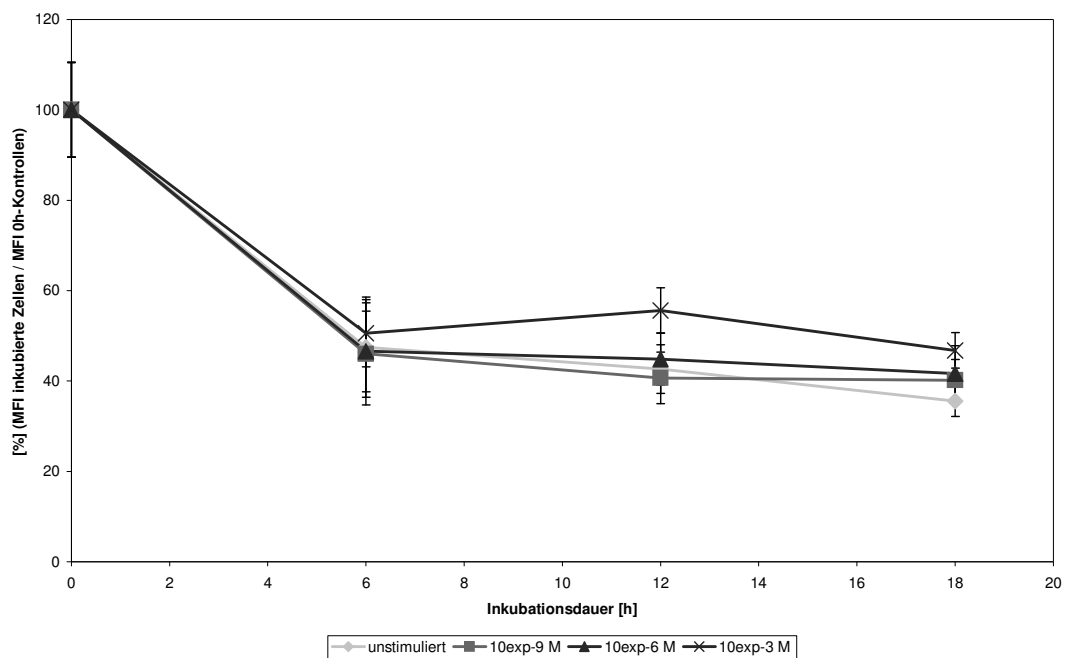


Abb. 41 zeigt den zeitlichen Verlauf der Expression von CD44 nach Stimulation mit Adrenalin. Dargestellt sind die Mittelwerte und relativen Standardfehler der gemessenen MFI von zehn gesunden Spendern. Abgebildet ist der Quotient aus den nach Inkubation gemessenen Mittelwerten der zehn Spender und dem Ausgangswert (0 Stunden, 100 %).

4.2.3. Expression von CD54 im zeitlichen Verlauf nach Adrenalin-Gabe

Der Verlauf der Expression von CD54 war dem der beiden anderen Adhäsionsmoleküle ähnlich (Abb. 42). Wieder fiel die Expression schon nach 6-stündiger Inkubation deutlich ab. Während aber CD15 anschließend wieder verstärkt exprimiert wurde und CD44 auf einem scheinbar stetigem Level blieb, fiel das Ausmaß der CD54-Expression weiter ab. Allein die mit der Höchstdosis Adrenalin stimulierten Zellen exprimierten signifikant mehr CD54 und lagen nach 12 Stunden mindestens 20 % über allen anderen Zellen (90 % gegenüber 70 % nach 12 Stunden und 77 % gegenüber 55 % nach 18 Stunden).

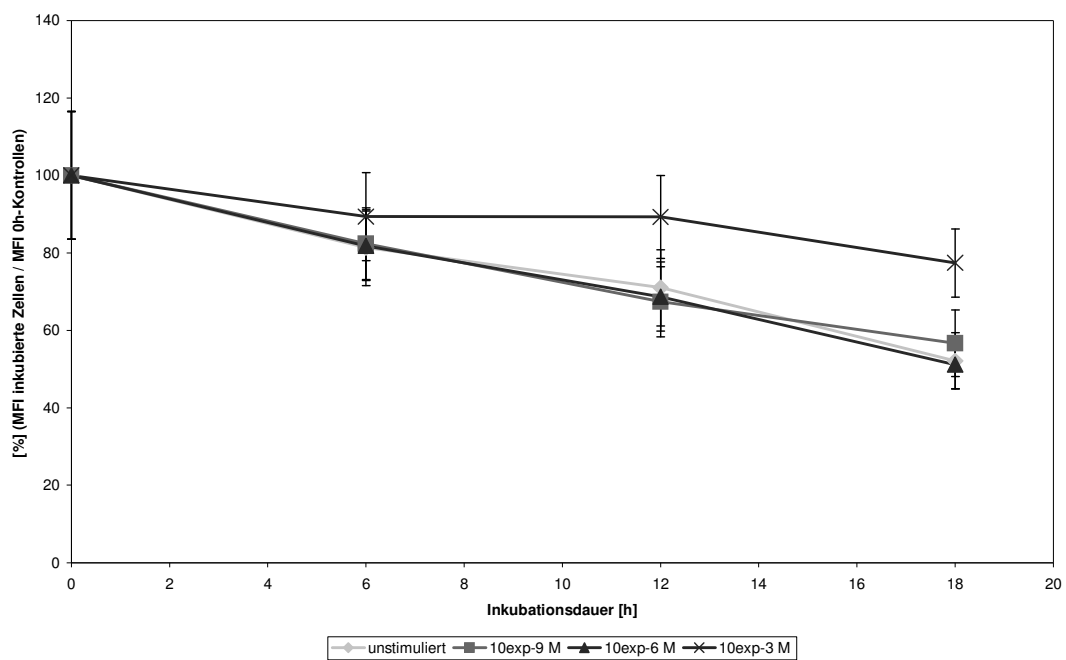


Abb. 42 zeigt die Expression von CD54 auf unstimulierten und mit Adrenalin stimulierten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und relativen Standardfehler von zehn gesunden Spendern. Bei den gezeigten Werten handelt es sich um Quotienten aus den nach der Inkubation gemessenen Werten und den Kontrollwerten, welche vor der Inkubation gemessen wurden.

4.3. Adrenalin-Stimulation vorstimulierter Zellen

4.3.1. Expression von CD15 auf vorstimulierten Zellen nach Adrenalin-Gabe

Während LPS (100 ng/ml) den Level der CD15-Expression über die Dauer der Inkubation stabilisierte (roter Graph in Abb. 37), fielen die Werte unstimulierter Zellen ab (Ergebnisse: 4.1.1. Expression von CD15 im zeitlichen Verlauf nach LPS-Stimulation). Ähnlich wie LPS führte auch die Inkubation mit Adrenalin, allerdings nur in höchster Konzentration von 10^{-3} M, nach 18 Stunden zu einem Level der CD15-Expression nahe dem Ausgangswert (90 %). Auch in der Kombination von Adrenalin in Höchstdosis zusammen mit LPS lagen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei Werten um den Ausgangswert von 100 % (siehe Abb. 43). Mittlere Konzentrationen von Adrenalin dagegen ließen die Expression von CD15 auf vorstimulierten Zellen nach 18-stündiger Inkubation steigen (119 % bei 10^{-9} M und 136 % bei 10^{-6} M).

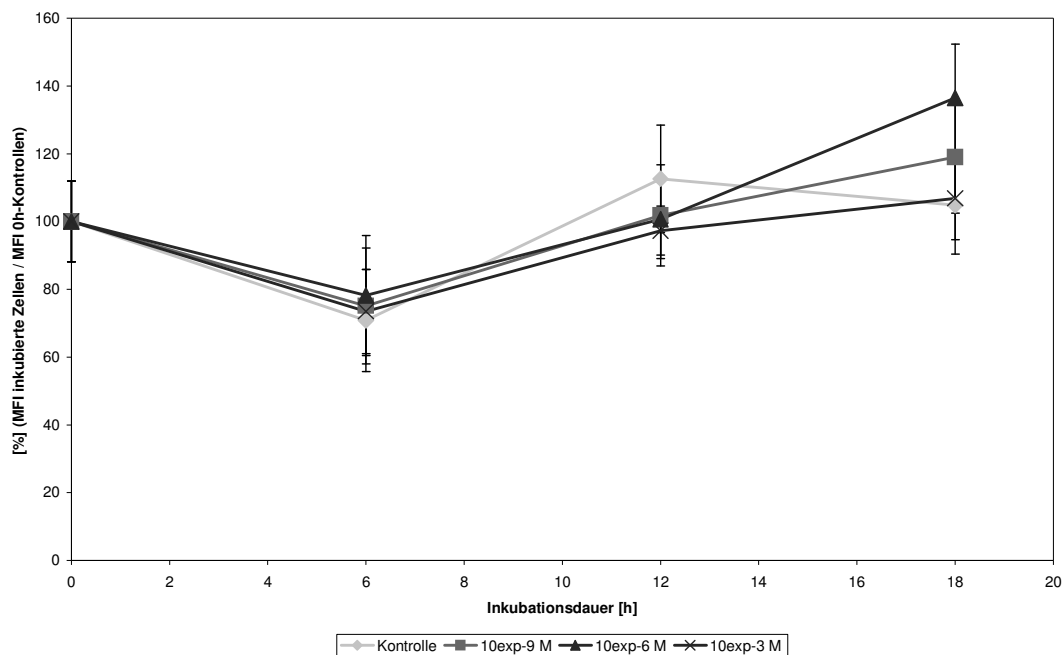


Abb. 43 zeigt den Verlauf der CD15-Expression von vorstimulierten Zellen (100 ng/ml LPS) nach Adrenalin-Gabe. Dargestellt sind die Mittelwerte und relativen Standardfehler der gemessenen MFI von zehn gesunden Spendern. Die Werte sind als relative Werte gegenüber dem Ausgangswert (0 Stunden, 100 %) aufgetragen

4.3.2. Expression von CD44 auf vorstimulierten Zellen nach Adrenalin-Gabe

Die Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit LPS führte gegenüber den unstimulierten Zellen zu einer vermehrten Expression von CD44, die erstmals nach 12 Stunden erkennbar war und nach 18 Stunden noch stärker wurde. Sowohl unstimulierte als auch stimulierte Zellen exprimierten nach 6 Stunden aber nur noch knapp die Hälfte des Ausgangslevels. Auch die mit Adrenalin inkubierten Zellen hatten nach 6 Stunden nur noch etwa halb so viele detektierbare CD44-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche wie die Kontrollzellen vor Beginn der Inkubation. Der Effekt von Adrenalin (nur 10^{-3} M) bestand in einem gegenüber den unstimulierten Zellen leicht erhöhtem Level von CD44 (Ergebnisse: 4.1.2. Expression von CD44 im zeitlichen Verlauf nach LPS-Stimulation). Zellen, die sowohl mit LPS als auch mit Adrenalin inkubiert worden waren, verhielten sich grundsätzlich nicht anders (Abb. 44). Nach 6-stündiger Inkubation exprimierten auch diese Zellen nur noch etwa halb so viel CD44 wie unstimulierte Zellen. Mit zunehmender Inkubationsdauer exprimierten die Zellen umso mehr CD44, mit desto höherer Adrenalin-Dosis sie inkubiert worden waren. Die Tendenz der Graphen war bei stimulierten und unstimulierten Zellen jedoch gleich.

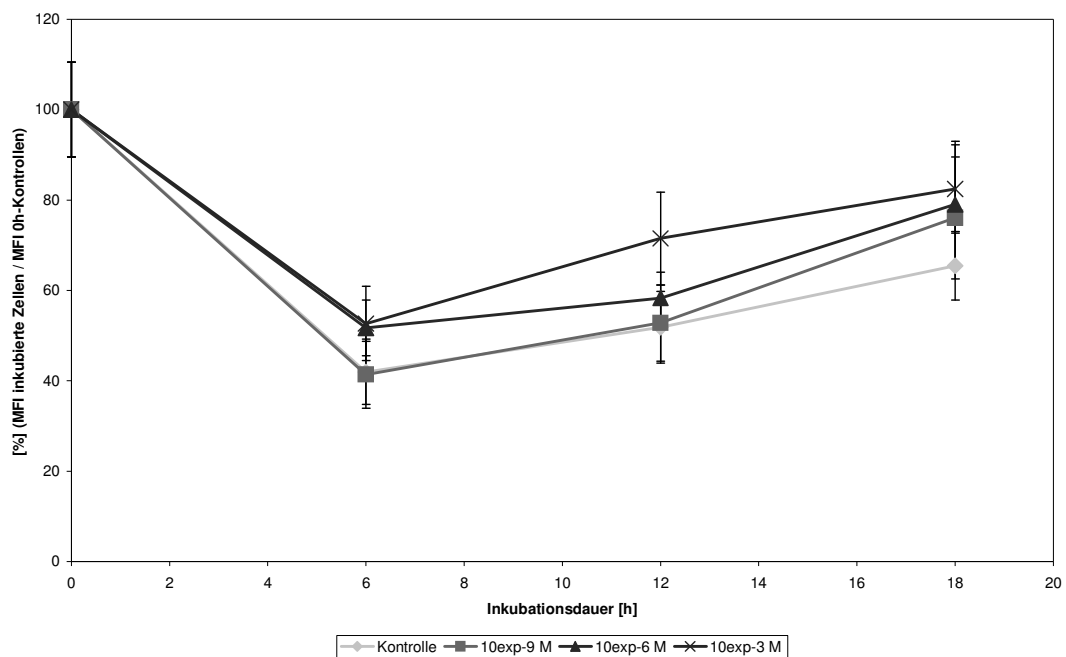


Abb. 44 zeigt die Expression von CD44 auf mit LPS vorstimulierten Zellen nach zusätzlicher Adrenalin-Gabe. Dargestellt sind die Mittelwerte und relativen Standardfehler von zehn gesunden Spendern. Bei den gezeigten Werten handelt es sich um Quotienten aus den nach der Inkubation gemessenen Werten und den Kontrollwerten, welche vor der Inkubation gemessen wurden.

4.3.3. Expression von CD54 auf vorstimulierten Zellen nach Adrenalin-Gabe

Die LPS-Stimulation neutrophiler Granulozyten führte zu einer signifikant erhöhten Expression von CD54 ($p < 0,005$). Sie lag 18 Stunden nach Inkubationsbeginn bei über 200 % des Ausgangswertes und mehr als vier Mal so hoch wie die CD54-Expression auf unstimulierten Zellen zum gleichen Zeitpunkt. Adrenalin in niedriger Dosis hatte überhaupt keine Wirkung gezeigt (blauer und dunkelblauer Graph in Abb. 42). Allein hochdosiertes Adrenalin in der Endkonzentration 10^{-3} M hatte zu einem leicht verzögerten Abfall von CD54 geführt. Abb. 45 zeigt den Verlauf der Expression von CD54 auf Zellen, die sowohl mit LPS als auch mit Adrenalin stimuliert worden sind. Der Verlauf der Graphen folgt dem durch LPS induzierten Verlauf (blassblauer Graph) weitgehend. Zwischen den nur mit LPS stimulierten Zellen und den mit Adrenalin in niedriger Dosis stimulierten Zellen war kein Unterschied zu sehen. Zellen, die mit Adrenalin in Höchstdosis stimuliert wurden, zeigten nach 6 und nach 12 Stunden einen verzögerten Anstieg der CD54-Expression. Nach 18 Stunden war dieser Effekt nicht mehr erkennbar.

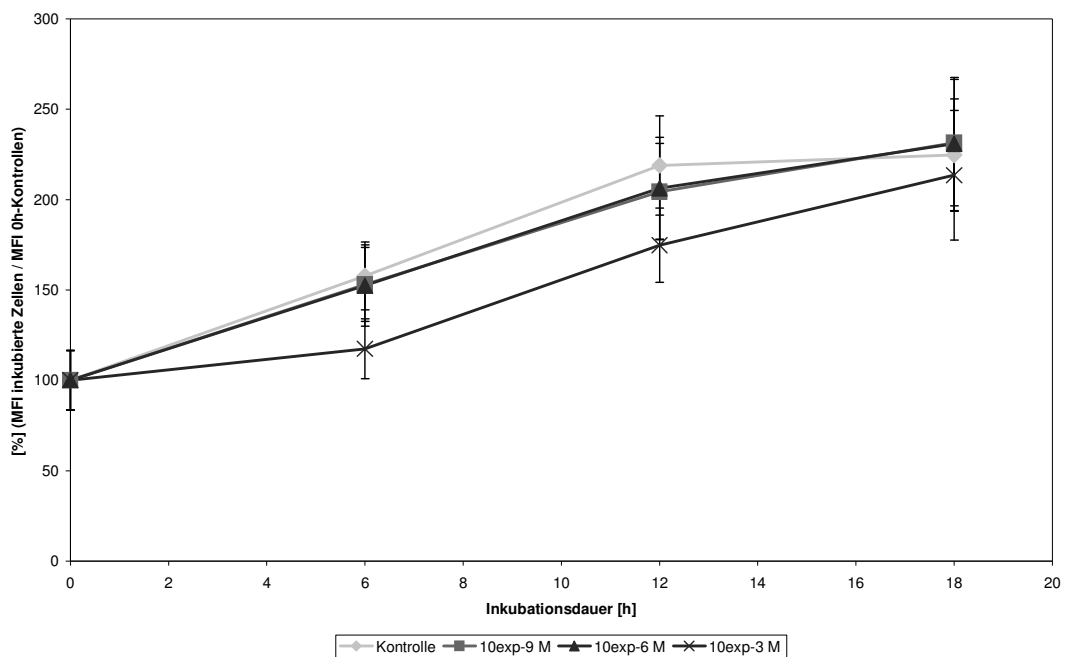


Abb. 45 zeigt die Expression von CD54 auf vorstimulierten Zellen (100 ng/ml) nach Inkubation mit Adrenalin. Dargestellt sind die Mittelwerte und relativen Standardfehler der gemessenen MFI von zehn gesunden Spendern. Die Werte sind als relative Werte gegenüber dem Ausgangswert (0 Stunden, 100 %) aufgetragen.

5. Produktion von Zytokinen

Die Produktion von Zytokinen durch neutrophile Granulozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Andere Methoden (wie ELISA oder verschiedene mRNA-Detektionsmethoden) lassen die sichere Unterscheidung zwischen Effekten, die durch Granulozyten oder verunreinigende Monozyten hervorgerufen wurden, nicht zu und sind daher nicht spezifisch genug. Die Doppelfärbung des zu untersuchenden intrazellulär vorliegenden Zytokins und des spezifischen Oberflächenantigens CD66b ermöglicht eine eindeutige Zuordnung gemessener Ergebnisse zu einer Zellpopulation.

5.1. Etablierung der Methode

Da die Methode der durchflusszytometrischen Doppelfärbung in neutrophilen Granulozyten bisher selten zur Anwendung gekommen ist, mussten Positiv-Kontrollen durchgeführt werden. Beispielhaft ist hier die Stimulation von humanen Monozyten mit LPS gezeigt (Abb. 46), die zu einer deutlichen Erhöhung des Anteils Zytokinproduzierender Zellen führte und damit die Funktionalität der Methode prinzipiell verifizierte.

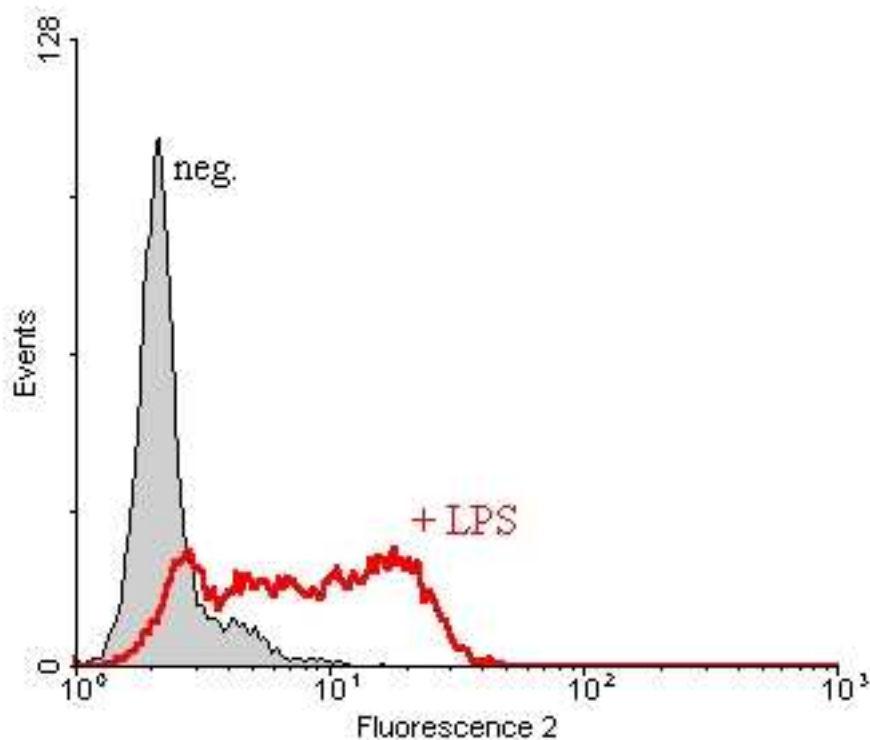


Abb. 46 zeigt die Fluoreszenz 2 (PE-markierter Antikörper gegen humanes IL-8) bei unstimulierten (schwarzes Histogramm) und mit 10 ng/ml LPS stimulierten (rotes Histogramm) Zellen. Man erkennt eine deutliche Verschiebung hin zu höheren Fluoreszenzintensitäten.

5.2. Negativ-Kontrollen

Um die Spezifität der intrazellulären Zytokin-Färbung nachzuweisen, wurden zwei Negativ-Kontrollen durchgeführt (Material und Methoden: 2.9.8. Durchführung der Negativ-Kontrollen). Abb. 47 zeigt vier Doppelfärbungen von neutrophilen Granulozyten mit FITC-markierten Antikörpern gegen das für Neutrophile spezifische Oberflächenmolekül CD66b und mit PE-markierten Antikörpern gegen IL-8. Abb. 47A zeigt unstimulierte Neutrophile. In Teil B der Abbildung ist eine Population von neutrophilen Granulozyten zu sehen, die sich mit dem Antikörper für IL-8 anfärben lässt (rechter oberer Quadrant). Dabei handelt es sich um LPS-stimulierte Zellen. Man erkennt deutlich, dass sowohl die Inkubation mit einem Konkurrenzantikörper (Abb. 47C) als auch die Vorinkubation des PE-markierten Antikörpers mit IL-8 (Abb. 47D) die Spezifität der Doppelfärbung nachzuweisen im Stande war. Beide

Kontrollen reduzierten den Anteil der spezifisch angefärbten Zellen (rechter oberer Quadrant) auf das Maß der unstimulierten Zellen (Teil A).

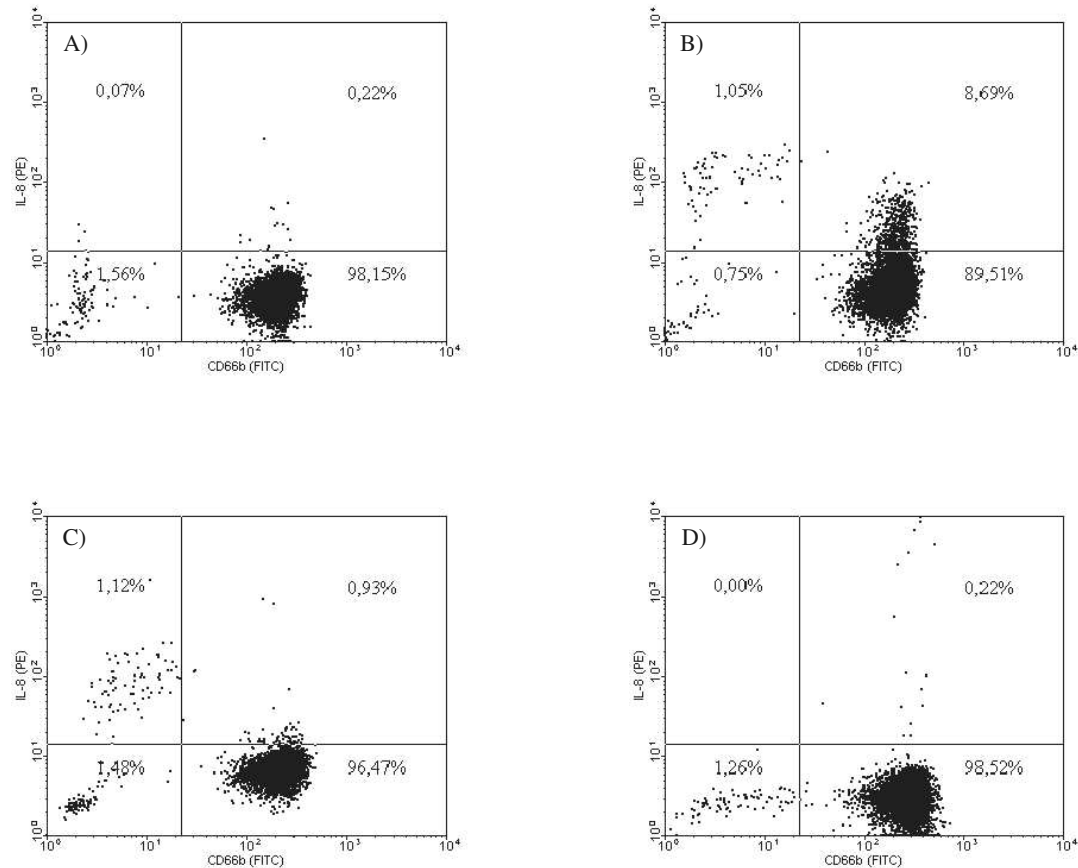


Abb. 47 zeigt in A) unstimulierte Zellen und in B) mit LPS stimulierte Zellen. Außerdem sind die durchgeführten Negativ-Kontrollen dargestellt: in C) mit LPS stimulierte Zellen, die vor der Färbung mit einem Konkurrenzantikörper gegen IL-8 inkubiert wurden, und in D) mit LPS stimulierte Zellen, deren PE-markierte Antikörper vor dem Färbeporgang mit IL-8 vorinkubiert wurden.

5.3. Stimulation mit LPS und Adrenalin

Die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit LPS (100 ng/ml) und Adrenalin (5×10^{-5} M) zeigte, dass LPS in der Lage war, neutrophile Granulozyten zur Produktion von IL-8 anzuregen (Abb. 48, rote Balken, $p < 0,05$), nicht aber zur Produktion von IL-6 oder TNF- α (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation mit Adrenalin in einer Endkonzentration von 5×10^{-5} M konnte keine messbare Produktion von Zytokinen induzieren. Die scheinbare Inhibition der mit LPS stimulierten Zellen durch Adrenalin erwies sich bei hoher Standardabweichung als nicht signifikant ($p > 0,05$). Adrenalin

schien also weder auf unstimulierte Zellen noch auf mit LPS vorstimulierte neutrophile Granulozyten eine Wirkung bezüglich der Produktion von IL-8 zu haben.

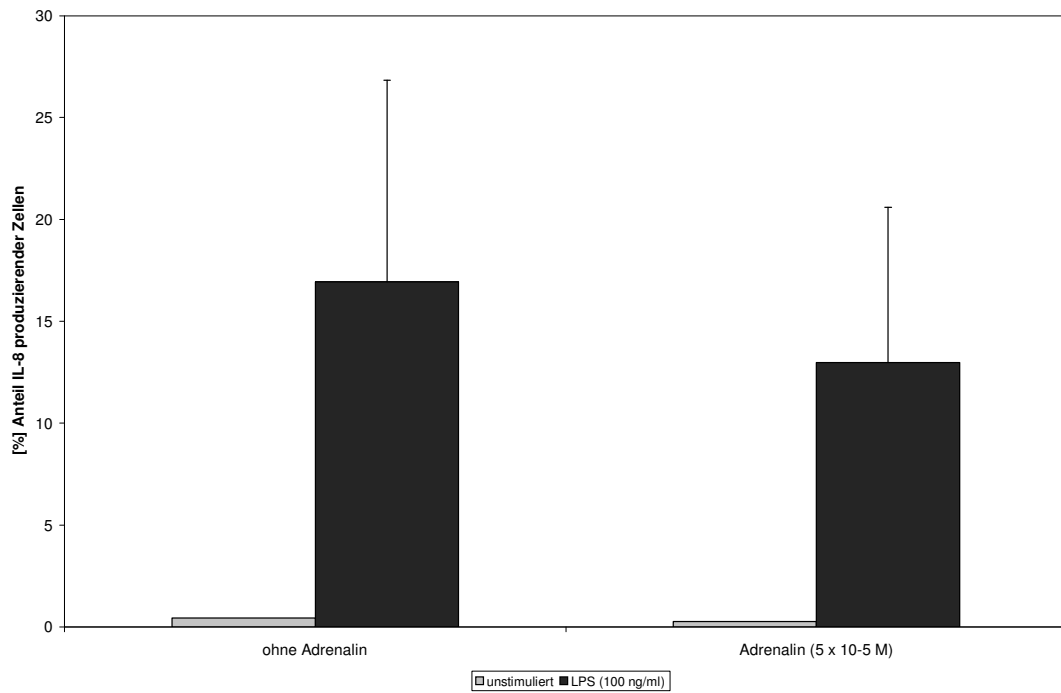


Abb. 48 zeigt den Anteil IL-8 produzierender Zellen nach Stimulation mit LPS (rote Balken) und Adrenalin (rechte Hälfte des Diagramms). LPS führt zur verstärkten Produktion von IL-8 durch neutrophile Granulozyten ($n = 8$; $p < 0,05$). Adrenalin bewirkt keine signifikante Veränderung.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

6.1. Signaltransduktion adrenerger Rezeptoren

Adrenalin induzierte in neutrophilen Granulozyten eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration des second messenger cAMP, der durch die Bindung von Adrenalin an β -Adrenozeptoren erklärt werden kann.

Weder Adrenalin noch Noradrenalin waren in der Lage, in neutrophilen Granulozyten einen Kalzium-Influx zu induzieren, wie er durch fMLP und IL-8 induzierbar war. Dies kann als Hinweis dafür gedeutet werden, dass auf neutrophilen Granulozyten möglicherweise keine biologisch aktivierbaren α 1-Adrenozeptoren vorhanden sind.

6.2. Expression von Adhäsionsmolekülen

LPS erhöhte die Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle CD15, CD44 und CD54. Am deutlichsten war dies bei CD54 zu sehen; die Expression stieg unter dem Einfluss von LPS kontinuierlich an, während sie ohne LPS abfiel.

Adrenalin konnte in höchster eingesetzter Konzentration (10^{-3} M) nach mindestens 12-stündiger Inkubation die Expression von CD44 gegenüber unstimulierten Kontrollzellen steigern. Auch auf vorstimulierten Zellen schien CD44 durch Adrenalin stimulierbar zu sein, wobei nur der durch die Höchstdosis von Adrenalin ausgelöste Effekt signifikante Ausmaße annahm und das auch nur nach 12 Stunden.

Die Expression von CD54 auf unstimulierten Zellen ließ sich ebenfalls nach mindestens 12-stündiger Inkubation durch hochdosiertes Adrenalin hochregulieren. Auf vorstimulierten Zellen schien der durch Adrenalin vermittelte Effekt genau gegensinnig zu sein. Hier inhibierte Adrenalin zumindest teilweise die durch LPS induzierte Hochregulation der Expression von CD54.

6.3. Produktion von Zytokinen

Eine durchflusszytometrische Färbung von intrazellulär vorliegenden Zytokinen auch in neutrophilen Granulozyten wurde erfolgreich durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass im gewählten Versuchsaufbau die Produktion von IL-8, nicht aber von IL-6 und TNF- α , in Neutrophilen durch LPS induzierbar ist.

Adrenalin schien die Produktion von IL-8, IL-6 und TNF- α nicht zu beeinflussen.

IV. Diskussion

1. Isolierung und Reinheit der neutrophilen Granulozyten

In den meisten veröffentlichten Untersuchungen über neutrophile Granulozyten werden die Zellen mittels der Ficoll-Hypaque-Methode oder einer verwandten Methode mit anschließender Dextran-sedimentation und hypotoner Lyse isoliert (z. B. Kalmar et al., 1988; Hammond et al., 1995; Vulcano et al., 1998). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben jedoch, dass nach diesen Schritten neben Granulozyten auch noch eine hohe Anzahl kontaminierender Zellen vorlag. Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei hauptsächlich um T-Lymphozyten handelte. Durch den Einsatz von magnetisierbaren Antikörpern, die spezifisch an das auf allen T-Lymphozyten vorhandene CD2 binden, konnten die kontaminierenden Zellen aus der Präparation effektiv entfernt werden, so dass die Reinheit der neutrophilen Granulozyten danach mit fast 95 % signifikant höher lag. Methodisch ist dieser zusätzliche Schritt unbedenklich, da die Behandlung neutrophiler Granulozyten mit magnetisierbaren Antikörpern deutlich weniger Artefakte verursacht als andere Methoden (Zahler et al., 1997). In den Versuchen wurden ausschließlich Präparationen verwendet, in denen der Anteil der kontaminierenden Monozyten unter 1 % lag. Dies war wichtig, da Monozyten in ihrer Funktionalität neutrophilen Granulozyten ähneln, die Effekte aber zum Teil in sehr viel stärkerem Ausmaß zeigen. Es musste daher ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Ergebnisse auf eine Kontamination durch Monozyten zurückzuführen waren. Dem gleichen Ziel diente auch die Methode der spezifischen fluoreszenzimmunologischen Doppelfärbung.

Die Bestimmung der Reinheit der Neutrophilen-Präparation in der CASY1-Apparatur war für ein vorläufiges Ergebnis ausreichend. Genauere Daten hierzu lieferte die durchflusszytometrische Analyse, da durch die Verwendung spezifischer Antikörper die einzelnen Zellpopulationen exakt dargestellt werden können. Als Marker für die Population der neutrophilen Granulozyten wurde dabei das Oberflächenantigen CD66b gewählt, ein Molekül, welches auch von eosinophilen und basophilen Granulozyten exprimiert wird. Da diese aber nur einen sehr geringen, vernachlässigbar kleinen Anteil der Gesamtpopulation der Granulozyten ausmachen, stellte CD66b einen geeigneten Marker für diese Analyse dar. Als spezifischer Marker

humaner Monozyten war CD14 hingegen nicht ideal, denn auch neutrophile Granulozyten tragen dieses Oberflächenantigen (Haziot et al., 1993). Allerdings finden sich auf den polymorphnukleären Leukozyten nur etwa 3 % der Anzahl CD14-Moleküle, die auf Monozyten exprimiert sind (Antal-Szalmas et al., 1997). Da neutrophile Granulozyten (in geringem Ausmaß) auch durch den CD14-spezifischen Antikörper angefärbt werden konnten, war der exakte Anteil an Monozyten in der Präparation schwer auszumachen. Möglicherweise war die Verunreinigung durch Monozyten noch geringer, als es die durchflusszytometrische Analyse zeigte.

2. Adrenozeptoren und deren intrazelluläre Botenstoffe

In der Literatur ist sowohl die Anwesenheit von α -adrenergen Rezeptoren (Abraham et al., 1999) als auch von β -Adrenozeptoren auf neutrophilen Granulozyten beschrieben (Landmann et al., 1992; Benschop et al., 1997). Die Anzahl der β_2 -Rezeptoren auf Neutrophilen wurde durch Studien mit Radioliganden bestimmt und liegt bei etwa 900 pro Zelle (Galant et al., 1981). Dies ist in etwa die Anzahl Rezeptoren, die auch auf T-Helfer-Zellen zu finden ist (Wahle et al., 2001).

Während die Rolle von cAMP als second messenger in neutrophilen Granulozyten allgemein als inhibitorisch beschrieben werden kann, ist dies für Kalzium anders. Die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit fMLP oder IL-8 führt zu einem deutlichen Konzentrationsanstieg von Kalzium, der auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte. Generell muss Kalzium in neutrophilen Granulozyten eher als stimulierender Botenstoff betrachtet werden (Schorr et al., 1999).

In dieser Arbeit konnte auf Stimulation mit Adrenalin oder Noradrenalin kein signifikanter Kalzium-Einstrom festgestellt werden. In ähnlich durchgeführten Experimenten an neutrophilen Granulozyten konnte von Tintinger et al. festgestellt werden, dass der Rückgang des durch klassische Stimuli induzierten Kalzium-Influx in neutrophile Granulozyten durch Adrenalin stimulierbar ist (Tintinger et al., 2001), die Konzentration von Kalzium-Ionen also schneller wieder auf den Ausgangswert zurückkehrt. Dies entspricht funktionell einer Hemmung des Botenstoffes Kalzium und ist stringent mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen, dass weder Adrenalin noch Noradrenalin in der Lage sind, einen Kalzium-Influx in neutrophile Granulozyten zu induzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Inkubation mit Adrenalin ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels festgestellt. Verglichen mit T-Zellen ist sowohl der basale als auch der stimulierte cAMP-Gehalt in Neutrophilen sehr viel niedriger. Die Ursache hierfür könnte eine defekte Bindung der α -Untereinheit der Adenylatcyclase an die β - und γ -Untereinheiten aufgrund eines Überschusses an freien β - und γ -Untereinheiten sein (Bokoch et al., 1987). Der Befund des ausbleibenden Ca^{2+} -Influx lässt sich mit einem erhöhten cAMP-Spiegel funktionell verknüpfen. Eine Erhöhung der Konzentration des prinzipiell inhibitorischen Botenstoffs cAMP zusammen mit einer gleichbleibenden Konzentration des prinzipiell stimulierenden Botenstoffs Ca^{2+} führt in der Gesamtheit der intrazellulären Vorgänge zu einer Inhibierung der Funktion von neutrophilen Granulozyten. Dies stimmt mit den Angaben aus der Literatur gut überein. Adrenalin und Noradrenalin führen zu einer Verminderung der Produktion von Sauerstoffradikalen (Barnett et al., 1997), zu verminderter Phagozytosefähigkeit und Chemotaxis, scheinen also neutrophile Granulozyten in ihrer Aktivität grundsätzlich zu hemmen (Wenisch et al., 1996).

3. Expression von Adhäsionsmolekülen

Da die drei untersuchten Adhäsionsmoleküle unterschiedlichen Klassen von Oberflächenproteinen angehören und unterschiedlich reguliert sein können, werden sie zunächst separat diskutiert.

3.1. CD15 auf neutrophilen Granulozyten

Das Oberflächenprotein Lewis X Antigen (CD15) fungiert als prinzipieller Ligand für Selektine und ist an einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt. So wird nach Knochenmarktransplantation eine erhöhte Expression von CD15 auf neutrophilen Granulozyten gefunden (Masat et al., 1997), was von den Autoren als Hinweis auf eine phänotypisch eher unreife Zellpopulation gedeutet wird. Bei der Differenzierung von neutrophilen Granulozyten zu Zellen, die in vielen Charakteristika dendritischen Zellen gleichen, zeigt sich eine Abregulation von CD15 und CD65s. Sie wird von einer Neoexpression der mit dendritischen Zellen assoziierten Oberflächenmoleküle CD5, CD40, CD80, CD 86 und einer Reihe

weiterer Moleküle begleitet (Oehler et al., 1998). Die Applikation von G-CSF als therapeutische Maßnahme der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) resultiert in einer verminderten Expression von CD15 auf neutrophilen Granulozyten (Zarco et al., 1996), die Applikation bei gesunden Probanden hingegen in einer nur wenige Stunden andauernden Elevation des CD15-Levels auf PMN (Höglund et al., 1997). CD15 scheint also bei der physiologischen Reifung neutrophiler Granulozyten beteiligt zu sein, die genauen Regulationsmechanismen sind aber unklar.

Die polymorphkernigen Leukozyten von Patienten, die unter Morbus Crohn leiden, zeigen eine deutlich erhöhte Expression von CD11b, während L-Selektin, CD15 und LFA-1 weder signifikant vermehrt noch vermindert sind (Brandt et al., 1998). Ebenso exprimieren neutrophile Granulozyten von Patienten mit Sichelzellanämie zwar vermehrt CD64, nicht aber CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD62L oder CD15 (Fadlon et al., 1998). Dies zeigt auch, dass die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf neutrophilen Granulozyten durchaus differentiell moduliert sein kann und damit Rückschlüsse aus Beobachtungen der Regulation eines Oberflächenmoleküls auf die Regulation anderer Oberflächenmoleküle nicht oder nur schwer möglich sind.

Bei Patienten mit allergischer Spätreaktion besteht eine negative Korrelation der Anzahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten mit der Membranexpression von CD15 (Asman et al., 1997) während der allergischen Spätreaktion. Von den Autoren wird ein von der Lunge sezernierter Faktor postuliert, der auf neutrophilen Granulozyten die Aufnahme (Internalisation) oder das Abwerfen (Shedding) von CD15 induziert. Dieser Vorgang könnte als negativer Feedback-Mechanismus verstanden werden, der die Lunge vor einer Überladung mit neutrophilen Granulozyten schützt und vermehrt Neutrophile in die Zirkulation mobilisiert. Weiterhin wird die Expression von CD15 auf neutrophilen Granulozyten im Verlauf von Pilzinfektionen moduliert. Glucuronoxylomannan (GXM), ein Polysaccharid aus der Kapsel von *Cryptococcus neoformans*, induziert eine Hochregulation von CD15 und CD11b auf Neutrophilen (Dong et al., 1996). Da die Hochregulation von CD11b mit einer Degranulation von neutrophilen Granulozyten assoziiert ist (Carlos et al., 1995), könnte die gesteigerte Expression von CD15 und CD11b als Zeichen einer Aktivierung der Neutrophilen interpretiert werden.

In dieser Arbeit wurde eine deutliche Hochregulation der CD15-Expression nach Stimulation durch Lipopolysaccharid (LPS) gefunden. Vergleichbar mit GXM aus der Kapsel von *Cryptococcus neoformans* scheint also auch LPS als Bestandteil gramnegativer Bakterienwände eine Aktivierung der ersten Abwehrlinie des unspezifischen Immunsystems auszulösen.

Im gewählten Versuchsaufbau konnte kein signifikanter Effekt von Adrenalin auf den Level der CD15-Expression von Neutrophilen beobachtet werden. Adrenalin-induzierte Effekte könnten auch über die Interaktion mit anderen Zellen und damit über Wechselwirkungen von Zytokinen vermittelt sein, ein direkter Effekt von Adrenalin auf die Expression von CD15 oder auf das Abwerfen des Moleküls von der Zelloberfläche scheint nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit jedoch unwahrscheinlich.

3.2. CD44 auf neutrophilen Granulozyten

Der Hyaluronsäurerezeptor CD44 ist an vielen wichtigen Vorgängen im Rahmen der immunologischen Funktionen des Organismus beteiligt. Dennoch gibt es eine Reihe von Untersuchungen, in denen die Expression von CD44 auf neutrophilen Granulozyten unverändert bleibt, während andere Adhäsionsmoleküle reguliert werden. So findet man bei der rheumatoiden Arthritis eine erhöhte Expression von CD44 im synovialen Gewebe und eine erhöhte Konzentration von löslichem CD44 in der Gelenkflüssigkeit (Haynes et al., 1991); damit gehen aber unveränderte Level von sCD15, L-Selektin und CD44 auf neutrophilen Granulozyten einher (Bond et al., 1997), was dafür spricht, dass die Migration der PMN in die entzündete Synovialis nicht oder nicht allein von diesen Adhäsionsmolekülen vermittelt wird (Youssef et al., 1995). Für die akute und chronische Hypersensitivitätsreaktion der Haut scheinen P- und E-Selektine unerlässlich zu sein, während CD44 anscheinend keine Rolle spielt (Catalina et al., 1999). Neutrophile Granulozyten von Patienten, die an AIDS erkrankt sind, zeigen reduzierte Level von CD11a und CD62L. Die Expression von CD44 auf Neutrophilen von HIV-infizierten Patienten bleibt aber konstant, obwohl sie auf CD4-Lymphozyten, CD8-Lymphozyten und Monozyten hochsignifikant fällt (Hayes et al., 1999).

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) reduziert die Expression von CD44, CD43, LAM-1 (Campanero et al., 1991) und CD53 (Mollinedo et al., 1998) über eine oder mehrere endogene Proteasen, obwohl die untersuchten Moleküle unterschiedlichen Klassen von Adhäsionsmolekülen angehören. Da TNF- α gleichzeitig die Expression von β_2 -Integrinen auf Neutrophilen hochreguliert (Lo et al., 1989), wird erneut deutlich, dass Adhäsionsmoleküle einer Zellpopulation keineswegs gleichsinnig reguliert sein müssen. Erst die differentielle Regulation der Oberflächenproteine kann den komplexen Vorgang der Migration und das Auffinden der Zielgewebe von unterschiedlichen Leukozytenpopulationen gewährleisten.

Auch Medikamente können die Expression von Oberflächenproteinen auf Neutrophilen regulieren. Aceclofenac, ein nichtsteroidales Antiphlogistikum, induziert einen deutlichen Abfall der Expression von L-Selektin, während die Expression von CD11a, CD31 und CD44 unbeeinflusst bleibt (Gonzalez-Alvaro et al., 1996). Andere antiinflammatorische Substanzen (darunter Acetylsalicylsäure als pharmakologischer Wirkstoff sowie Cortisol und TGF- β als körpereigene Substanzen) und Immunsuppressiva wie Methotrexat und Cyclosporin A sind aber sehr wohl in der Lage, die Expressionsdichte von CD44, CD11a/CD18 und CD11c/CD18 auf neutrophilen Granulozyten zu reduzieren (Zak-Nejmark et al., 1998). Von den Autoren wird dies, zusammen mit der durch die Substanzen erniedrigten Antwortbereitschaft neutrophiler Granulozyten auf chemotaktische Stimuli, als wichtiger Mechanismus der antiinflammatorischen Medikamente gesehen. Beide Effekte vermindern die Migration zirkulierender Zellen in die Gewebe und verhindern so die Akkumulation immunkompetenter Zellen an den Orten der inflammatorischen Reaktion.

Einige Forschungsergebnisse der letzten Jahre betonen in ihrer Gesamtheit die Bedeutung von CD44. Der Hyaluronsäurerezeptor ist beispielsweise in der Lage, die primäre Adhäsion zwischen T-Lymphozyten und dem Endothel zu vermitteln, welches Hyaluronsäure in hohem Maße exprimiert (DeGrendele et al., 1996). Des Weiteren ist CD44 ein wichtiger Regulator bei der Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen durch Makrophagen und spielt damit eine bedeutende Rolle während der Entwicklung eines inflammatorischen Prozesses (Hart et al., 1997). Durch monoklonale Antikörper gegen CD44 lässt sich aber auch die Phagozytose von Bakterien (Moffat et al., 1996) bzw. die Lyse anderer Zellen in der näheren Umgebung (Pericle et al., 1996) durch neutrophile Granulozyten blockieren. Insofern besitzt CD44 also bei phagozytotischen Vorgängen sowohl von Makrophagen als auch von Neuro-

philen eine große Bedeutung. Hyaluronsäure als primärer Ligand für CD44 könnte CD44 tragenden Zellen, insbesondere Monozyten und Neutrophilen, signalisieren, dass sie die Zirkulation verlassen haben und sich nun im Gewebe befinden. Als Antwort darauf würden die Zellen dann mit Phagozytose oder der Sekretion zytotoxischer Substanzen reagieren.

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl LPS als auch Adrenalin in der Lage sind, die Expression von CD44 auf neutrophilen Granulozyten zu modulieren. Die durch LPS induzierte Hochregulation von CD44 kann man als unspezifischen Aktivierungsprozess im Rahmen bakterieller Infektionen begreifen. Dazu passt, dass TNF- α als proinflammatorisches Zytokin in der Lage ist, die Expression von CD44 zu verstärken (Campanero et al., 1991) und dass CD44 zur Phagozytose von Bakterien durch neutrophile Granulozyten (Moffat et al., 1996) sowie zur Clearance apoptotischer Neutrophiler (Takazoe et al., 2000) unerlässlich ist. Die Wirkung von Adrenalin in diesem Zusammenhang ist schwieriger zu interpretieren. Adrenalin ist in der Lage, die Expression von L-Selektin auf Monozyten zu stimulieren, obwohl eine Adrenalin-Stimulation im Prinzip eher in einer Inhibition von Adhäsionsmolekülen resultiert (Rainer et al., 1999). Wenn man in Betracht zieht, dass die beobachtete Hochregulation der CD44-Expression nur bei einer mindestens 12 Stunden andauernden Konzentration von 10^{-3} M auftrat, so wird die Interpretation einfacher: Solche Bedingungen können in seltenen Fällen an lokal stark begrenzten Orten intensivster inflammatorischer Aktivität auftreten. In diesen Fällen würde aber eine Stimulation neutrophiler Granulozyten zu Phagozytose und Lyse durch erhöhte CD44-Expression (Moffat et al., 1996; Pericle et al., 1996) auch physiologisch „sinnvoll“ sein.

3.3. CD54 auf neutrophilen Granulozyten

CD54 (ICAM-1) ist ein Adhäsionsmolekül der Immunglobulinsuperfamilie und fungiert als Ligand für verschiedene Integrine (LFA-1, Mac-1). Es wird in erster Linie auf Endothelzellen exprimiert und ist in dem von Eugene Butcher vorgeschlagenen 3-Schritte-Modell der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen im dritten Schritt, der festen Bindung zwischen Leukozyt und Endothelzelle mit anschließender Extravasation, von entscheidender Bedeutung (Butcher, E. C.; 1991).

CD54 wird von Endothelzellen konstitutiv exprimiert und im Stadium der akuten Inflammation deutlich hochreguliert (Dustin et al., 1986). Appliziert man Mäusen Lipopolysaccharid (LPS), so reagieren diese unter anderem mit einer deutlich erhöhten Permeabilität des Kapillarbettes für Albumin und mit anschließender neutrophiler Infiltration des Lungengewebes, was als Modell für das akute Lungenversagen (ARDS) dienen kann. Mäuse, denen die Gene für CD54 und P-Selektin fehlen, scheinen nach systemischer Gabe von LPS trotz einer erhöhten Anzahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten vor dem vaskulär bedingten Verlust von Albumin und dem Übertritt von Neutrophilen in das Lungengewebe geschützt zu sein. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass Neutrophile in Abwesenheit von CD54 und P-Selektin keine feste Bindung mehr mit den Endothelzellen eingehen können und die Verweildauer in den marginalen Gefäßbereichen dadurch so verkürzt wird, dass eine Extravasation nicht mehr möglich ist (Kamochi et al., 1999). Neben der Extravasation von Neutrophilen im Verlauf eines inflammatorischen Geschehens scheint aber auch der Prozess der Wundheilung auf die Expression von CD54 angewiesen zu sein. Die Wundheilung bei Mäusen, denen das Gen für CD54 fehlt, verläuft deutlich langsamer als die Wundheilung bei Wildtyp-Mäusen (Nagaoka et al., 2000). Auch dafür ist wohl die gestörte Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten der Hauptfaktor.

Die Erkenntnis, dass CD54 nicht nur mit Adhäsionsmolekülen von neutrophilen Granulozyten reagiert, sondern auch selbst auf deren Zelloberfläche exprimiert wird, ist relativ neu und konnte bislang im Kontext der Interaktion von Neutrophilen mit anderen Zellen nicht zufriedenstellend interpretiert werden. Der Level von CD54 auf ruhenden polymorphkernigen Leukozyten ist niedrig, kann aber durch eine Stimulation mit fMLP signifikant erhöht werden (Wawrick et al., 1989). Die Neutrophilen von Patienten unter chemotherapeutischer Behandlung zeigen nach der wiederholten Gabe von G-CSF deutlich erhöhte CD54-Level (Spiekermann et al., 1994). Auch die Stimulation der Zellen mit TNF- α oder LPS führt zu einer deutlich erhöhten Expression von CD54 auf Neutrophilen, welche mit einer Aggregation und Verklumpung von neutrophilen Granulozyten einhergeht. Die Zugabe von spezifischen Antikörpern gegen CD54 ist in der Lage, diese Selbstaggregation zu verhindern. CD54 könnte also bei der Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten untereinander eine wichtige Rolle spielen und die im Rahmen der systemisch-

inflammatorischen Reaktion (SIRS) beobachtete Verklumpung polymorphkerniger Leukozyten vermitteln (Wang et al., 1997).

In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse bezüglich der CD54-Expression nach Stimulation mit LPS bestätigt werden. Es zeigte sich eine deutliche Hochregulation der Expression von CD54 auf Neutrophilen. Im Sinne einer proinflammatorischen Reaktion ist dieses Ergebnis leicht zu interpretieren. Von besonderem Interesse ist sicherlich der Befund, dass in den vorgenommenen Untersuchungen Adrenalin in hochphysiologischer Konzentration in der Lage zu sein schien, die durch LPS vermittelte Hochregulation zumindest teilweise zu antagonisieren. Als Mechanismus zur Regulation der Expression von CD54 auf neutrophilen Granulozyten kommt neben der Modulation der Neusynthese auch das Abwerfen (Shedding) von vorhandenen CD54-Molekülen in Frage. Die zweite Möglichkeit, also das Shedding von bereits exprimiertem CD54, wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass akute körperliche Anstrengung die Konzentration von löslichem CD54 im Serum signifikant erhöht. Da dieser Effekt durch die Blockade β -adrenerger Rezeptoren inhibierbar ist, scheint die Stimulation β -adrenerger Rezeptoren direkt oder indirekt in einem Shedding von CD54 zu resultieren (Rehman et al., 1997). Für das Adhäsionsmolekül L-Selektin wird beschrieben, dass die Stimulation nozizeptiver Rezeptoren in vivo zu einem Abwerfen von L-Selektin von Neutrophilen führt und eine bestehende Entzündung eines Gelenkes dadurch in ihrem Fortschreiten gehindert wird (Strausbaugh et al., 1999). Der Mechanismus des Shedding könnte auch für die in dieser Arbeit gefundene Abregulation der Expression von CD54 auf vorstimulierten Zellen verantwortlich sein. Es bleibt jedoch offen, warum in vitro für diesen Effekt eine Vorstimulation mit LPS nötig zu sein scheint, während dies bei den Versuchen in vivo nicht der Fall war. Hier sei die Vermutung erlaubt, dass im Organismus aufgrund der ständig stattfindenden Auseinandersetzung mit der potentiell pathogenen Umwelt immer ein gewisses Maß an „Grundaktivierung“ vorliegt.

4. Zytokin-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten

Die durchflusszytometrische Darstellung von intrazellulären Zytokinen bei gleichzeitiger Färbung spezifischer Oberflächenantigene ist eine relativ neue Methode, die

es erlaubt, die Verbindung zwischen detektiertem Zytokin und Zytokin-produzierender Zelle zweifelsfrei herzustellen. Sie ermöglicht daher auch die Identifikation von Subpopulationen Zytokin-produzierender Zellen ohne physikalische Separation derselben (Prussin et al., 1995; Vikingsson et al., 1994; Jung et al., 1993). Das Ausgangsmaterial kann Vollblut sein (Marshall et al., 1997), das mit Heparin oder Zitrat ungerinnbar gemacht wurde (Mascher et al., 1999). Es kann aber auch das Knochenmark als Ausgangsmaterial dienen (Tayebi et al., 1999). Bislang wurde vor allem die Zytokin-Produktion von Lymphozyten und Monozyten bzw. Makrophagen untersucht (Assenmacher et al., 1994). Zur Thematik der Doppelfärbung in neutrophilen Granulozyten beschreibt eine Publikation die Detektion sogenannter ANCAs (anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody), welche intrazellulär vorliegen (Yang et al., 1994).

Die Zytokin-Produktion von neutrophilen Granulozyten ist ein kontrovers diskutiertes Gebiet der Immunologie. An einem Ende des Spektrums steht die These, dass neutrophile Granulozyten mit der Ausnahme von IL-8 überhaupt nicht zur Produktion von Zytokinen fähig sind (Altstaedt et al., 1996). Am anderen Ende des Spektrums steht die Auffassung, nach der neutrophile Granulozyten eine Schlüsselrolle in der Modulation der Immunantwort durch differentielle Sekretion verschiedener Zytokine einnehmen (Cassatella, M. A., 1995). Tatsächlich erscheinen immer mehr Befunde zur Produktion von Zytokinen durch Neutrophile. Für folgende Zytokine gibt es mehr als einen publizierten Befund: IL-1 (Lloyd et al., 1992; Malyak et al., 1994), IL-1ra (Malyak et al., 1994; McColl et al., 1992), IL-6 (Lloyd et al., 1992; Melani et al., 1993), IL-8 (Strieter et al., 1992; Fujishima et al., 1993), IL-10 (Cassatella, M. A., 1998; Niiro et al., 1997), IL-12 (Bliss et al., 1999; Petrofsky et al., 1999), TGF- β (Grotendorst et al., 1989), TNF- α (Bazzoni et al., 1991; Haziot et al., 1993). Damit muss man sagen, dass die momentan vorherrschende wissenschaftliche Meinung eher die These ist, dass neutrophile Granulozyten zur Synthese sehr vieler Zytokine in der Lage sind.

Auch zur Regulation der Synthese gibt es eine ständig steigende Anzahl von Publikationen. Ähnlich wie bei den Adhäsionsmolekülen sind es sowohl physiologische als auch pathophysiologische Vorgänge, die als modulierende Faktoren beschrieben werden. RS-Viren sind in der Lage, die Produktion von IL-6 und IL-8 in neutrophilen Granulozyten zu stimulieren, obwohl sie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies inhibieren (Arnold et al., 1994). Auf die Stimulation mit Antigenen von

Toxoplasma gondii reagieren Neutrophile mit der Produktion von IL-12, TNF- α , MIP-1 α und MIP-1 β (Bliss et al., 1999), auf Stimulation mit einem Zellwandprotein von *Candida albicans* mit der Freisetzung von TNF- α und IL-6 (Torosantucci et al., 1997). Für das bakterielle Peptid fMLP ist sowohl eine stimulierende als auch eine inhibierende Wirkung beschrieben (Vulcano et al., 1998).

Die verwirrende Vielfalt der von Neutrophilen produzierten Zytokine kann in einem von Marco Cassatella (Cassatella, M. A., 1995) vorgeschlagenen Modell vereinfacht dargestellt werden: In einer Frühphase regt LPS neutrophile Granulozyten zur Produktion von TNF- α , IL-1 β und IL-8 an. Dadurch werden vermehrt neutrophile Granulozyten rekrutiert. Außerdem führen diese drei Zytokine über autokrine und parakrine Mechanismen zu einer anhaltenden Stimulation anwesender neutrophiler Granulozyten, die dadurch gegenüber einer erneuten LPS-Stimulation schon vorstimuliert sind. So kommt es in der Spätphase zur vorherrschenden Produktion großer Mengen von IL-8. Die Reaktion der Frühphase ist durch IL-10 inhibierbar. Andererseits resultiert die Anwesenheit von IFN- γ während der frühen LPS-Stimulation in einer späten IL-8-Produktion, die gegenüber der IL-8-Produktion nach alleiniger LPS-Stimulation noch erhöht ist. Also würde die Immunantwort von neutrophilen Granulozyten auf LPS-Stimulation davon abhängen, ob IFN- γ oder IL-10 das interstitielle Milieu beherrscht. IFN- γ gehört zum Zytokinmuster der T_H1-Zellen (IL-2, IFN- γ und Lymphotoxin), während IL-10 zum Zytokinmuster der T_H2-Zellen passt (IL-4, IL-5 und IL-10). Damit wäre dann die Aktivität neutrophiler Granulozyten (als Teil des unspezifischen Immunsystems) im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens noch enger mit der spezifischen Immunität verbunden als es bislang angenommen wurde. In dieser Sichtweise können Neutrophile dann nicht mehr nur als Teil des efferenten Schenkels der Immunantwort gesehen werden, sondern müssen als richtungsweisender Teil auch des afferenten Schenkels gelten.

In der vorliegenden Arbeit konnte nach LPS-Stimulation die Produktion von IL-8 in neutrophilen Granulozyten mittels fluoreszenzimmunologischer Doppelfärbung nachgewiesen werden, nicht aber die Produktion von TNF- α oder IL-6. Damit sind die Befunde konsistent mit dem Ergebnis von Altstaedt (Altstaedt et al., 1996) und der These, dass neutrophile Granulozyten ausschließlich IL-8 produzieren, widersprechen aber einer Vielzahl anderer Befunde (Cassatella, M. A., 1995). Die beobachteten Unterschiede lassen sich prinzipiell durch drei Gründe erklären.

Erstens ist die Funktionstüchtigkeit der angewandten Methode der zytoplasmatischen Doppelfärbung (Jung et al., 1993) für den Einsatz in neutrophilen Granulozyten noch nicht ausreichend belegt. Die erfolgreich durchgeführte Färbung von IL-8 spricht zwar sehr dafür, dass hierbei keine prinzipiellen Hindernisse existieren, eventuell spielen aber bei dem Nachweis anderer Zytokine zusätzliche, bisher nicht identifizierte Faktoren eine Rolle. Zu denken wäre beispielsweise an intrazellulär stattfindende Modifikationen auf Proteinebene, die die Spezifität der verwendeten Antikörper erst extrazellulär zur Geltung kommen lassen würden.

Zweitens basiert die überwiegende Mehrzahl der erhobenen Befunde auf Methoden, die zwar Zytokine sehr sensitiv nachzuweisen imstande sind, von ihrer Spezifität her gegenüber der Doppelfärbung aber weit zurückfallen. Wenn mit Kulturüberständen ein ELISA durchgeführt wird oder mit der mRNA aus Zell-Lysaten eine Northern-Analyse, so lässt sich nicht feststellen, ob die beobachteten Ergebnisse tatsächlich auf Neutrophile oder aber auf kontaminierende Zellen, in erster Linie auf Monozyten, zurückzuführen sind. Obwohl der Prozentsatz der kontaminierenden Monozyten meist unter einem Prozent liegt, kann diese Möglichkeit nicht komplett ausgeschlossen werden, da neutrophile Granulozyten im Verhältnis zu Monozyten und Makrophagen vermutlich nur sehr geringe Mengen von Zytokinen produzieren. Bei einem Mengenverhältnis des produzierten Produktes von 1:200 (nach Cassatella et al., 1995) kann schon eine Verunreinigung von weniger als 1 % für ein beobachtetes Ergebnis verantwortlich sein.

Drittens können exogene Faktoren wie die Kulturbedingungen oder die Dosis der LPS-Stimulation für die beobachteten Widersprüche ursächlich sein. In dieser Arbeit wurde für die Stimulation eine Dosis von 100 ng/ml LPS verwendet. Diese kann im Organismus unter seltenen Bedingungen noch auftreten. In anderen Publikationen wurde die Dosis teilweise bis auf 100 µg/ml erhöht (Mianji et al., 1996). Es bleibt fraglich, ob Effekte, die unter solchen Bedingungen beobachtet wurden, im humanen System von Bedeutung sein können.

Die Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit Katecholaminen ließ in dieser Arbeit keine Auswirkungen auf die Zytokin-Produktion erkennen. In der Literatur wird nach adrenerger Stimulation neutrophiler Granulozyten sowohl eine Hochregulation von TNF- α mRNA (Abraham et al., 1999) als auch eine Abregulation derselben berichtet (Bergmann et al., 1999). Bislang finden sich aber nur sehr wenig

publizierte Erkenntnisse zu dieser Thematik. In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass Adrenalin und Noradrenalin in der Lage sind, die Produktion von IL-1 zu inhibieren (Koff et al., 1986); allerdings handelte es sich bei den untersuchten Zellen um Monozyten und nicht um Neutrophile. Über die Modulation der IL-8-Produktion durch Katecholamine gibt es nur eine Veröffentlichung, in der β -adrenerge Stimulation die IL-8 Produktion verstärkt; diese Arbeit bezieht sich allerdings auch auf Monozyten (Kavelaars et al., 1997). Insofern lässt sich trotz der erwähnten Unsicherheiten, die sich vor allem durch Schwierigkeiten in der Methodik ergeben, postulieren, dass Katecholamine ihre immunmodulatorischen Effekte auf neutrophile Granulozyten hauptsächlich über veränderte Funktionsmerkmale wie Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, Chemotaxis und Phagozytose ausüben. Weiterhin bewirken sie eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen (Ergebnisse dieser Arbeit), aber vermutlich keine Modulation der Zytokin-Produktion.

5. Katecholamine und neutrophile Granulozyten

Die Kernpunkte der Wechselwirkungen zwischen Katecholaminen und neutrophilen Granulozyten sind Beobachtungen über ihre Funktionstüchtigkeit in Hinblick auf Phagozytose, Produktion von Sauerstoffradikalen und Chemotaxis. Adrenalin und Noradrenalin führen zu einer Verminderung der Produktion von Sauerstoffradikalen (Barnett et al., 1997) sowie zu verminderter Phagozytosefähigkeit und Chemotaxis, scheinen also neutrophile Granulozyten in ihrer Aktivität grundsätzlich zu hemmen (Wenisch et al., 1996). Dieser Effekt ist durch Adenosin potenziierbar (Bazzoni et al., 1991), die genauen Mechanismen hierfür sind aber noch unklar. Es gibt jedoch eine Reihe von relativ neuen Befunden, die dafür sprechen, dass die Suppression inflammatorischer Effekte von Neutrophilen über β -Adrenozeptoren und cAMP vermittelt wird (Tecoma et al., 1986; Weiss et al., 1996). Es gilt als gesichert, dass der second messenger cAMP in Neutrophilen vor allem inhibierend wirkt (Korchak et al., 1984; Daniels et al., 1993), was aber nur als grobe Richtung verstanden werden kann. Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration bewirkt z. B. generell eine herabgesetzte Chemotaxis, welche jedoch nur gegenüber ganz bestimmten Stimuli voll ausgeprägt ist (Harvath et al., 1991).

Auf der Rezeptorebene werden für beobachtete Effekte auf Leukozyten sowohl α -adrenerge (Abraham et al., 1999) als auch β -adrenerge (Landmann et al., 1992; Benschop et al., 1997) Mechanismen verantwortlich gemacht. Während die Rolle von cAMP als second messenger in neutrophilen Granulozyten allgemein als inhibitorisch beschrieben werden kann, ist dies für Kalzium anders. Die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit fMLP oder IL-8 führt zu einem deutlichen Konzentrationsanstieg von Kalzium, der auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte. Generell muss Kalzium in neutrophilen Granulozyten eher als stimulierender Botenstoff betrachtet werden (Schorr et al., 1999). So ist beispielsweise die IL-8-Produktion in polymorphkernigen Leukozyten von Kalzium abhängig (Kuhns et al., 1998), und für den Prozess der Migration sind Kalzium-Ionen unerlässlich (Kuijpers et al., 1992).

In dieser Arbeit konnte auf Stimulation mit Adrenalin oder Noradrenalin kein signifikanter Kalzium-Einstrom festgestellt werden. In ähnlich durchgeführten Experimenten an neutrophilen Granulozyten konnte von Tintinger et al. festgestellt werden, dass der Rückgang des durch klassische Stimuli induzierten Kalzium-Influx in neutrophile Granulozyten durch Adrenalin stimulierbar ist (Tintinger et al., 2001), die Konzentration von Kalzium-Ionen also schneller wieder auf den Ausgangswert zurückkehrt. Dies entspricht funktionell einer Hemmung des Botenstoffes Kalzium. Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse, dass weder Adrenalin noch Noradrenalin in der Lage sind, einen Kalzium-Influx in neutrophile Granulozyten zu induzieren, konnten bestätigt werden. Der Befund des ausbleibenden Ca^{2+} -Influx lässt sich mit einem erhöhten cAMP-Spiegel funktionell verknüpfen. Eine Erhöhung der Konzentration des prinzipiell inhibitorischen Botenstoffs cAMP zusammen mit einer gleichbleibenden Konzentration des prinzipiell stimulierenden Botenstoffs Ca^{2+} führt in der Gesamtheit der intrazellulären Vorgänge zu einer Inhibierung der Funktion von neutrophilen Granulozyten. Dazu passt auch die Beobachtung, dass Adrenalin in der Lage zu sein scheint, eine durch LPS ausgelöste Expression von CD54 zumindest teilweise zu antagonisieren. Die Wirkung von Adrenalin auf neutrophile Granulozyten wäre also eher antiinflammatorisch.

Mehrfach wurde als Antwort auf adrenerge Stimulation eine verminderte Adhärenz von Leukozyten an Endothelzellen beobachtet (Benschop et al., 1993; Carlson et al., 1996), die aber nicht auf eine veränderte Expression von LFA-1, VLA-4, ICAM-1 oder VCAM-1 zurückzuführen ist (Carlson et al., 1996). Möglicherweise ist dafür

eine verminderte Expression von L-Selektin auf Neutrophilen verantwortlich, wie sie nach der Applikation von Isoproterenol beobachtet werden kann (Mills et al., 1997). Maximale körperliche Anstrengung führt zur Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten, welche ebenfalls eine verminderte Expression von L-Selektin aufweisen (van Eeden et al., 1999). Ein möglicher Mechanismus für die durch Katecholamine verminderte Adhärenz wäre die Stimulation β -adrenerger Rezeptoren, die in einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cAMP resultiert (Gemsa et al., 1975; Derian et al., 1995). Ein erhöhter Level von cAMP geht in vorstimulierten Zellen mit einer verminderten Expression der Adhäsionsmoleküle Mac-1 (Bloemen et al., 1997), E-Selektin und VCAM-1 (Fortenberry et al., 1997) einher. Also könnte die Stimulation β -adrenerger Rezeptoren über den second messenger cAMP zu einer verminderten Expression von bestimmten Oberflächenproteinen, z. B. Mac-1 oder E-Selektin, und damit zu einer verminderten Adhärenz an das Endothel betroffener Organe führen. Allgemeiner ausgedrückt könnte die Stimulation adrenerger Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten zu einem veränderten Muster von Adhäsionsmolekülen führen, wodurch wiederum das Migrationsverhalten der Zellen beeinflusst werden könnte. Katecholamine könnten so ihre regulatorische Funktion auf die Verteilung von neutrophilen Granulozyten im Organismus ausüben.

Dieses Modell lässt sich auch auf die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse übertragen. Adrenalin war in der Lage, den intrazellulären Level von cAMP signifikant anzuheben. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (z. B. Tintinger et al., 2001). Gleichzeitig resultierte die Inkubation vorstimulierter neutrophiler Granulozyten mit Adrenalin in einer Inhibition der durch LPS induzierten erhöhten Expression von CD54. Um die Verknüpfung zwischen beiden Befunden herzustellen, müssten weitere Versuche unternommen werden, in denen ein Inhibitor des second messenger cAMP auch den Effekt von Adrenalin auf die Expression der Oberflächenproteine antagonisieren müsste.

Die gesteigerte Expression von CD44 und CD54 fügt sich nur schwer in dieses Bild. Es kann spekuliert werden, dass die lang anhaltende (mindestens zwölfstündige) Inkubation mit Adrenalin in der hohen Konzentration von 10^{-3} M in einer leichten α -adrenergen Stimulation resultieren könnte, die dann aktivierende Effekte auslösen würde. Dazu passen experimentelle Befunde, die in PMN nach Stimulation mit positiv inotropen Substanzen eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffradikale feststellten (Burns et al., 1997), was allerdings in einer Vielzahl von Experimenten

nicht bestätigt werden konnte (Wenisch et al., 1996; Davis et al., 1991; Bazzoni et al., 1991).

Bezüglich der Produktion von Zytokinen sind die in der Literatur beschriebenen Befunde extrem widersprüchlich. Hier wird nach adrenerger Stimulation sowohl eine Hochregulation von TNF- α mRNA (Abraham et al., 1999) als auch eine Abregulation derselben berichtet (Bergmann et al., 1999). Bezüglich IL-6 findet man nach submaximaler körperlicher Belastung zwar einen erhöhten Level, es ist aber offen, welche Zellpopulation hierfür hauptsächlich verantwortlich sein könnte. Dies mag auch daran liegen, dass die Zytokin-Produktion von Neutrophilen an sich noch ein strittiges Thema ist und genauerer Untersuchungen bedarf.

Alle beobachteten Effekte traten nur bei sehr hohen (suprapharmakologischen) Dosen von Adrenalin auf. Daher muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass möglicherweise Abbauprodukte des verwendeten Adrenalins eine Rolle spielen könnten. Auf der anderen Seite ist die Situation *in vivo* komplexer. Zellen in der näheren Umgebung sympathischer Nervenfasern sind einer bunten Mixtur von Neurotransmittern ausgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass beispielsweise Adenosin den Effekt von Katecholaminen auf neutrophile Granulozyten potenziert (Bazzoni et al., 1991). Daher ist es möglich, dass *in vivo* aufgrund der komplexen Rahmenbedingungen bereits wesentlich niedrigere Konzentrationen von Katecholaminen ausreichen, um signifikante Effekte auf Zielzellen hervorzurufen.

Zusammenfassend wäre Adrenalin also in der Lage, je nach Aktivitätsgrad der Zielzelle, neutrophile Granulozyten entweder in ihrer Aktivität zu hemmen und überschießende Reaktionen zu verhindern (verminderte CD54-Expression auf vorstimulierten Neutrophilen, erhöhte cAMP-Konzentration, gleichbleibende Ca²⁺-Konzentration) oder eine moderate Erhöhung der Aktivität herbeizuführen (erhöhte CD44- und CD54-Konzentration auf unstimulierten neutrophilen Granulozyten), um eine Entzündungsreaktion erst in Gang zu bringen und die Migration neutrophiler Granulozyten in betroffene Gewebe zu erleichtern.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden unstimulierte und vorstimulierte neutrophile Granulozyten aus dem Blut gesunder Spender mit Adrenalin und Noradrenalin inkubiert. Auf der Ebene der Signaltransduktion adrenerger Rezeptoren wurden die intrazelluläre cAMP-Konzentration und der Kalzium-Influx nach Inkubation mit Adrenalin gemessen. Außerdem wurde die Expression der drei Adhäsionsmoleküle CD15, CD44 und CD54 (ICAM-1) sowie die Produktion der drei Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α untersucht.

Auf der intrazellulären Ebene induzierte Adrenalin eine Erhöhung der Konzentration des second messenger cAMP und keine signifikante Veränderung der Konzentration freier Ca²⁺-Ionen. Dies könnte als Hinweis gedeutet werden, dass β -Adrenozeptoren auf neutrophilen Granulozyten vorhanden und funktionell aktiv sind, nachgewiesene α -Adrenozeptoren jedoch eher von untergeordneter Bedeutung sind. Da in Neutrophilen Ca²⁺ als proinflammatorisch und cAMP als antiinflammatorisch gilt, sind diese beiden Ergebnisse untereinander stringent. Sie fügen sich gut in den wissenschaftlichen Kontext, in dem Adrenalin auf neutrophile Granulozyten eher einen inhibierenden als einen stimulierenden Einfluss ausübt.

Nach LPS-Stimulation konnte eine Hochregulation aller untersuchten Oberflächenproteine sowie eine Neosynthese des CXC-Chemokins IL-8 festgestellt werden, letzteres mit Hilfe einer fluoreszenzimmunologischen Doppelfärbung. Die erhöhte Expression der drei untersuchten Adhäsionsmoleküle kann als proinflammatorisches Ereignis im Rahmen der Immunantwort gesehen werden, denn sie erleichtert das Übertreten von neutrophilen Granulozyten in infizierte Gewebe. Auch die Produktion von IL-8 durch Neutrophile lässt sich als proinflammatorisches Geschehen interpretieren, da IL-8 als CXC-Chemokin in der Lage ist, weitere polymorphkernige Leukozyten zu rekrutieren. In der Anfangsphase einer Immunantwort ist ein solcher positiver Feedback-Mechanismus physiologisch durchaus „sinnvoll“.

Adrenalin in sehr hoher Dosis bewirkte eine leichte Stimulation der Expression von CD44. Da CD44 für den Vorgang der Phagozytose unerlässlich ist, kann dies als ein die Phagozytose stimulierender Effekt gesehen werden. Auch die Expression von CD54 ließ sich durch Adrenalin in hoher Konzentration nach 12-stündiger Inkubation stimulieren. Man könnte vermuten, dass die erhöhte Expression von CD54

durch Adrenalin den Übertritt neutrophiler Granulozyten aus der Blutbahn in das Interstitium erleichtert, und dass dies nur an Orten inflammatorischer Vorgänge relevant ist, da dort hohe Konzentrationen von Adrenalin herrschen können.

Die Inkubation LPS-stimulierter neutrophiler Granulozyten führte zu einer leichten Inhibition der Expression von CD54. Dies könnte im Rahmen einer systemisch-inflammatorischen Reaktion LPS-stimulierte neutrophile Granulozyten davor bewahren zu verklumpen. Hier kann auch allgemein ein hemmender Effekt von Adrenalin auf bereits vorstimulierte Neutrophile postuliert werden, der eine überschießende Entzündungsreaktion verhindern würde.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass β -Adrenozeptoren auf neutrophilen Granulozyten vorhanden und funktionell aktiv sind. Es kann vermutet werden, dass das Muster der Adhäsionsmoleküle auf neutrophilen Granulozyten und damit deren Migrationsverhalten durch Adrenalin reguliert wird, und zwar abhängig vom Grad der Aktivität der Zelle. Vorstimulierte Zellen würden eher gehemmt und unstimulierte Zellen eher aktiviert. Mit diesen Ergebnissen leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum Thema der Regulation von neutrophilen Granulozyten durch LPS und Katecholamine.

VI. Anhang

1. Literaturverzeichnis

Abbas, A., Lichtman, A., Pober, J. (1994). Cellular and Molecular Immunology. 2. Auflage. WB Saunders Company, Philadelphia.

Abraham, E., Kaneko, D. J., Shenkar, R. (1999). Effects of endogenous and exogenous catecholamines on LPS-induced neutrophil trafficking and activation. *Am. J. Physiol.* 276: L1-L8

Abramson, J. S., Wheeler J. (1993). The Neutrophil. 1st edition. Oxford University Press, Oxford.

Ader, R., Cohen, N. (1993). Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. *Ann. Rev. Psychol.* 44: 53-85

Altstaedt, J., Kirchner, H., Rink, L. (1996). Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology* 89: 563-568

Antal-Szalmas, P., Strijp, J. A., Weersink, A. J., Verhoef, J., van Kessel, K. P. (1997). Quantification of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 61: 721-728

Arnold, R., Werner, F., Humbert, B., Werchau, H., König, W. (1994). Effect of respiratory syncytial virus-antibody complexes on cytokine (IL-8, IL-6, TNF- α) release and respiratory burst in human neutrophils. *Immunol.* 82: 184-191

Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B., Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.* 61: 1303-1313

Asman, B., Strand, V., Bylin, G., Bergström, K. (1997) Peripheral neutrophils after allergic asthmatic reactions. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 27: 185-188

Assenmacher, M., Schmitz, J., Radbruch, A. (1994). Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: Expression of interleukin-10 in interferon- γ and in interleukin-4-expressing cells. *Eur. J. Immunol.* 24: 1097-1101

Athens, J. W., Raab, S. O., Haab, O. P., Mauer, A. M., Ashenbrucker, H., Cartwright, G. E., Wintrobe, M. M. (1961). Total blood, circulating and marginated granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J. Clin. Invest.* 40: 989-995

Bachen, E. A., Manuck, S. B., Marsland, A. L., Cohen, S., Malkoff, S. B., Muldoon, M. F., Rabin, B. S. (1992). Lymphocyte subset and cellular immune responses to a brief experimental stressor. *Psychosom. Med.* 54: 673-679

Baerwald, C., Graefe, C., von Wichert, P., Krause, A. (1992). Decreased density of beta-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 19: 204-210

Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55: 97-179

Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1997). Human chemokines: an update. *Ann. Rev. Immunol.* 15: 675-705

Barnett, C. C., Moore, E. E., Partrick, D. A., Silliman, C. C. (1997). β -adrenergic stimulation down-regulates neutrophil priming for superoxide generation, but not for elastase release. *J. Surg. Res.* 70: 166-170

Bazan, J. F., Bacon, K. B., Hardiman, G., Wang, G., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D. R., Zlotnik, A., Schall, T. J. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385: 640-644

Bazzoni, G., Dejana, E., Del Maschio, A. (1991). Adrenergic modulation of human polymorphnuclear leukocyte activation. Potentiating effect of adenosine. *Blood* 77: 2042-2048.

Benschop, R. J., Jacobs, R., Sommer, B., Schürmeyer, T. H., Schmidt, R. E., Schedlowski, M. (1996 a). Modulation of the immunologic response to acute stress in humans by beta-blockade or benzodiazepines. *FASEB J.* 10: 517-524

Benschop, R. J., Nieuwenhuis, E. E., Tromp, E. A., Godaert, G. L., Ballieux, R. E., van Doornen, L. J. (1994). Effects of β -adrenergic blockade on immunologic and cardiovascular changes induced by mental stress. *Circulation* 89: 762-769

- Benschop, R. J., Rodriguez-Feuerhahn, M., Schedlowski, M.** (1996 b). Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain Behav. Immun.* 10(2): 77-91
- Benschop, R. J., Schedlowski, M., Wienecke, H., Jacobs, R., Schmidt, R. E.** (1997). Adrenergic control of natural killer cell circulation and adhesion. *Brain Behav. Immun.* 11: 321-332
- Bergmann, M., Gornikiewicz, A., Sautner, T., Waldmann, E., Weber, T., Mittlbock, M., Roth, E., Fugger, R.** (1999). Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. *Shock* 12: 421-427
- Berkow, R. L., Wang, D., Larrick, J. W., Dodson, R. W., Howard, T. H.** (1987). Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 139: 3783-3791
- Besedovsky, H. O., del Rey, A.** (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Rev.* 17: 64-102
- Bevilacqua, M.P.** (1993). Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 767-804
- Biermann, H. R., Kelley, K. H., Cordes, F. L., Byron, R. L., Polhemus, J. A., Rappaport, S.** (1952). The release of leukocytes and platelets from the pulmonary circulation by epinephrine. *Blood* 7: 683-692
- Bliss, S. K., Marshall, A. J., Zhang, Y., Denkers, E. Y.** (1999). Human polymorphnuclear leukocytes produce IL-12, TNF- α , and the chemokines Macrophage-Inflammatory Protein-1 α and -1 β to *Toxoplasma gondii* antigens. *J. Immunol.* 162: 7369-7375
- Bloemen, P. G., van den Tweel, M. C., Henricks, P. A., Engels, F., Kester, M. H., van de Loss, P. G., Blomjous, F. J., Nijkamp, F. P.** (1997). Increased cAMP levels in stimulated neutrophils inhibit their adhesion to human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 272: L580-L587

- Bokoch, G. M.** (1987). The presence of free G-protein beta/gamma subunits in human neutrophils results in suppression of adenylate cyclase activity. *J. Biol. Chem.* 262: 589-594
- Bond, A., Hay, F. C.** (1997). L-selectin expression on the surface of peripheral blood leukocytes from rheumatoid arthritis patients is linked to disease activity. *Scand. J. Immunol.* 46: 312-316
- Boyum, A.** (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scan. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 21: 77-89
- Brandt, E., Müller-Alouf, H., Desreumaux, P., Woerly, G., Colombel, J., Capron, M.** (1998). Circulating growth-regulated oncogene α contributes to neutrophil priming and interleukin-8-directed mucosal recruitment into chronic lesions of patients with Crohn's disease. *Eur. Cytokine Netw.* 9: 647-653
- Burns, A. M., Keogan, M., Donaldson, M., Brown, D. L., Park, G. R.** (1997). Effects of inotropes on human leukocyte numbers, neutrophil function and lymphocyte subtypes. *Br. J Anaesth.* 78: 530-535
- Butcher, E. C.** (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67: 1033-1036
- Campanero, M. R., Pulido, R., Alonso, J. L.** (1991). Down-regulation by tumor necrosis factor- α of neutrophil cell surface expression of the sialophorin CD43 and the hyaluronate receptor CD44 through a proteolytic mechanism. *Eur. J. Immunol.* 21: 3045-3048
- Carlos, T. M., Harlan, J. M.** (1995). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101
- Carlson, S. L., Beiting, D J., Kiani, C. A., Abell, K. M., McGillis, J. P.** (1996). Catecholamines decrease lymphocyte adhesion to cytokine-activated endothelial cells. *Brain Behav. Immun.* 10: 55-67

- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B.** (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72: 3666-3670
- Carulli, G.** (1996). Applications of flow cytometry in the study of human neutrophil biology and pathology. *Hematopathol. Mol. Hematol.* 10: 39-61
- Cassatella, M. A.** (1995). The production of cytokines by polymorphnuclear neutrophils. *Immunol. Today* 16: 21-26
- Cassatella, M. A.** (1998). The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 28: 148-161
- Cassatella, M. A., Bazzoni, F., Ceska, M., Ferro, I., Baggiolini, M., Berton, G.** (1992). IL-8 production by human polymorphnuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway. *J. Immunol.* 148: 3216-3220
- Catalina, M. D., Estess, P., Siegelman, M. H.** (1999). Selective requirements for leukocyte adhesion molecules in models of acute and chronic cutaneous inflammation: participation of E- and P- but not L-selectin. *Blood* 93: 580-589
- Cobbold, P. H., Rink, T. J.** (1987). Fluorescence and bioluminescence of cytoplasmic free Calcium. *Biochem. J.* 248: 313-328
- Crary, B., Hauser, S. L., Borysenko, M., Kutz, I., Hoban, C., Ault, K. A., Weiner, H. L., Benson, H.** (1983). Epinephrine-induced changes in the distribution of lymphocyte subsets in peripheral blood of humans. *J. Immunol.* 131: 1178-1181
- Daniels, R. H., Bird, I N., Hill, M. E., Finnen, M. J.** (1993). Differential regulation of early phase and late phase responses in human neutrophils by cAMP. *Biochem. Pharmacol.* 45: 1613-
- Davis, J. M., Albert, J. D., Tracy, K. J., Calvano, S. E., Lowry, S. F., Shires, G. T., Yurt, R. W.** (1991). Increased neutrophil mobilization and decreased chemotaxis during cortisol and epinephrine infusions. *J. Trauma* 31: 725-731

DeGrendele, H. C., Estess, P., Picker, I. J., Siegelmann, M. H. (1996). CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: A novel lymphocyte/endothelial cell primary adhesion pathway. *J. Exp. Med.* 183: 1119-

Derian, C. K., Santulli, R. J., Rao, P. E., Solomon, H. F., Barrett, J. A. (1995). Inhibition of chemotactic peptide-induced neutrophil adhesion to vascular endothelium by cAMP modulators. *J. Immunol.* 154: 308-317

Diacovo, T. G., Roth, S. J., Buccola, J. M., Bainton, D. F., Springer, T. A. (1996). Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood* 88: 146-157

Dong, Z. M., Murphy, J. W. (1996). Cryptococcal polysaccharides induce L-selectin shedding and tumor necrosis factor receptor loss from the surface of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 97: 689-698

Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A., Springer, T. A. (1986). Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 137: 245-253

Elson, L. H., Nutman, T. B., Metcalfe, D. D., Prussin, C. (1995). Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4⁺CD27⁻ lymphocyte subpopulation. *J. Immunol.* 154: 4294-4301

Fadlon, E., Vordermeier, S., Pearson, T. C., Mire-Sluis, A. R., Dumonde, D. C., Phillips, J., Fishlock, K., Brown, K. A. (1998). Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood* 91: 266-274

Farris, E. J. (1938). Increase in lymphocytes in healthy persons under certain emotional states. *Am. J. Anat.* 63: 297-323

Felten, S. Y., Felten, D. L. (1994). Neural-immune interactions. *Prog. Brain Res.* 100: 157-162

Figdor, C. G., Leemans, J. M., Bont, W. S., de Vries, J. E. (1983). Theory and practice of centrifugal elutriation (CE). Factors influencing the separation of human blood cells. *Cell. Biophys.* 5: 105-118

Fortenberry, J. D., Huber, A. R., Owens, M. L. (1997). Inotropes inhibit endothelial cell surface adhesion molecules induced by interleukin-1beta. *Crit. Care Med.* 25: 303-308

Fujishima, S., Hoffmann, A. R., Vu, T., Kim, K. J., Zheng, H., Daniel, D., Kim, Y., Wallace, E. F., Larrick, J. W., Raffin, T. A. (1993). Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF-alpha, and IL-1 beta. *J. Cell Physiol.* 154: 478-485

Galant, S. P., Allred, S. (1981). Binding and functional characteristics of beta adrenergic receptors in the intact neutrophil. *J. Lab. Clin. Med.* 98: 227-237

Galant, S. P., Duriseti, L., Underwood, S., Insel, P. A. (1978). Decreased beta-adrenergic receptors on polymorphonuclear leukocytes after adrenergic therapy. *N. Engl. J. Med.* 299: 933-936

Gemsa, D., Kalten J. R., Resch, K. (Hrsg.) (1997). Immunologie. 4. neubearbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Gemsa, D., Steggemann, L., Menzel, J., Till, G. (1975). Release of cyclic AMP from macrophages by stimulation with prostaglandins. *J. Immunol.* 114: 1422-1424

Gonzalez-Alvaro, I., Carmona, L., Diaz-Gonzalez, F., Gonzalez-Amaro, R., Mollinedo, R., Sanchez-Madrid, F., Laffon, A., Garcia-Vicuna, R. (1996). Aceclofenac, a new nonsteroidal antiinflammatory drug, decreases the expression and function of some adhesion molecules on human neutrophils. *J. Rheumatol.* 23: 723-729

Grabske, R. J., Lake, S., Gledhill, B. L. (1975). Centrifugal elutriation: separation of spermatogonic cells on the basis of sedimentation velocity. *J. Cell. Physiol.* 86: 177-189

- Grotendorst, G. R., Smale, G., Pancev, D.** (1989). Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J. Cell. Physiol.* 154: 396-402
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y.** (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450
- Hammond, M. E., Lapointe, G. R., Feucht, P. H., Hilt, S., Gallegos, C. A., Gordon, C. A., Giedlin, M. A., Mullenbach, G., Tekamp-Olson, P.** (1995) IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J. Immunol.* 155: 1428-1433
- Hart, S. P., Dougherty, G. J., Haslett, C., Dransfield, I.** (1997). CD44 regulates phagocytosis of apoptotic neutrophil granulocytes, but not apoptotic lymphocytes, by human macrophages. *J. Immunol.* 159: 919-925
- Harvath, L., Robbins, J. D., Russell, A. A., Seamon, K. B.** (1991). cAMP and human neutrophil chemotaxis. Elevation of cAMP differentially affects chemotactic responsiveness. *J. Immunol.* 146: 224-232
- Hayes, P. J., Miao, Y. M., Gotch, F. M., Gazzard, B. G.** (1999). Alterations in blood leukocyte adhesion molecule profiles in HIV-1 infection. *Clin. Exp. Immunol.* 117: 331-334
- Haynes, B. F., Hale, L. P., Patton, K. L., Martin, M. E., McCallum, R. M.** (1991). Measurement of an adhesion molecule as an indicator of inflammatory disease activity. Up-regulation of the receptor for hyaluronate (CD44) in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 34: 1434-1443
- Haziot, A., Tsuberi, B. Z., Goyert, S. M.** (1993). Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 150: 5556-5565
- Hogg, N., Landis, R. C.** (1993). Adhesion molecules in cell interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 383-390

- Höglund, M., Hakansson, L., Veng, P.** (1997). Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil functions in healthy volunteers. *Eur. J. Haematol.* 58: 195-202
- Janeway, C. A., Travers, P.** (1997). Immunologie. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Jänig, W.** in **Schmidt, R. F., Thews, G.** (Hrsg.) (1995). Physiologie des Menschen. 26. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Jiang, Y., Beller, D. I., Frenzl, G., Graves, D. T.** (1992). Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* 148: 2423-2428
- Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C., Rieger, C.** (1993). Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 159: 197-207
- Kalmar, J. R., Arnold, R. R., Warbington, M. L., Gardner, M. K.** (1988). Superior leukocyte separation with a discontinuous one-step Ficoll-Hypaque gradient for the isolation of human neutrophils. *J. Immunol. Meth.* 110: 275-281
- Kamochi, M., Kamochi, F., Kim, Y. B., Sawh, S., Sanders, J. M., Sarembock, I., Green, S., Young, J. S., Ley, K., Fu, S. M., Rose, C. E.** (1999). P-selectin and ICAM-1 mediate endotoxin-induced neutrophil recruitment and injury to the lung and liver. *Am. J. Physiol.* 277: L310-L319
- Kasahara, K., Strieter, R. M., Chensue, S. N., Standiford, T. J., Kunkel, S. L.** (1991). Mononuclear cell adherence induces neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 gene expression. *J. Leukocyte Biol.* 50: 287-295
- Kaufmann, A.** (1998). Differentielle Induktion der Chemokin- und Zytokinsynthese und funktionelle Veränderungen der Chemokinrezeptorexpression in humanen Monozyten und Makrophagen durch bakterielle Moduline, Influenza A-Virus und Virosomen, Dissertation.
- Kavelaars, A., van de Pol, M., Zijlstra, J., Heijnen, C. J.** (1997). Beta 2-adrenergic activation enhances interleukin-8 production by human monocytes. *J. Neuroimmunol.* 77: 211-216

Kelner, G. S., Kennedy, J., Bacon, K. B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D. A., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Bazan, J. F., Moore, K. W., Schall, T. J., Zlotnik, A. (1994). Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266: 1395-1399

Koff WC, Fann AV, Dunegan MA, Lachman LB. (1986). Catecholamine-induced suppression of interleukin-1 production. *Lymphokine Res.* 5(4): 239-247

Kopin, I. J. in **Trendelenburg, U., Weiner, N.** (Hrsg.) (1988). Catecholamines II. Handbook of Experimental Pharmacology Bd. 90/II, pp.211-275 mit Ergänzungen. Springer Verlag, Heidelberg.

Korchak, M., Vienne, K., Rutherford, L. E., Weissmann, G. (1984). Neutrophils stimulation: receptor, membrane, and metabolic events. *Federation Proc.* 43: 2749-2754

Krause, A., Steitz, A., von Wichert, P., Baerwald, C. (1995). Influence of cytokines on the density of beta 2-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Cytokine* 7: 273-276

Kuhns, D. B., Young, H.A., Gallin, E. K., Gallin, J. I. (1998). Ca²⁺-dependent production and release of IL-8 in human neutrophils. *J. Immunol.* 161: 4332-4339

Kuijpers, T. W., Hakkert, B. C., Hart, M. H., Roos, D. (1992). Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8. *J. Cell. Biol.* 117: 565-572

Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Lindley, I.J., Westwick, J. (1995). Chemokines: new ligands, receptors and activities. *Immunol. Today* 16: 559-561

Landmann, R. (1992). Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulations. *Eur. J. Clin. Invest.* 22: 30-36

Liao, F., Rabin, R. L., Yannelli, J. R., Koniaris, L. G., Vanguri, P., Farber, J. M. (1995). Human Mig chemokine: biochemical and functional characterisation. *J. Exp. Med.* 182: 1301-1314

Lindley, I. J. D., Westwick, J., Kunkel, S. L. (1993). Nomenclature announcement-the chemokines. *Immunol. Today* 14: 24

- Lloyd, A. R., Oppenheim, J. J.** (1992). Poly's lament: the neglected role of the polymorphnuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol. Today* 13:169-172
- Lo, S. K., Detmers, P. A., Levin, S. M., Wright, S. D.** (1989). Transient adhesion of neutrophils to endothelium. *J. Exp. Med.* 169: 1779-1793
- Löffler, G., Petrides, P. E.** (1997). *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Lötzerich, H., Uhlenbruck, G.** in **Weiß, M., Rieder, H.** (Hrsg.) (1991). S. 117-143 in *Sportmedizinische Forschung*, Springer Verlag, Berlin.
- Madden, K. S., Felten, D. L.** (1995). Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol. Rev.* 75: 77-106
- Maeyama, K., Sasaki, M., Watanabe, T.** (1991). Simultaneous determination of intracellular Calcium concentration and histamine secretion in rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3). *Anal. Biochem.* 194: 316-325
- Maisel, A. S., Fowler, P., Rearden, A., Motulsky, H. J., Michel, M. C.** (1989). A new method for isolation of human lymphocyte subsets reveals differential regulation of β -adrenergic receptors by terbutaline treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.* 46: 429-439
- Malyak, M., Smith, M. F., Abel, A. A., Arend, W. P.** (1994). *J. Clin. Immunol.* 14: 20-30
- Marshall, C., Gray, L., Lambert, D., Shenton, B., Plusa, S. M., Kirby, J. A.** (1997). A novel flow-cytometric assay to assess neutrophil adhesion in whole blood. *Biochem. Soc. Trans.* 25: 740-743
- Masat, T., Feliu, E., Villamor, N., Castellsague, J., Ordi, J., Fabregues, M., Rozman, C.** (1997). Immunophenotypic and ultrastuctual study in peripheral blood neutrophil granulocytes following bone marrow transplantation. *Brit. J. Haematol.* 98: 299-307

- Mascher, B., Schlenke, P., Seyfarth, M.** (1999). Expression and kinetics of cytokines determined by intracellular staining using flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 223: 115-121
- McColl, S. R., Paquin, R., Menard, C., Beaulieu, A. D.** (1992). Human neutrophils produce high level of the interleukin 1 receptor antagonist in response to granulocyte/macrophage colony stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 176: 593-598
- Melani, C., Mattia, G. F., Silvani, A.** (1993). Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil blood granulocytes. *Blood* 81: 2744-2749
- Mianji, S., Hamasaki, Y., Yamamoto, S., Miyazaki, S.** (1996). Inhibition by dexamethasone of the lipopolysaccharide-induced increase in IL-6 mRNA abundance and IL-6 production in human polymorphnuclear leukocytes. *Int. J. Immunopharmac.* 18: 339-346
- Mills, J. M., Karnik, R. S., Dillon E.** (1997). L-Selectin expression affects T-Cell circulation following isoproterenol infusion in humans. *Brain Behav. Immun.* 11: 333-342
- Moffat, F. L., Han, T., Li, Z. M., Peck, M. D., Falk, R. E., Spalding, P. B., Jy, W., Ahn, Y. S., Chu, A. J., Bourguignon, L. Y.** (1996). Involvement of CD44 and the cytoskeletal linker protein Ankyrin in human neutrophil bacterial phagocytosis. *J. Cell. Physiol.* 168: 638-647
- Mollenhauer, H. H., Morr e, D. J., Rowe, L. D.,** (1990). Alteration of intracellular traffic by monensin: mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochimica et Biophysicy Acta* 1031: 225-
- Mollinedo, F., Martin-Martin, W., Gajate, C., Lazo, P. A.** (1998). Physiological activation of human neutrophils down-regulates CD53 cell surface antigen. *J. Leuk. Biol.* 63: 699-706
- Nagaoka, T., Kaburagi, Y., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Takehara, K., Steeber, D. A., Tedder, T. F., Sato, S.** (2000). Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression. *Am. J. Pathol.* 157: 237-247

Naliboff, B. D., Benton, D., Solomon, G. F., Morley, J. E., Fahey, J. L., Bloom, E. T., Makinodan, T., Gilmore, S. L. (1991). Immunological changes in young and old adults during brief laboratory stress. *Psychosom. Med.* 53: 121-132

Niuro, H., Otsuka, T., Izuhara, K., Yamaoka, K., Ohshima, K., Tanabe, T., Hara, S., Nemoto, Y., Tanaka, Y., Nakashima, H., Niho, Y. (1997). Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood* 89: 1621-

Oehler, L., Majdic, O., Pickl, W. F., Stöckl, J., Riedl, W., Drach, J., Rappersberger, K., Geissler, K., Knapp, W. (1998). Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *J. Exp. Med.* 187: 1019-1028

Ortega, E., Collazos, M. E., Maynar, M., Barriga, C., De la Fuente, M. (1993). Stimulation of the phagocytic function of neutrophils in sedentary men after acute exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 66: 60-64

Ottaway, C. A., Husband, A. J. (1994). The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol. Today* 15: 511-517

Pan, Y., Lloyd, C., Zhou, H., Dolich, S., Deeds, J., Gonzalo, J. A., Vath, J., Gosselin, M., Ma, J., Dussault, B., Woolf, E., Alperin, G., Culpepper, J., Gutierrez-Ramos, J. C., Gearing, D. (1997). Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387: 611-617

Paul, I., William, E. (Hrsg.) (1993). *Fundamental Immunology*. 3. Auflage. Raven Press, New York.

Pericle, F., Sconocchia, G., Titus, J. A., Segal, D. M. (1996). CD44 is a cytotoxic triggering molecule on human polymorphonuclear cells. *J. Immunol.* 157: 4657-4663

Petrofsky, M., Bermudez, L. E. (1999). Neutrophils from *Mycobacterium avium*-infected mice produce TNF- α , IL-12, and IL-1 β and have a putative role in early host response. *Clin. Immunol.* 91: 354-358

- Prussin, C., Metcalfe, D.** (1995). Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J. Immunol. Meth.* 188: 117-128
- Rainer, T. H., Lam, N., Cocks, R. A.** (1999). Adrenaline upregulates monocyte L-selectin in vitro. *Resuscitation.* 43: 47-55
- Rehman, J., Mills, P. J., Carter, S. M., Chou, J., Thomas, J., Maisel, A. S.** (1997). Dynamic exercise leads to an increase in circulating ICAM-1: further evidence for adrenergic modulation of cell adhesion. *Brain Behav. Immun.* 11: 343-351
- Ritchie, A. W. S., Gray, R. A., Micklem, H. S.** (1983). Right angle light scatter: a necessary parameter in flow cytofluorimetric analysis of human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol. Meth.* 64: 109-117
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D.** (1987). Lehrbuch der Immunologie. 1. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Rollins, B. J., Walz, A., Baggiolini, M.** (1991). Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, Calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 78: 1112-1116
- Rossi, D., Zlotnik, A.** (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 217-242
- Schall, T. J., Bacon, K., Toy, K. J., Goeddel, D. V.** (1990). Selective attraction of monocyte and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347: 669-671
- Schedlowski, M., Hosch, W., Oberbeck, R., Jetschmann, J. U., Benschop, R. J., Jacobs, R., Raab, H. R., Schmidt, R. E.** (1996). Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta 2-adrenergic mechanisms. *J. Immunol.* 156: 93-99
- Schorr, W., Swandulla, D., Zeilhofer, H. U.** (1999). Mechanisms of IL-8-induced Ca²⁺ signaling in human neutrophil granulocytes. *Eur. J. Immunol.* 29: 897-904

Schröder, J. M., Mrowietz, U., Morita, E., Christophers, E. (1987). Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J. Immunol.* 139: 3474-3483

Silvestri, M., Oddera, S., Lantero, S., Rossi, G. A. (1999). Beta 2-agonist-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is not associated with modification of LFA-1 and Mac-1 expression or with impairment of polymorphnuclear leukocyte antibacterial activity. *Respir. Med.* 93: 416-423

Spiekermann, K., Emmendoerffer, A., Elsner, J., Raeder, E., Lohmann-Matthes, M. L., Prahst, A., Link, H., Freund, M., Welte, K., Roesler, J. (1994). Altered surface marker expression and function of G-CSF-induced neutrophils from test subjects and patients under chemotherapy. *Br. J. Haematol.* 87: 31-38

Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314

Strausbaugh, H. J., Green, P. G., Lo, E., Tangemann, K., Reichling, D. B., Rosen, S. D., Levine, J. D. (1999). Painful stimulation suppresses joint inflammation by inducing shedding of L-selectin from neutrophils. *Nature Med.* 5: 1057-1061

Strieter, R. M., Kasahara, K., Allen, R. M., Standiford, T. J., Rolfe, M. W., Becker, F. S., Chensue, S. W., Kunkel, S. L. (1992). Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8. *Am. J. Pathol.* 141: 397-407

Tartakoff, A. M. (1983). Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell* 32: 1026-1028

Taub, D. D., Oppenheim, J. J. (1993). Review of the chemokine meeting the Third International Symposium of Chemotactic Cytokines. *Cytokine* 5: 175-179

Tayebi, H., Lienard, A., Billot, M., Tiberghien, P., Herve, P., Robinet, E. (1999). Detection of intracellular cytokines in citrated whole blood or marrow samples by flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 229: 121-130

- Tecoma, E. S., Motulsky, H. J., Traynor, A. E., Omann, G. M., Muller, H., Sklar, L. A.** (1986). Transient catecholamine modulation of neutrophil activation: kinetic and intracellular aspects of isoproterenol action. *J. Leukoc. Biol.* 40: 629-644
- Tintinger, G. R., Theron, A. J., Anderson, R., Ker, J. A.** (2001). The anti-inflammatory interactions of epinephrine with human neutrophils in vitro are achieved by cyclic AMP-mediated accelerated resequestration of cytosolic calcium. *Biochem. Pharmacol.* 61: 1319-1328
- Tonetti, M. S., Imboden, M. A., Lang, N. P.** (1998). Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J. Periodontol.* 69: 1139-1147
- Torosantucci, A., Chiani, P., Quinti, I., Ausiello, C. M., Mezzaroma, I., Cassone, A.** (1997). Responsiveness of human polymorphonuclear cells (PMNL) to stimulation by a mannoprotein fraction (MP-F2) of *Candida albicans*: enhanced production of IL-6 and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) by MP-F2-stimulated PMNL from HIV-infected subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 107: 451-457
- Tsien, R. Y.** (1981). A non-disruptive technique for loading Calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 920: 527-528
- Uggucioni, M., Loetscher, P., Forssmann, U., Dewald, B., Li, H., Lima, S. H., Li, Y., Kreider, B., Garotta, G., Thelen, M., Baggiolini, M.** (1996). Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. *J. Exp. Med.* 183: 2379-2384
- Van Eeden, S. F., Granton, J., Hards, J. M., Moore, B., Hogg, J. C.** (1999). Expression of the cell adhesion molecules on leukocytes that demarginate during acute maximal exercise. *J. Appl. Physiol.* 86: 970-976
- Vartdal, F., Gaudernack, G., Ugelstad, J., Kvalheim, G., Lea, T., Bosnes, V., Albrechtsen, D.** (1987). Depletion of T lymphocytes from human bone marrow. Use of magnetic monosized polymer microspheres coated with T-lymphocyte-specific monoclonal antibodies. *Transplantation* 43: 366-371

Vikingsson, A., Pederson, K., Muller, D. (1994). Enumeration of IFN- γ producing lymphocytes by flow cytometry and correlation with quantitative measurement of IFN- γ . *J. Immunol. Meth.* 173: 219-228

Vulcano, M., Rosa, M. F., Minnucci, F. S., Chernavsky, A. C., Isturiz, M. A. (1998). N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) inhibits tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) production on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human neutrophils. *Clin. Exp. Immunol.* 113: 39-47

Wahle, M., Krause, A., Ulrichs, T., Jonas, D., von Wichert, P., Burmester, G. R., Baerwald, C. G. (1999). Disease activity related catecholamine response of lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 876: 287-296

Wahle, M., Stachetzki, U., Krause, A., Pierer, M., Hänztschel, H., Baerwald, C. G. (2001). Regulation of beta2-adrenergic receptors on CD4 and CD8 positive lymphocytes by cytokines in vitro. *Cytokine.* 16: 205-209

Walz, A., Baggiolini, M. (1990). Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein or connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases. *J. Exp. Med.* 171: 449-454

Wang, H. W., Sexton, D. M., Redmont, H. P., Watson, R. W., Croke, D. T., Bouchier-Hayes, D. (1997). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is expressed on human neutrophils and is essential for neutrophil adherence and aggregation. *Shock* 8: 357-361

Wang, J. M., McVicar, D. W., Oppenheim J. J., Kelvin, D. J. (1993). Identification of RANTES receptors on human monocytic cells: competition for binding and desensitization by homologous chemotactic cytokines. *J. Exp. Med.* 177: 699-705

Wawrick, S. O., Novotny, J. R., Wicks, I. P., Wilkinson, D., Maher, D., Salvaris, E., Welch, K., Fecondo, J., Boyd, A. W. (1989). The role of the LFA-1/ICAM-1 interaction in human leukocyte homing and adhesion. *Immunol. Rev.* 108: 120-126

Weihe, E., Nohr, D., Michel, S., Muller, S., Zentel, H. J., Fink, T., Krekel, J. (1991). Molecular anatomy of the neuro-immune connection. *Int. J. Neurosci.* 59: 1-23

Weiss, M., Schneider, E. M., Tarnow, J., Mettler, S., Krone, M., Teschemacher, A., Lemoine, H. (1996). Is inhibition of oxygen radical production of neutrophils by sympathomimetics mediated via beta-2 adrenoceptors? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278: 1005-1013

Wenisch, C., Parschalk, B., Weiss, A., Zedwitz-Liebenstein, K., Hahsler, B., Wenisch, H., Georgopoulos, A., Graninger, W. (1996). High-dose catecholamine treatment decreases polymorphnuclear leukocyte phagocytic capacity and reactive oxygen production. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3: 423-428

Yang, Y. H., Hutchinson, P., Littlejohn, G. O., Boyce, N. (1994). Flow cytometric detection of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *J. Immunol. Meth.* 172: 77-84

Youssef, P. P., Roberts-Thomson, P. J., Ahern, M. J., Smith, M. D. (1995). Pulse Methylprednisolone in rheumatoid arthritis: effects on peripheral blood and synovial fluid neutrophil surface phenotype. *J. Rheumatol.* 22: 2065-2071

Yuan, L., Inoue, S., Saito, Y., Nakajima, O. (1993). An evaluation of the effects of cytokines on intracellular oxidative production in normal neutrophils by flow cytometry. *Exp. Cell Res.* 209: 375-381

Yukawa, T., Ukena, D., Kroegel, C., Chanez, P., Dent, G., Chung, K. F., Barnes, P. J. (1990). Beta 2-adrenergic receptors on eosinophils. Binding and functional studies. *Am. Rev. Respir. Div.* 141: 1446-1452

Zahler, S., Kowalski, C., Brosig, A., Kupatt, C., Becker, B. F., Gerlach, E. (1997). The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J. Immunol. Meth.* 200: 173-179

Zak-Nejmark, T., Jankowska, R., Malolepszy, J., Kraus-Filarska, M., Nadobna, G., Nowak, I. A. (1998). Modulation of adhesion and chemotaxis of human

neutrophils by cortisol, transforming growth factor- β and antiinflammatory drugs. *Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 8: 346-352

Zarco, M. A., Ribera, J. M., Villamor, N. (1996). Phenotypic analysis of blood neutrophils in a patient with chronic idiopathic neutropenia and favorable response to G-CSF treatment. *Am. J. Hematol.* 51: 96-97

Zlotnik, A., Rossi, D. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 18: 217-242

2. Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AM	Acetoxymethyl
ANCA	anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody
APC	Antigen präsentierende Zelle
ARDS	adult respiratory distress syndrome
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
cAMP	3',5'-cyclo-Adenosin-monophosphat
CRH	corticotropine releasing hormone
CSF	colony-stimulating Factor
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
DAG	Diacylglycerin
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ELR	Glutaminsäure-Leucin-Arginin
ER	endoplasmatisches Reticulum
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
fMLP	formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
FSC	forward light scatter, Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	granulocyte-colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor
GRO	growth-related oncogene
GXM	Glucuronoxylomannan
h	Stunde
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	interferon- γ inducible protein-10

IP ₃	Inosit-1,4,5-triphosphat
kD	KiloDalton
LFA	leukocyte function associated antigen
LPS	Lipopolysaccharid
Mac-1	Makrophagen-Antigen-1
MAdCAM	mucosal cell-adhesion molecule
MCP	monocyte chemoattractant protein
M-CSF	macrophage-colony-stimulating factor
Mig	monokine induced by IFN- γ
min	Minute
MIP	macrophage-inflammatory protein
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
PAF	platelet activating factor
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS ⁺⁺	phosphate buffered saline mit Ca- und Mg-Ionen
PBS ^{def}	phosphate buffered saline ohne Ca- und Mg-Ionen
PE	Phycoerythrin
PI-PLC	Phosphatidylinositspezifische Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
PMN	Polymorphnukleäre Leukozyten
POD	Peroxidase
RANTES	regulated on activation on normal T-cell expressed and secreted
rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCF	stem cell factor
sek	Sekunde
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
sup.	supplementiert
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
w/v	weight per volume

3. Messergebnisse

3.1. Adhäsionsmoleküle

3.1.1. CD15 auf unstimulierten Zellen

Zeit AdKonz.	n	Mittelw.	Stdabw.	Stdfehler	Min.	Max.	Med.
0 h Kontrolle	10	60,6	22,9	7,23	6,0	82,7	65,3
6 h Kontrolle	10	33,0	20,2	6,38	8,1	67,1	32,5
6 h 10^{-9} M	10	31,8	23,9	7,56	10,0	83,0	21,9
6 h 10^{-6} M	10	29,8	20,0	6,33	10,7	73,1	23,1
6 h 10^{-3} M	10	31,3	19,17	6,23	8,4	65,6	26,8
12 h Kontrolle	10	46,0	22,2	7,01	4,1	72,6	48,7
12 h 10^{-9} M	10	40,2	17,7	5,61	16,6	66,4	42,5
12 h 10^{-6} M	10	40,3	17,7	5,59	16,0	69,7	40,5
12 h 10^{-3} M	10	47,6	18,3	5,79	16,5	69,6	52,8
18 h Kontrolle	10	40,9	14,2	4,49	23,5	66,3	36,4
18 h 10^{-9} M	10	37,2	14,8	4,68	15,7	57,5	35,8
18 h 10^{-6} M	10	45,1	15,7	4,95	17,0	64,1	43,2
18 h 10^{-3} M	10	54,4	19,8	6,25	32,8	96,3	51,7

Tab. 7 zeigt die Messergebnisse nach Auswertung von jeweils 10000 mit Aufnahmezeit erfassten Einzelzellmessungen. Dargestellt sind die Mittleren Fluoreszenzintensitäten der mit anti CD15 PE-Antikörper markierten Zellen. AdKonz. = verwendete Konzentration von Adrenalin, Mittelw. = Mittelwert, Stdabw. = Standardabweichung, Stdfehler = Standardfehler, Min. = Minimum, Max. = Maximum, Med. = Median.

3.1.2. CD15 auf LPS-stimulierten Zellen

Zeit AdKonz.	n	Mittelw.	Stdabw.	Stdfehler	Min.	Max.	Med.
0 h Kontrolle	10	60,6	22,9	7,23	6,0	82,7	65,3
6 h Kontrolle	10	42,9	28,9	9,12	16,2	108,2	33,4
6 h 10⁻⁹ M	10	45,5	32,7	10,33	17,1	113,6	30,7
6 h 10⁻⁶ M	10	47,3	34,0	10,74	16,2	123,7	31,7
6 h 10⁻³ M	10	44,5	23,8	7,51	14,6	79,6	44,0
12 h Kontrolle	10	68,2	30,5	9,63	29,7	119,2	71,1
12 h 10⁻⁹ M	10	61,7	28,6	9,06	29,2	124,1	65,2
12 h 10⁻⁶ M	10	61,0	22,1	6,99	20,0	97,9	63,2
12 h 10⁻³ M	10	58,9	13,8	4,35	35,7	76,8	58,1
18 h Kontrolle	10	63,5	27,7	8,77	23,8	99,2	56,1
18 h 10⁻⁹ M	10	72,1	31,7	10,03	22,1	113,7	72,1
18 h 10⁻⁶ M	10	82,7	30,4	9,61	31,7	133,7	84,9
18 h 10⁻³ M	10	64,7	23,4	7,41	29,1	93,7	72,5

Tab. 8 zeigt die Messergebnisse nach Auswertung von jeweils 10000 mit Aufnahmezeit erfassten Einzelzellmessungen. Dargestellt sind die Mittleren Fluoreszenzintensitäten der mit anti CD15 PE-Antikörper markierten Zellen. AdKonz. = verwendete Konzentration von Adrenalin, Mittelw. = Mittelwert, Stdabw. = Standardabweichung, Stdfehler = Standardfehler, Min. = Minimum, Max. = Maximum, Med. = Median.

3.1.3. CD44 auf unstimulierten Zellen

Zeit AdKonz.	n	Mittelw.	Stdabw.	Stdfehler	Min.	Max.	Med.
0 h Kontrolle	10	102,3	33,9	10,7	14,5	124,6	116,5
6 h Kontrolle	10	48,6	35,7	11,3	8,7	136	40,3
6 h 10⁻⁹ M	10	47,1	36,6	11,57	15,3	137,9	37,2
6 h 10⁻⁶ M	10	47,6	28,9	9,14	20,4	112,3	35,9
6 h 10⁻³ M	10	51,7	25,1	7,95	22,3	102,1	51,1
12 h Kontrolle	10	43,6	17,5	5,53	15,3	73,7	44,3
12 h 10⁻⁹ M	10	41,9	18,5	5,85	22,1	70,8	35,8
12 h 10⁻⁶ M	10	45,9	18,7	5,91	18,8	70,3	50,8
12 h 10⁻³ M	10	56,9	16,2	5,13	30,5	83,3	58,4
18 h Kontrolle	10	36,4	11,2	3,54	17,9	58,3	34,8
18 h 10⁻⁹ M	10	41,2	14,7	4,65	16,2	74,0	40,0
18 h 10⁻⁶ M	10	42,6	19,9	6,28	8,5	85,1	43,5
18 h 10⁻³ M	10	47,9	12,8	4,04	25,0	65,5	50,1

Tab. 9 zeigt die Messergebnisse nach Auswertung von jeweils 10000 mit Aufnahmezeit erfassten Einzelzellmessungen. Dargestellt sind die Mittleren Fluoreszenzintensitäten der mit anti CD44 PE-Antikörper markierten Zellen. AdKonz. = verwendete Konzentration von Adrenalin, Mittelw. = Mittelwert, Stdabw. = Standardabweichung, Stdfehler = Standardfehler, Min. = Minimum, Max. = Maximum, Med. = Median.

3.1.4. CD44 auf LPS-stimulierten Zellen

Zeit AdKonz.	n	Mittelw.	Stdabw.	Stdfehler	Min.	Max.	Med.
0 h Kontrolle	10	102,3	33,9	10,7	14,5	124,6	116,5
6 h Kontrolle	10	43,0	23,3	7,37	19,8	94,0	37,1
6 h 10⁻⁹ M	10	42,3	23,9	7,57	16,6	102,5	38,3
6 h 10⁻⁶ M	10	52,9	19,9	6,28	19,9	78,0	59,9
6 h 10⁻³ M	10	53,9	26,5	8,38	16,9	98,4	50,9
12 h Kontrolle	10	53,0	25,6	8,1	21,9	109,0	51,9
12 h 10⁻⁹ M	10	54,0	27,3	8,62	18,7	91,7	54,9
12 h 10⁻⁶ M	10	59,7	18,1	5,74	33,4	90,9	60,0
12 h 10⁻³ M	10	73,1	33,2	10,5	39,3	155,5	72,9
18 h Kontrolle	10	66,6	24,6	7,78	28,9	118,5	65
18 h 10⁻⁹ M	10	77,8	43,7	13,83	29	151,1	79,3
18 h 10⁻⁶ M	10	80,8	45,4	14,36	22,6	152,5	78,7
18 h 10⁻³ M	10	84,3	31,6	9,98	41,6	147,2	81,3

Tab. 10 zeigt die Messergebnisse nach Auswertung von jeweils 10000 mit Aufnahmezeit erfassten Einzelzellmessungen. Dargestellt sind die Mittleren Fluoreszenzintensitäten der mit anti CD44 PE-Antikörper markierten Zellen. AdKonz. = verwendete Konzentration von Adrenalin, Mittelw. = Mittelwert, Stdabw. = Standardabweichung, Stdfehler = Standardfehler, Min. = Minimum, Max. = Maximum, Med. = Median.

3.1.5. CD54 auf unstimulierten Zellen

Zeit AdKonz.	n	Mittelw.	Stdabw.	Stdfehler	Min.	Max.	Med.
0 h Kontrolle	10	8,86	4,62	1,46	1,9	15,9	9,55
6 h Kontrolle	10	7,21	2,76	0,87	3,2	12,3	7,05
6 h 10⁻⁹ M	10	7,3	2,59	0,82	3,1	12,1	7,75
6 h 10⁻⁶ M	10	7,25	2,51	0,79	3,1	10,2	8,4
6 h 10⁻³ M	10	7,92	3,19	1,01	2,7	11,5	8,85
12 h Kontrolle	10	6,29	2,75	0,87	2,5	10,8	5,8
12 h 10⁻⁹ M	10	5,97	2,53	0,8	2,5	9,5	5,6
12 h 10⁻⁶ M	10	6,09	2,5	0,79	2,2	9,7	5,7
12 h 10⁻³ M	10	7,91	2,99	0,95	3,1	12,0	8,85
18 h Kontrolle	10	4,62	2,04	0,64	1,6	7,6	4,35
18 h 10⁻⁹ M	10	5,02	2,4	0,76	1,5	9,1	4,8
18 h 10⁻⁶ M	10	4,53	1,77	0,56	1,8	7,5	4,5
18 h 10⁻³ M	10	6,86	2,48	0,78	2,6	9,9	7,2

Tab. 11 zeigt die Messergebnisse nach Auswertung von jeweils 10000 mit Aufnahmezeit erfassten Einzelzellmessungen. Dargestellt sind die Mittleren Fluoreszenzintensitäten der mit anti CD54 PE-Antikörper markierten Zellen. AdKonz. = verwendete Konzentration von Adrenalin, Mittelw. = Mittelwert, Stdabw. = Standardabweichung, Stdfehler = Standardfehler, Min. = Minimum, Max. = Maximum, Med. = Median.

3.1.6. CD54 auf LPS-stimulierten Zellen

Zeit AdKonz.	n	Mittelw.	Stdabw.	Stdfehler	Min.	Max.	Med.
0 h Kontrolle	10	8,86	4,62	1,46	1,9	15,9	9,55
6 h Kontrolle	10	14,0	5,26	1,66	4,6	20,1	13,7
6 h 10⁻⁹ M	10	13,6	5,72	1,81	4,7	23,6	13,8
6 h 10⁻⁶ M	10	13,5	6,29	1,99	4,2	23,4	12,8
6 h 10⁻³ M	10	10,4	4,66	1,47	2,3	17,4	11,4
12 h Kontrolle	10	19,4	7,68	2,43	6,8	29,9	20,4
12 h 10⁻⁹ M	10	18,1	7,47	2,36	6,0	27,7	19,9
12 h 10⁻⁶ M	10	18,3	7,87	2,49	5,8	28,9	19,0
12 h 10⁻³ M	10	15,5	5,75	1,82	4,2	22,7	15,8
18 h Kontrolle	10	19,9	8,68	2,75	6,0	35,2	21,1
18 h 10⁻⁹ M	10	20,5	10,45	3,3	5,3	36,3	21,1
18 h 10⁻⁶ M	10	20,5	10,32	3,26	5,3	37,9	20,7
18 h 10⁻³ M	10	18,9	10,02	3,17	3,9	41,5	18,6

Tab. 12 zeigt die Messergebnisse nach Auswertung von jeweils 10000 mit Aufnahmezeit erfassten Einzelzellmessungen. Dargestellt sind die Mittleren Fluoreszenzintensitäten der mit anti CD54 PE-Antikörper markierten Zellen. AdKonz. = verwendete Konzentration von Adrenalin, Mittelw. = Mittelwert, Stdabw. = Standardabweichung, Stdfehler = Standardfehler, Min. = Minimum, Max. = Maximum, Med. = Median.

3.2. IL-8

LPS AdKonz.	n	Mittelw.	Stdabw.	Stdfehler	Min.	Max.	Med.
neg. neg.	8	0,38	0,31	0,11	0,07	0,96	0,28
neg. 10⁻⁷ M	6	0,58	0,78	0,31	0,12	2,16	0,25
neg. 10⁻⁴ M	8	0,32	0,19	0,07	0,15	0,74	0,25
100 ng/ml neg.	8	19,0	9,13	3,23	7,83	30,8	18,4
100 ng/ml 10⁻⁷ M	6	16,7	8,49	3,46	9,3	31,4	14,1
100 ng/ml 10⁻⁴ M	8	17,9	11,15	3,94	5,76	37,2	17,7

Tab. 13 zeigt die deskriptive Statistik des Prozentsatzes an Zellen, die bezüglich der IL-8-Produktion über dem Basalwert lagen. Ausgewertet wurden jeweils 10000 neutrophilen Granulozyten, die mit PE-markiertem anti IL-8 Antikörper inkubiert worden waren. AdKonz. = verwendete Konzentration von Adrenalin, Mittelw. = Mittelwert, Stdabw. = Standardabweichung, Stdfehler = Standardfehler, Min. = Minimum, Max. = Maximum, Med. = Median.

4. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Timm Greulich
Geburtstag: 5. Januar 1975
Geburtsort: Berlin
Familienstand: verheiratet
Religion: evangelisch

Schulbildung und Zivildienst:

08/81 - 07/85 Grundsule: Beethoven-Schule, Offenbach/Main
08/85 - 07/87 Förderstufe: Bachschule, Offenbach/Main
08/88 - 05/94 Gymnasium: Leibniz-Schule, Offenbach/Main
06/94 Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife
07/94 - 09/95 Zivildienst: Rettungsdienst des DRK, Offenbach/Main

Studium und Praktisches Jahr:

10/95 - 11/02 Studium der Medizin: Philipps-Universität Marburg
09/97 - 03/98 Studium der Biochemie, Mikrobiologie und Interpersonellen
Kommunikation: Manchester College, North-Manchester,
Indiana, USA
03/99 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/01 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/01 - 02/02 Zentrum für Innere Medizin, Philipps-Universität Marburg
02/02 – 06/02 1. Allgemein Chirurgie, Philipps-Universität Marburg
2. Unfallchirurgie, Singapore General Hospital, Singapur
06/02 – 09/02 Anästhesie und Intensivmedizin, Philipps-Universität Marburg
11/02 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Wissenschaftliche Tätigkeiten:

- 01/98 Praktikum am NASA Research Centre, Cleveland, Ohio, USA
- 04/99 Beginn der Dissertation „Stimulation β -adrenerger Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten – Effekte auf Adhäsionsmoleküle, Zytokine und intrazelluläre Botenstoffe“ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. von Wichert
- 05/01 Postervortrag zu den Daten der Dissertation “Activation of beta2-Receptors differentially influences the expression of adhesion molecules of resting and activated neutrophils in vitro“ auf dem PNIRS Annual Meeting 2001, May 16-19 2001, Utrecht, Netherlands
- 06/01 Veröffentlichung als Abstract: Wahle, M., Greulich, T., Kaufmann, A., Krause, A., Häntzschel, H., Baerwald, C. G. O. (2001): Activation of beta2-Receptors differentially influences the expression of adhesion molecules of resting and activated neutrophils in vitro. *Brain Behav. Immun.* 15: 195 (abstract)
- 02/02 Übersetzungstätigkeit für „Harrisons Innere Medizin“, 15. Auflage
- 05/04 Eingereicht zur Publikation bei *Immunobiology*: Wahle, M., Greulich, T., Baerwald, C. G. O., Häntzschel, H., Kaufmann, A., (2004): Influence of catecholamines on cytokine production and expression of adhesion molecules of human neutrophils in vitro.

5. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Alfke, Arnold, Aumüller, Baake, Barth, Basler, Battmann, Baum, Beato, Becker, Bertalanffy, Bette, Bien, Bierbrauer, Bolm, Brandt, Brilla, Cetin, Czubayko, Daut, Doll, Doss, Ebel, Effendy, Eissele, Feddersen, Feuser, Fick, Fruhstorfer, Fuchs, Garn, Geks, Gerst, Gemsa, Geus, Goerke, Görg, Gotthardt, Gotzen, Griss, Gröne, Happle, Hartmann, Hasilik, Heeg, Herzum, Hesse, Heufelder, Höffken, Hofmann, Joseph, Jungclas, Junge, Kaiser, Katschinski, Kern, Kleene, Klenk, Klose, Koch, Köhler, Koolman, Kraft, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kropf, Kuhn, Lammel, Lang, Lange, Lemke, Lennartz, Leppek, Lippert, Löffler, Maisch, McGregor, Meinhardt, Mennel, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Noll, Oertel, Peter, Petermann, Podszus, Printz, Ramaswamy, Reichardt, Renschmidt, Renneberg, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Schachtschabel, Schädel-Höpfner, Schäfer, Schlegel, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schneyer, Schuermann, Schüffel, Schulz, Schurek, Schwarz, Seitz, Sekundo, Seyberth, Slenczka, Sommer, Sprenger, Steininger, Steinmetz, Ullmann, Vohland, Voigt, von Garrel, von Wichert, Wagner, Walland, Walthers, Weihe, Wellstein, Werner, Westermann, Westphal, Wilke, Wolf, Wulff, Ziegler

6. Danksagung

Herrn Professor Dr. P. v. Wichert danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und für die Anregungen bei ihrer Durchführung. Beinahe noch mehr habe ich für die Vorlesung Medizinische Poliklinik zu danken, die mich während meines Studiums kontinuierlich begleitet und geprägt hat.

Herrn Prof. Dr. D. Gemsa danke ich für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und Material im Institut für Immunologie sowie für die freundliche Atmosphäre, die in diesem Institut unter seiner Leitung herrschte.

Für die Hilfe bei der Entwicklung der Fragestellung und Versuchsplanung gilt mein Dank Herrn Dr. M. Wahle, der mich auch in die Geheimnisse der FACS-Analysen einweihte.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. A. Kaufmann, ohne dessen Hilfe der fürsorgliche Umgang mit neutrophilen Granulozyten zur Katastrophe geworden wäre. Ihm danke ich auch für viele offene Gespräche über Fragen der Weltanschauung und Berufsplanung.

Für die Unterstützung in allen Lebenslagen danke ich meiner Frau Claudia, meiner Tochter Charlotte und meinen Eltern.

Mein innigster Dank gilt Gott, meinem himmlischen Vater, dessen Liebe mich hält und trägt.

7. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Stimulation β -adrenerger Rezeptoren auf neutrophile Granulozyten, Effekte auf Adhäsionsmoleküle, Zytokine und intrazelluläre Botenstoffe“ im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. P. v. Wichert ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Postervortrags "Activation of beta2-Receptors differentially influences the expression of adhesion molecules of resting and activated neutrophils in vitro. M. Wahle, T. Greulich, A. Kaufmann, D. Gemsa, A. Krause, H. Häntzschel & C.G.O. Baerwald“ auf dem Kongress PNIRS Annual Meeting 2001, May 16-19 2001, Utrecht, Netherlands vorgestellt und ebenfalls 2001 als Abstract in *Brain Behav. Immun.* 15: 195 (abstract) publiziert. Die Daten führten darüber hinaus zur Entstehung der Publikation „Influence of catecholamines on cytokine production and expression of adhesion molecules of human neutrophils in vitro: M. Wahle, T. Greulich, C.G.O. Baerwald, H. Häntzschel, A. Kaufmann“, welche im Juni 2004 bei *Immunobiology* zur Veröffentlichung eingereicht wurde.

Marburg, den