

---

**Einfluss hypertoner Kochsalzlösung  
auf die Expression von  
Adhäsionsmolekülen humaner  
polymorphkerniger Leukozyten  
- In vitro Untersuchungen zum  
Wirkungsmechanismus -**

Kay Eberhardt

---



München 2008



Aus der Klinik für Anästhesiologie der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. B. Zwissler

Einfluss hypertoner Kochsalzlösung auf die Expression von  
Adhäsionsmolekülen humaner polymorphkerniger Leukozyten  
- In vitro Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus -

Dissertation  
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
An der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Kay Eberhardt  
Möln (Kreis Herzogtum Lauenburg)

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Thiel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Scherer

Priv. Doz. Dr. Stefan Piltz

Priv. Doz. Dr. Dr. Erwin Strobel

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. F. Büßecker

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2008

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

- 1.1. Die physiologische Rolle von Adhäsionsmolekülen auf polymorphkernigen Leukozyten
- 1.2. Die Stimulus-Antwort-Kopplung von polymorphkernigen Leukozyten: Ein ambivalentes Funktionsprinzip
- 1.3. Second Messenger Systeme polymorphkerniger Leukozyten
- 1.4. Die pathophysiologische Bedeutung der Adhäsionsmoleküle von polymorphkernigen Leukozyten
- 1.5. Wirkung hypertoner Kochsalzlösung auf die Sequestration von polymorphkernigen Leukozyten und die Entstehung von Gewebeschäden

## 2. Fragestellung

## 3. Material und Methodik

### 3.1. Material

- 3.1.1. Verwendete Geräte
- 3.1.2. Verwendete Chemikalien und Lösungen
- 3.1.3. Verwendete Antikörper
- 3.1.4. Software

### 3.2. Methodik

- 3.2.1. Bestimmung der basalen und der fMLP-stimulierten Expression von Adhäsionsmolekülen
- 3.2.2. Bestimmung des Zellvolumens
- 3.2.3. Effekte von Amilorid auf die Expression der  $\beta_2$ -Integrine

- 3.2.4. Bestimmung der fMLP-Rezeptor Expression
- 3.2.5. Bestimmung der intrazellulären Calciumionenkonzentration
- 3.2.6. Rezeptorunabhängige Hochregulation der Adhäsionsmolekülexpression durch synthetische Stimuli
- 3.2.7. Bestimmung der MAPKinasen p38RK und der p44/42
- 3.2.8. Statistische Auswertung

#### **4. Ergebnisse**

- 4.1. Effekte von Natriumchlorid modifizierter HBSS auf die fMLP-stimulierte Expression von Adhäsionsmolekülen
- 4.2. Effekte von Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die fMLP-stimulierte Expression von Adhäsionsmolekülen
- 4.3. Effekte von Mannitol modifizierter HBSS auf die fMLP-stimulierte Expression von Adhäsionsmolekülen
- 4.4. Einfluss von Amilorid auf die fMLP-stimulierte Expression der  $\beta_2$ -Integrine
- 4.5. Einfluss von Natrium- bzw. Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die Bindung von fNLPNTL-FITC
- 4.6. Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration
- 4.7. Effekte von Natrium- und Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die Ionophor A23187-abhängige Expression der  $\beta_2$ -Integrine
- 4.8. Effekte von PMA auf die Natrium- und Cholinchlorid-abhängige Expression der  $\beta_2$ -Integrine
- 4.9. Effekte von Natrium- und Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die fMLP-abhängige Phosphorylierung der MAPK p38 und ERK-1/2

## **5. Diskussion**

5.1. Hypertonizität und basale Expression der Adhäsionsmoleküle

5.2. Hypertonizität und fMLP-stimulierte Expression der Adhäsionsmoleküle

5.3. Effekte hypertoner Natriumchlorid- bzw. Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die Rezeptorbindung von fMLP und klassische rezeptor-abhängige Signalwege

5.4. Effekte von hypertoner Natrium- und Cholinchlorid-modifizierter HBSS auf die fMLP-stimulierte Phosphorylierung der MAPKinasen p38 und p44/42

5.5. Effekte von Tonizitäts-bedingten Änderungen des Zellvolumens auf die fMLP-stimulierte Expression der  $\beta_2$ -Integrine

## **6. Zusammenfassung**

## **7. Abkürzungen**

## **8. Literaturverzeichnis**

## **9. Danksagung**

## **10. Curriculum vitae**

# 1. Einleitung

## 1.1. Die physiologische Rolle von Adhäsionsmolekülen auf polymorphkernigen Leukozyten

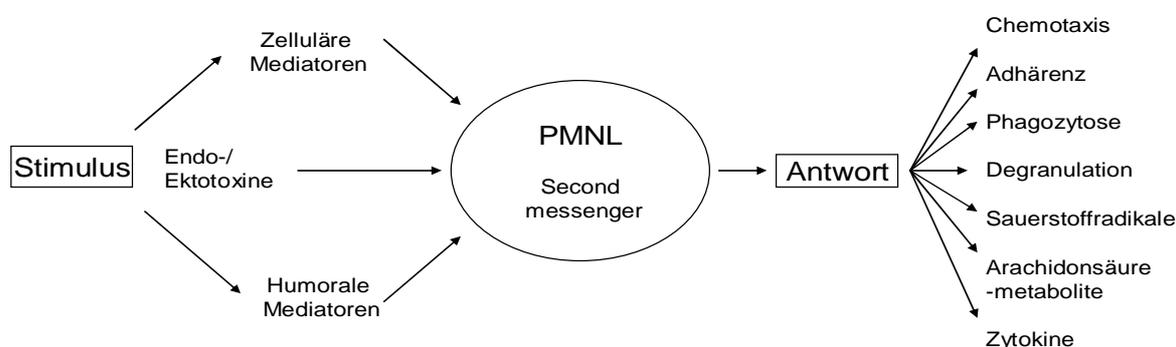
Polymorphkernige Leukozyten (PMNL) stellen die erste Linie der Verteidigung der unspezifischen Immunabwehr dar, die den Organismus vor eingedrungenen Mikroorganismen schützt. Hierbei müssen die im Blut zirkulierenden PMNL möglichst schnell an den Ort einer Infektion gelangen, um dort ihre mikrobizide Funktion zu erfüllen. Um den Intravasalraum verlassen zu können, ist in einem ersten Schritt eine Kontaktaufnahme der PMNL mit dem Gefäßendothel notwendig (Adhäsion). Diesem folgt dann in einem zweiten Schritt die Auswanderung durch das Gefäßendothel an den Infektionsort (transendotheliale Diapedese) (von Andrian et al., 1993). Vermittelt werden die Kontaktaufnahme mit dem Endothel sowie die nachfolgende transendotheliale Diapedese durch die Interaktion von Adhäsionsmolekülen auf den PMNL einerseits und dem Gefäßendothel andererseits. Die auf den PMNL exprimierten Adhäsionsmoleküle können in zwei Arten unterschieden werden, zum einen in die L-Selektine (CD62) und zum anderen in die  $\beta_2$ -Integrine (CD11/18). Vermittelt durch die L-Selektine haften die PMNL zunächst intermittierend an das Gefäßendothel. Da dabei die L-Selektinmoleküle ähnlich wie die Zähne eines Zahnrades nur punktuell und transient mit dem Endothel Kontakt aufnehmen, kommt es zu dem intravitalmikroskopisch fassbaren Phänomen des Rollens der Zellen entlang des Endothels („rolling“). Je mehr Selektinmoleküle hierbei mit der Endotheloberfläche in Verbindung treten können, desto länger ist die Verweildauer der PMNL an der Gefäßwand und damit umso höher die Wahrscheinlichkeit, dass Entzündungsmediatoren, die vom Endothel gebildet werden (z.B. IL-8 oder PAF), die PMNL aktivieren und als Folge davon Adhäsionsmoleküle aus der Familie der  $\beta_2$ -

Integrine auf den Granulozyten rasch hochreguliert werden. Im Gegensatz und parallel dazu werden die L-Selektinmoleküle proteolytisch von der Oberfläche abgespalten („shedding“). Die hochregulierten  $\beta_2$ -Integrin-Moleküle interagieren mit Molekülen aus der Familie der Superimmunglobulinklassen, den sogenannten „Intercellular Adhesion Molecules“ (ICAM-1,2). Sie werden verstärkt auf den Endothelzellen exprimiert und im Rahmen einer Entzündungsreaktion aktiviert. Hierdurch kommt es zur Ausbildung einer festen Adhäsion („adhesion“). Wird dieses Stadium der Adhärenz erreicht, dann folgt in der Regel die Diapedese aus dem Intravasalraum. Zudem werden durch die Interaktion der  $\beta_2$ -Integrine mit den endothelialen Liganden (ICAM-1,2) die Abwehrmechanismen der PMNL durch ein sogenanntes „outside-inside-signaling“ stimuliert, so dass, die auf diese Weise in eine erhöhte Reaktionsbereitschaft versetzten PMNL, verstärkt Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme freisetzen und Mikroorganismen durch Phagozytose besser aufnehmen können. Vereinfacht können diese Funktionsabläufe auch als Stimulus-Antwort-Reaktion beschrieben werden (Korchak et al., 1984).

## **1.2. Die Stimulus-Antwort-Kopplung von polymorphkernigen Leukozyten: Ein ambivalentes Funktionsprinzip**

Wie eingangs kurz dargestellt, besteht die Hauptfunktion der PMNL in der Abwehr von eingedrungenen Mikroorganismen. Allerdings können die gleichen zur antimikrobiellen Abwehr eingesetzten Mechanismen auch zur Schädigung von körpereigenem Gewebe führen. Normalerweise führen bakterielle Stimuli, beispielsweise Endo- bzw. Ektotoxine, direkt oder vermittelt durch humorale und zelluläre Mediatoren zur Auslösung der Zellantworten der PMNL. Nach Wanderung der PMNL zum Infektionsherd (Chemotaxis) kommt es zur Aufnahme der Mikroorganismen in das Zellinnere der PMNL durch Adhärenz und Phagozytose.

Danach folgt die Abtötung durch Freisetzung granulärer Enzyme (Degranulation) sowie toxischer Sauerstoffradikale. Bei überschießender Stimulation können jedoch die gleichen primär zur Abwehr von Infektionen eingesetzten Mechanismen zur Zerstörung von körpereigenem Gewebe führen. Vermittelt werden in beiden Fällen die mikrobiziden wie die zytotoxischen Reaktionen durch intrazelluläre Botenstoffe, die sogenannten „Second Messenger“



**Abb.1:** Stimulus-Antwort-Reaktion als Funktionsprinzip der PMNL. Vermittelt werden die Stimulus-Antwort-Reaktionen durch die Bildung intrazellulärer Botenstoffe, den „Second Messenger“.

### 1.3. Second Messenger Systeme polymorphkerniger Leukozyten

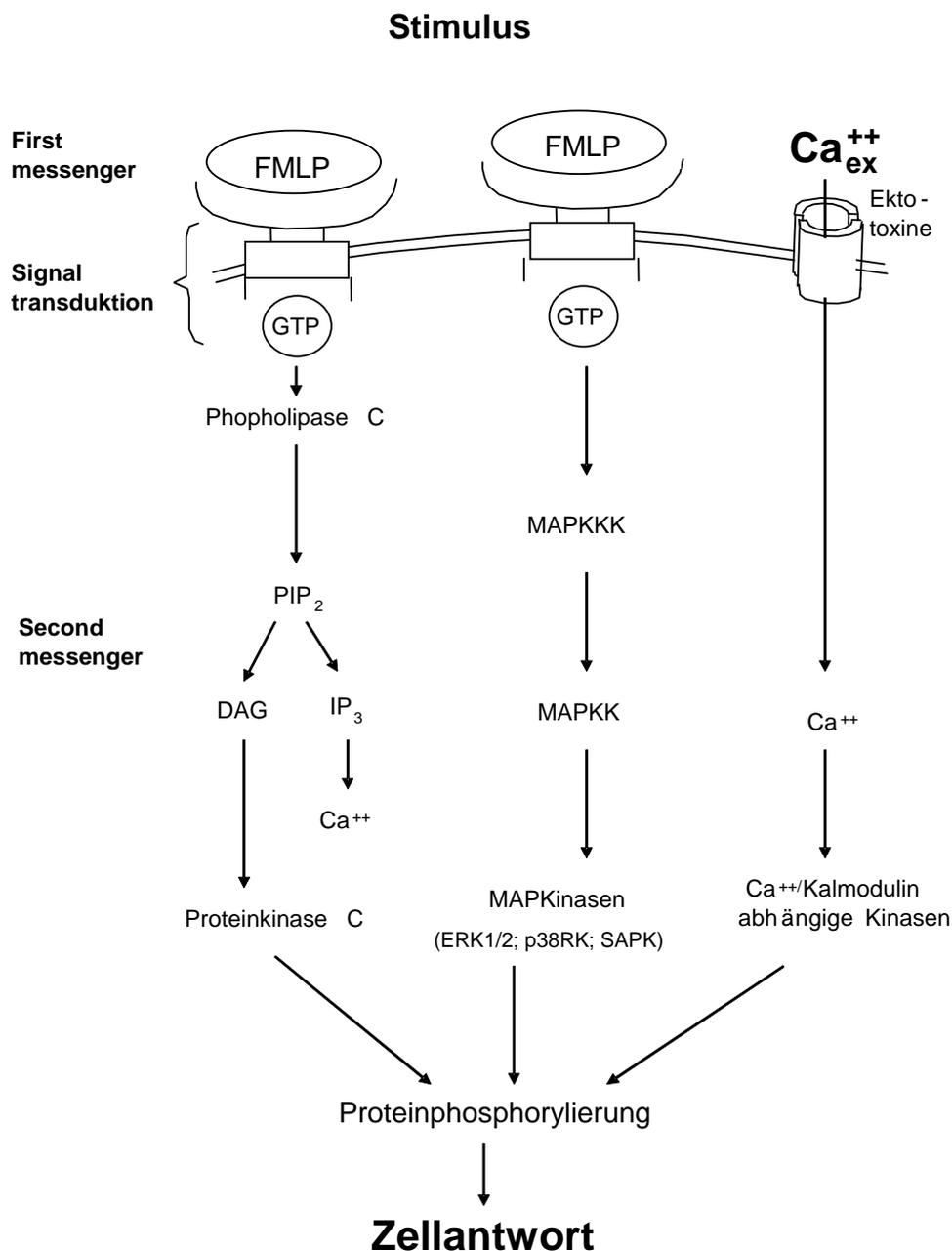
Das System der intrazellulären Botenstoffe kann prinzipiell auf zwei verschiedene Weisen aktiviert werden, d.h. durch Stimuli, die entweder rezeptor-abhängig oder rezeptor-unabhängig die PMNL aktivieren. Zu den rezeptor-unabhängigen Stimuli gehören unter anderem Ektotoxine von Bakterien. Sie bilden Proteine wie zum Beispiel das Streptolysin O, welches die Zellmembran perforiert und so zu einem massiven Calciumioneneinstrom entlang dem hohen Konzentrationsgefälle vom Extrazellular- zum Intrazellularraum führt. Die Erhöhung des intrazellulären Calciums führt wiederum zu einer Aktivierung von  $\text{Ca}^{++}$ /Kalmodulin-abhängigen Kinasen, die

die Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen bewirken. Diese Effektorproteine erfahren ihrerseits durch die Phosphorylierung eine Aktivierung und führen über weitere komplexe Folgereaktionen zur Auslösung der Zellantwort(en).

Bakterielle Produkte, wie zum Beispiel chemotaktisch wirksame Peptide - als Ersatz dafür wird in in vitro Versuchen oft das synthetisch hergestellte chemotaktische Tripeptid FMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin) eingesetzt - binden ferner an spezielle Rezeptoren auf der Oberfläche der PMNL. Daraus resultiert eine Konformitätsänderung des intrazellulären Anteils des betreffenden Rezeptors, und es kommt nach veränderter Interaktion mit G-Proteinen zur G-Protein-vermittelten Fortleitung des Stimulus über die Zellmembran (Signaltransduktion). Diese auch als „klassische“ G-Protein-vermittelten bekannten Signalwege führen über die Aktivierung von Phospholipasen, insbesondere der durch die  $\gamma\delta$ -Gi-Proteinuntereinheit aktivierten Phospholipase C zur Spaltung von Phosphatidylinositolbiphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ). DAG wiederum aktiviert die Proteinkinase C, welche die Aktivierung durch Phosphorylierung der Effektorproteine bewirkt.  $\text{IP}_3$  erhöht die intrazelluläre Calciumionenkonzentration und führt somit ebenfalls über die bereits erwähnten  $\text{Ca}^{++}$ /Kalmodulin-abhängigen Kinasen zur Auslösung der Zellantworten.

Neben der Auslösung der Zellantworten des Granulozyten über die Stimulation dieser „klassischen“ Signalwege zeigten Untersuchungen jüngerer Zeit, dass es ebenfalls G-Protein gekoppelt zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung weiterer intrazellulärer sogenannter zytosolischer Tyrosinkinasen kommen kann. Zu ihnen zählen beispielsweise die große Gruppe der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPKinasen). Auch hier läuft die Kette an Übertragungen über mehrere Schritte. So aktivieren vorgelagerte Enzyme, die MAPKinasenKinasenKinasen, die nachgeschalteten MAPKinasenKinasen. Diese

wiederum aktivieren die MAPKinasen ERK-1/2, p38RK und SAPK ebenfalls durch Phosphorylierung. Diesen drei Effektorproteinebenen wird eine ko-aktivierende Wirkung bei der Vermittlung verschiedener Granulozytenfunktionen wie der Adhäsion an das Gefäßendothel, der Bildung von Sauerstoffradikalen sowie der Degranulation proteolytischer und mikrobizider Enzyme zugesprochen.



**Abb. 2:** Übersicht über den klassischen Signalweg der Proteinkinase C, der Ca<sup>++</sup>/Kalmodulinkinasen und der MAPKinasen als „Second Messenger“ in PMNL.

#### **1.4. Die pathophysiologische Bedeutung der Adhäsionsmoleküle auf polymorphkernigen Leukozyten**

Kommt es im Körper zu Phasen von Ischämie und Reperfusion, wie dies beispielsweise beim hämorrhagischen-traumatischen Schock systemisch eintreten kann oder isoliert auch einzelne Organe durch passageres Abklemmen der Gefäßversorgung betreffen kann, dann führt dies häufig zur Freisetzung von zahlreichen entzündungsfördernden Stimuli. Diese bewirken, wie eingangs dargestellt, eine verstärkte Adhäsion der PMNL an das Gefäßendothel mit der nachfolgenden Freisetzung von zytotoxischen Produkten am falschen Ort zur falschen Zeit (Thiel et al., 1998; Richter J., 1992). Durch diese Vorgänge wird das Gewebe zweifach geschädigt, erstens durch den initialen Zustand der Ischämie und zweitens durch die Aktivierung der PMNL im Sinne eines zweiten Schlags („second hit“) während der Reperfusion (Chosay et al., 1997).

Diese pathogenen Vorgänge einer sekundären Amplifikation des primär ischämisch gesetzten Gewebsschadens durch überschießend aktivierte PMNL führte zu Überlegungen, Therapien zu entwickeln, die auf eine Hemmung der Adhärenz von neutrophilen Leukozyten an das Gefäßendothel ausgerichtet sind. So führte die Elimination von Granulozyten durch Antikörper zu einer deutlichen Reduktion von Ischämie-Reperfusionsschäden (Jaeschke et al., 1990; Richter J., 1992). In weiteren tierexperimentellen Studien wurden diese Ergebnisse bestätigt. Dabei wurden die Adhäsionsmoleküle gezielt sowohl auf den Endothelzellen als auch auf den PMNL durch Antikörper blockiert. Dies erwies sich als sehr effektiv zum Schutz vor Organschäden beim hämorrhagischen Schock (Jaeschke et al., 1990; Vedder et al., 1988).

### **1.5. Wirkung hypertoner Kochsalzlösung auf die Sequestration von polymorphkernigen Leukozyten und die Entstehung von Gewebeschäden**

Ein weiterer therapeutischer Ansatz zur Verminderung von Ischämie-Reperfusionsschäden stellt die „small volume resuscitation“ dar. Hierbei wird intravenös ein relativ geringes Volumen hypertoner Kochsalzlösung verabreicht, um die Hämodynamik und die Gewebepfusion schnellstmöglich wieder herzustellen (Mattox et al., 1991). Obwohl die positiven Effekte dieser Therapie unter klinischen Bedingungen bereits nachgewiesen wurden, sind die zellulären und biochemischen Mechanismen nur unvollständig verstanden. Es war bekannt, dass die hohe Osmolarität der infundierten Lösung zu einer Mobilisierung von Wasser aus den geschwollenen Endothelzellen führt, was wiederum eine Vergrößerung des Kapillardurchmessers und eine Erhöhung des Kapillarflusses bewirkte. Des Weiteren zeigte die Intravitalmikroskopie eine verminderte Adhäsion der PMNL in den postkapillären Venulen (Nolte et al., 1992). Da ein Zusammenhang zwischen der Granulozytenadhäsion, der Erhöhung des kapillären Flußwiderstandes und der Gefäßleckage bestand, lag die Vermutung nahe, dass hypertone Flüssigkeiten insbesondere adhäsions-abhängige Mechanismen einer Ischämie-Reperfusion bedingten Organschädigung reduzieren. Diese Annahme wurde unterstützt durch Studien, die zeigten, dass die „small volume resuscitation“ beim hämorrhagischen Schock zu einer Verringerung der PMNL-Extravasation (Angle et al., 1998) und zu einer geringeren Sequestration in den Alveolen (Rizoli et al., 1998) führte.

Basierend auf den zahlreichen Befunden einer Hemmung der Adhäsionsmolekülexpression, der Extravasierung und der Sequestration von PMNL durch „small volume resuscitation“, sollte in der vorliegenden Arbeit die Frage untersucht werden, ob eine hypertone Kochsalzlösung die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den PMNL hemmen kann.

Im Besonderen sollten folgende Teilfragen beantwortet werden:

## 2. Fragestellung

- 1) Kann hypertone Kochsalzlösung die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den PMNL hemmen?
- 2) Gibt es Unterschiede zwischen hypertoner Kochsalzlösung und anderen hypertonen Flüssigkeiten?  
Wie werden dabei die Signalwege der Stimulus-Antwort-Kopplung beeinflusst  
d.h.:
- 3) Wie verhält sich das Zellvolumen?
- 4) Was geschieht mit dem fMLP Rezeptor?
- 5) Wie ändert sich die intrazelluläre Calciumionenkonzentration?
- 6) Werden die klassischen Signalwege der  $\text{Ca}^{++}$ /Kalmodulin-abhängigen Kinasen und der Proteinkinase C beeinflusst?
- 7) Kommt es zu Veränderungen der MAPKinasen p38RK und ERK-1/2?

### **3. Materialien und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Verwendete Geräte**

Es wurden bei den Experimenten folgende technischen Geräte eingesetzt:

- Laborzentrifuge, Biofuge Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland
- Micro-Osmometer Model 3MO, Advanced Instruments. Inc., Needham Heights, USA
- Thermo Block BT3, Grant Inc., Cambridge, UK
- Wasserbad SWB25; Gebrüder Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Ultrazentrifuge L5-65, Fa. Beckmann Instrument GmbH, München, Deutschland
- Zytozentrifuge, Cytospin 2, Fa. Shandon, Frankfurt a.M., Deutschland
- Durchflusszytometer, FACscan, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Partikel und Zellenzählmessgerät Multisizer II mit Coulter<sup>®</sup> Multisizer AccuComp<sup>®</sup> Software Version 1.19, Coulter Electronics GmbH, Krefeld, Deutschland
- Ultraschall-Wasserbad, Sonorex Rk510 H, Fa. Bandelin, Berlin, Deutschland
- Photometer Cary 100 Bio<sup>®</sup> incl. Cary WinUV Simple Reads Application Version 2.00(25) , Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Mini Trans Blot<sup>®</sup>, Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- Densitometer Geldoc 2000<sup>®</sup>, Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- Milli-Q Water System, Millipore Corporation, Billerica, USA

### 3.1.2. Verwendete Chemikalien und Lösungen

- Deltadex 6% 60<sup>®</sup>, Fa. Delta-Select GmbH, Pfullingen, Deutschland
- Vetren Na<sup>®</sup>, Fa. Promonta GmbH, Hamburg, Deutschland
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Natriumchlorid basierte Ausgangsmolarität von 170 mosmo/l zur weiteren Modifikation), Apotheke Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland
- Ficoll-Histopaque, Fa. Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl), Fa. Merck KG, Darmstadt, Deutschland
- Cholinchlorid (ChCl), Fa. Merck KG, Darmstadt, Deutschland
- FACS-Lysing Solution, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Percoll<sup>®</sup>, Fa. Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- Cell Lysis Buffer 10x, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
- Proteinbestimmung Protein Assay ESL, Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
- 1,4 Dithiothreitol als reduzierende Komponente des Puffers nach Lämmli, Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
- Trispuffer 10x Konzentrat, Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- Elektrophorese Puffer, Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- Tween 20<sup>®</sup>, Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- Nonfat-Dry Milk, Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- Transferpuffer, Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- 30% Acrylamid-Bis Solution 37,5:1 (2,6%), Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland

- Nitrocellulose Membran Porengröße 0,45µm, Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- Protein Marker, Broad Range (2-212 kDa), New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
- PMSF, Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- Glycerol, Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- Glycine, Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- Sodium Dodecyl Sulfat, Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- Bromphenolblau, Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- Ammoniumpersulfat (APS), Fa. BioRad GmbH, München, Deutschland
- Methanol, Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, U.S.A.
- LumiGLO<sup>®</sup> Reagent and Peroxide, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
- fMLP, LPS, Ionophor A12387 und Phorbolmyristataacetat, Fa. Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

### **3.1.3. Verwendete Antikörper**

- Monoklonaler Anti-L-Selektin-Antikörper Dreg200
- Monoklonaler Anti-CD18 Antikörper IB<sub>4</sub>, T.A. Springer, Harvard Medical School, Boston, USA
- Monoklonaler CBRM1/5 IgG Antikörper, T.A. Springer, Harvard Medical School, Boston, USA
- FITC-markierter Zweitantikörper gegen den CBRM1/5 Antikörper, Fa. La Roche, Mannheim, Germany
- FITC-markiertes fMLP Analogon (fNLPNTL-FITC), Molecular Probes Inc., Oregon, USA

- Kanninchen-anti-Biotin IgG Antikörper Meerrettichperoxidase markiert, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
- Ziege-anti-Kanninchen IgG Antikörper Meerrettichperoxidase markiert, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
- Kanninchen-anti-p38RK-Antikörper, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
- Kanninchen-anti-Phospho-p38RK-Antikörper, Cell Signaling Technology Inc., Beverly, USA
- Kanninchen-anti-ERK-1/2(=P44/42)-Antikörper, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
- Kanninchen-anti-Phospho-ERK-1/2-Antikörper Cell Signaling Technology Inc., Beverly, USA

#### **3.1.4. Software**

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung von Daten erfolgte mit den computergestützten Programmen:

Statistik-Programm SPSS®, Version 4.0, SPSS Inc. München, Deutschland

Sigma-Plot® Graphikprogram Version 4.1. Fa Jandel, Erkrath, Deutschland

Die densitometrische Auswertung von Röntgenfilmen erfolgte mit Hilfe der Biorad Quantity One® Software Version 4.4.0.

## 3.2. Methodik

### 3.2.1. Bestimmung der basalen und der fMLP-stimulierten Expression von Adhäsionsmolekülen

Zur Bestimmung der Adhäsionsmolekülexpression wurde gesunden Spendern venöses Blut in heparinisierten Spritzen (10l.E./ml) abgenommen. Um Plasmaproteine zu entfernen, wurden die Blutproben zweimal mit isotoner HBSS bei Raumtemperatur gewaschen, zentrifugiert, aliquotiert und mit HBSS der gewünschten Osmolarität auf den ursprünglichen Hämatokrit eingestellt. Danach wurden die Proben für 30 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad erwärmt und ein Teil der Proben anschließend mit fMLP in aufsteigenden Konzentrationen ( $10^{-8}$ M und  $10^{-7}$ M) für 15 Minuten stimuliert, um eine halbmaximale beziehungsweise maximale Aktivierung der Zellen zu erreichen (Thiel et al., 1996).

Die basale und fMLP-stimulierte Expression der Adhäsionsmoleküle wurde mit der Durchflusszytometrie bestimmt. Hierzu wurde ein Teil der Proben für 20 min mit Antikörpern auf Eis inkubiert. Zum einen wurden monoklonale FITC markierte IB<sub>4</sub> Antikörper gegen die  $\beta_2$ -Kette humaner Integrine (CD18) und FITC markierte Dreg 200 Antikörper gegen humanes L-Selektin (CD62L) verwendet. Zum anderen wurde ein nicht FITC markierter Antikörper CBRM1/5 gegen ein extrazelluläres Neoepitop der  $\alpha$ -Kette (CD11b) verwendet, welches nur nach funktioneller Aktivierung der  $\beta_2$ -Integrine exprimiert wird (Diamond and Springer, 1993). Zur Detektion von gebundenen CBRM1/5 Antikörper wurde ein polyklonaler FITC markierter anti-Maus IgG-Zweitantikörper verwendet. Zum Fluoreszenznachweis wurde ein Durchflußzytometer mit Argonlaser verwendet. Die Erregerwellenlänge betrug 488nm und das vom Fluoreszein emittierte Licht wurde in relativen Einheiten auf einer linearen Skala erfasst. Die Identifizierung der PMNL erfolgte anhand der „forward“-

und „right angle light scatter“ – Werte. Es wurden 5000 Meßwerte pro Probe bestimmt, der lineare Fluoreszenzverstärkungsfaktor („amplifier gain“) wurde bei konstanter „photomultiplier voltage“ solange variiert, bis sich die Probensignale im Meßbereich befanden. Mit Hilfe der FACscan Software wurde die mittlere Fluoreszenzintensität berechnet und auf einen Verstärkungsfaktor von 1,0 bezogen. Der korrigierte Wert wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{CMCN (corrected mean channel number)} = \frac{\text{observed mean channel number}}{\text{amplifier gain.}}$$

### 3.2.2. Bestimmung des Zellvolumens

Polymorphkernige Leukozyten wurden aus dem venösen Vollblut gesunder Spender mittels Dextranseparation und Percolldichte-zentrifugation gewonnen. Nach Inkubation der Zellen in Natriumchlorid- bzw. Cholinchlorid modifizierter HBSS der gewünschten Osmolarität wurde ein Teil der Zellen entnommen und das absolute Zellvolumen in einem automatischen Blutzellenzählgerät (Coulter Counter Multisizer II) bestimmt. Für einen anderen Teil der jeweils gleichen Proben wurde mit Hilfe der Durchflussszytometrie die Größe der Vorwärtslichtstreuung als direkt proportionales Maß zum absoluten Zellvolumen vermessen. Hierzu wurden Zellen mit dem DNS-Farbstoff LDS 751 (Molecular Probes) markiert. Dies erlaubt bei der Durchflussszytometrie nach Setzen einer geeigneten Treshold auf FL-3 die Erfassung von nur fluoreszenz-positiven Leukozyten, innerhalb derer die Vorwärtslichtstreuung (Fowardscatter, FSC) der PMNL-Fraktion bestimmt wurde. Für die am Coulter Counter gemessenen Zellvolumina und der durchflussszytometrisch bestimmten Vorwärtslichtstreuung ergab sich folgende lineare Beziehung:

Zellvolumen [fl] = 222,2 + 0,246 x FSC. N =15; r= 0,955 und p= 0,0001; (Korrelationskoeffizient nach der Methode von Pearson) [12]. Die auf diese Weise

beschriebene Kalibration des Durchflusszytometers bestätigte so eine einfache Bestimmung des Zellvolumens anhand der gemessenen Vorwärtslichtstreuung in den späteren Versuchen.

### **3.2.3 Effekte von Amilorid auf die Expression der $\beta_2$ -Integrine**

Werden Zellen in hyperosmolares HBSS Medium eingebracht, kommt es initial zu einer Abnahme des Zellvolumens. Zugleich werden Kompensationsmechanismen aktiviert, die auf eine Wiederherstellung des Zellvolumens abzielen. Ein wesentlicher Mechanismus zur Wiedererlangung des Zellvolumens ist hierbei die Stimulation des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiports. Um zu prüfen, ob damit verbundene Signalwege die Expression der  $\beta_2$ -Integrine beeinflussen, wurden Experimente durchgeführt, in welchen die Fähigkeit von hyperten geschrumpften PMNL, ihr initiales Zellvolumen mit Hilfe des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiports wiederzuerlangen, blockiert wurde. Hierzu wurde Amilorid verwendet, das die Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiports blockiert und so den Volumenzuwachs nach Stimulation der PMNL mit fMLP vollständig verhindert (Grinstein and Furuya, 1984). Hierzu wurden isolierte PMNL mit Natriumchlorid - modifizierter HBSS aufsteigender Osmolaritäten in Ab- und Anwesenheit von Amilorid ( $10^{-3}\text{M}$ ) inkubiert und anschließend mit  $10^{-7}\text{M}$  fMLP stimuliert. Der Einfluss auf die Expression der  $\beta_2$ -Integrine wurde sowohl auf die numerische (CD18) als auch die funktionelle (CD11b/CD18) Expression der  $\beta_2$ -Integrine analog den unter 3.2.1 beschriebenen Versuchen mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen.

### **3.2.4. Bestimmung der fMLP Rezeptor Expression**

Um einen Nachweis der fMLP Rezeptoren auf der Zelloberfläche polymorphkerniger Leukozyten zu führen, wurde ein fluoreszierendes Derivat von formyl-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys- Oligopeptid (fNLPNTL-FITC, Molecular Probes INC., Oregon, USA)

verwendet. Hierzu wurden Zellen ebenfalls Dextran separiert und über einen Percoll-dichtegradienten zentrifugiert. Die gewonnenen PMNL wurden mit Natriumchlorid- bzw. Cholinchlorid- modifizierter HBSS der gewünschten Zusammensetzung für 30min inkubiert. 5 Minuten vor Ende der Inkubationszeit wurde LDS 751 (Molecular Probes INC., Oregon, USA) in einer Endkonzentration von  $10^{-5}$ M hinzugefügt. Danach wurde die Zellsuspension aliquotiert und mit eiskalter modifizierter HBSS der gewählten Tonizität verdünnt. Nun wurde fNLPNTL-FITC in Konzentrationen von 0 und  $10^{-10}$  M bis  $10^{-7}$  M hinzugefügt, entweder mit oder ohne unmarkiertem fMLP in mindestens 1000 fachem Überschuss ( $10^{-4}$ M). 30 Minuten später wurde die Fluoreszenz des an den PMNL gebundenen fNLPNTL-FITC im Durchflußzytometer bestimmt. Die Intensität wurde im linearen Modus auf FL-1 gemessen, wobei die Detektion des LDS751 auf FL-3 eine Bestimmung der PMNL-Fraktion ermöglichte. Die spezifische Bindung des fNLPNTL-FITC wurde aus der Differenz der Fluoreszenzintensitäten in An- bzw. Abwesenheit von unmarkiertem fMLP berechnet.

### **3.2.5. Bestimmung der intrazellulären Calciumionenkonzentration**

Um die relativen Veränderungen der intrazellulären Calciumionenkonzentration nachzuweisen, wurden die Fluoreszenzintensitäten des calciumsensitiven Farbstoffes Fluo-3 und dem Farbstoff SNARF-1 an seinem isoemissiven Punkt mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt (Rijkers et al., 1990). Um die Zellen mit Fluo-3 bzw. SNARF-1 zu beladen, wurden Acetoxy-Methylesterderivate der Farbstoffe in einer Endkonzentration von  $5 \times 10^{-6}$ M bzw.  $1 \times 10^{-6}$ M auf  $10^6$  Zellen/ml gegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen des Versuchansatzes mit Natriumchlorid- bzw. Cholinchlorid- modifizierter HBSS der gewünschten Osmolarität und einer weiteren Inkubationsdauer von 10 Minuten

wurden die Zellen mit fMLP in  $10^{-8}$  bzw.  $10^{-7}$ M Endkonzentration stimuliert. Die Kinetik der Fluoreszenzsignale wurde abwechselnd für Fluo-3 über den Fluoreszenzkanal FL-1 und für SNARF-1 über den Fluoreszenzkanal FL-3 detektiert und mit Hilfe der CHRONYS Software (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) ausgewertet. Aus diesen Werten wurde das Verhältnis der beiden Fluoreszenzintensitäten zueinander berechnet, um so zellvolumenbedingten Änderungen des Fluo-3-Signals zu eliminieren.

### **3.2.6. Rezeptorunabhängige Hochregulation der Adhäsionsmolekülexpression durch synthetische Stimuli**

Um eine vom Rezeptor unabhängige Wirkung von Natriumchlorid- bzw. Cholinchlorid-modifizierter HBSS auf die Adhäsionsmolekülexpression zu untersuchen, wurden ebenfalls PMNL isoliert, inkubiert und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Der intrazelluläre Signalweg des Calciumionen/Kalmodulinkinase-Systems wurde mit Hilfe des Ionophors A23187 untersucht. Hierzu wurden die separierten PMNL in HBSS der gewünschten Osmolarität für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Zugabe von A23187 in halbmaximaler ( $10^{-6}$ M) bzw. maximaler ( $10^{-7}$ M) Endkonzentration und einer weiteren Inkubationszeit von 15 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen dann mit dem monoklonalen Antikörper IB<sub>4</sub> markiert und im Durchflusszytometer vermessen. Der Signalweg des DAG über die Protein Kinase C (PKC) wurde mit Hilfe des direkten Stimulans der PKC Phorbolmyristatactat (PMA) untersucht. Hierzu wurde analog zum Nachweis des Calmodulinkinase-Signalweges vorgegangen. Das PMA wurde in einer halbmaximalen Konzentration von  $10^{-6}$ M bzw. maximalen Endkonzentration von  $10^{-5}$ M hinzugegeben und bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten inkubiert.

### 3.2.7. Bestimmung der MAPKinasen p38RK und p44/42

Der Nachweis der aktivierungs-abhängigen Phosphorylierung der MAPKinasen p38RK und ERK-1/2 wurde mittels Westernblot und Immunoblot durchgeführt.

Die PMNL wurden mit Dextran separiert und über einen Percoll-dichtegradienten aufgetrennt. Es wurde eine Zellzahl von  $10^7$  Zellen/ml pro Versuchsansatz verwendet. Nach Inkubation der Zellen im gewünschten HBSS-Medium für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  wurde fMLP in einer Endkonzentration von  $10^{-7}$  M für 2 Minuten als Stimulus hinzugefügt. Die Stimulation wurde abgebrochen, indem die zehnfache Menge an eiskaltem Inkubationsmedium pro Versuchsansatz zugegeben wurde. Anschließend erfolgte eine rasche Zentrifugation der Zellsuspension für 30 Sekunden bei 10000 G und  $0^\circ\text{C}$ , die Entnahme des Überstandes und die Resuspension des Zellpellets mit Lysepuffer. Nach einer Lysezeit von 15 Minuten bei  $0^\circ\text{C}$ , in der die Proben zusätzlich viermal für 15 Sekunden in ein gekühltes Ultraschallbad getaucht wurden, wurde der Zelldetritus abzentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde zur Proteinbestimmung verwendet, der Rest der Proben aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Proben wurden kurz vor der Elektrophorese aufgetaut und mit reduzierendem Laemmli-Puffer für 5 Minuten gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein 10% SDS-Trenngel in einer vertikalen Elektrophorese. Um eine gute Signalqualität zu erhalten, wurden zum Nachweis der Phospho-p38RK eine Gesamtproteinmenge von  $200\mu\text{g}$  pro Versuchsansatz bzw.  $60\mu\text{g}$  bei der Phospho-ERK-1/2 eingesetzt. Die Übertragung der aufgetrennten Proteine erfolgte in einem Westernblotsystem auf Nitrozellulose. Vor dem anschließenden Immunoblot wurde eine Kontrolle des

Transfers mittels PonceauS durchgeführt und die Nitrozellulose so in Streifen geschnitten, dass die Versuchsansätze einzeln in Inkubationsbahnen weiter behandelt werden konnten. Nach einer Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen für 1 Stunde mit Blockierungspuffer und anschließendem Waschen der Nitrozellulosestreifen mit Waschpuffer (Tween20 modifizierte TBS) wurde als Erstantikörper ein Anti-Phospho-p38RK-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 oder ein Anti-Phospho-ERK-1/2-Antikörper in einer Verdünnung von 1:4000 auf die Streifen pipettiert. Die Antikörper wurden über Nacht unter leichter Bewegung bei Raumtemperatur belassen. Nach dreimaligem Waschen der Streifen mit oben genanntem Waschpuffer wurde ein mit Meerrettichperoxidase markierter Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 für eine Stunde bei Raumtemperatur hinzugefügt. Nach erneutem Waschen wurde nun für 1 Minute LumiGlo<sup>®</sup>-Reagenz hinzugegeben und Röntgenfilme mit den lumineszierenden Nitrozellulosestreifen in der Dunkelkammer für 30 Sekunden oder 2 Minuten belichtet. Nach Entwicklung der Filme wurde eine densitometrische Auswertung mittels einer Digitalkamera und der dazugehörigen Software vorgenommen. Es wurde die optische Dichte der Banden pro Quadratmillimeter bestimmt, die gegen das Hintergrundrauschen korrigiert wurde.

### **3.2.8. Statistische Auswertung**

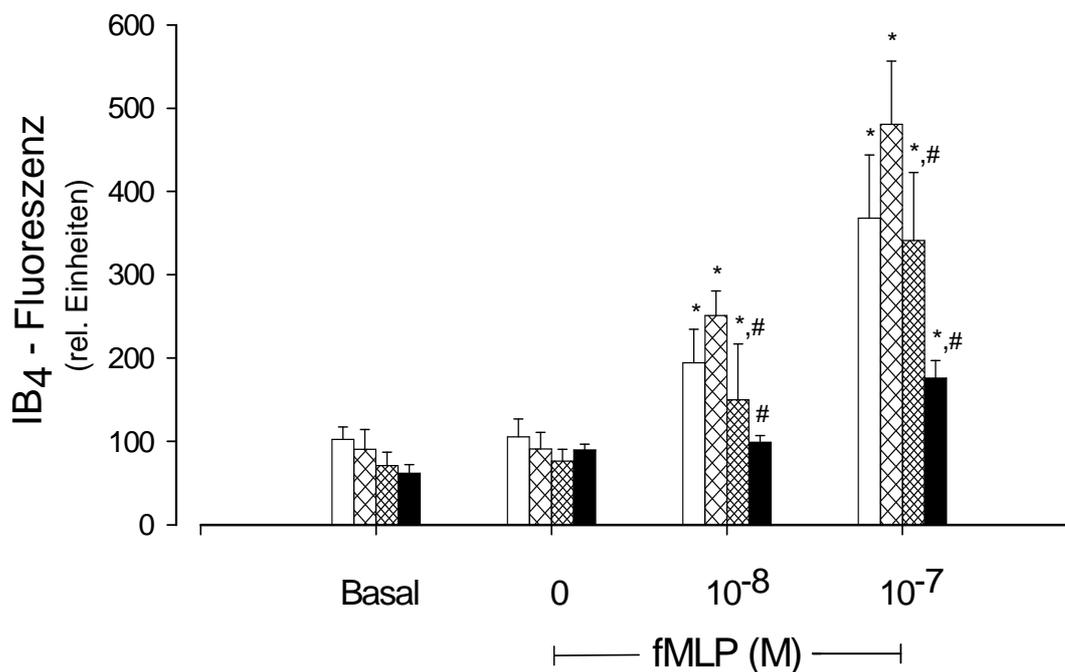
Alle Daten wurden auf ihre Normalverteilung durch den Kolmogorov-Smirnov Test geprüft. Lag eine Normalverteilung vor, wurden die Effekte der Inkubationbedingungen mittels one-way ANOVA analysiert. Eine Signifikanz wurde nach Bonferroni korrigiert. Zum Vergleich der densitometrischen Werte der MAPKinasenphosphorylierung wurde ein gepaarter T-Test angewendet und das Signifikanzniveau ebenfalls nach Bonferroni korrigiert. Die normalverteilten Daten

sind in den Abbildungen als Mittelwerte  $\pm$  der Standardabweichung (SD) dargestellt. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des SPSS-Programms 4.0 (SPSS INC, Chicago, IL, USA) errechnet.

## 4. Ergebnisse

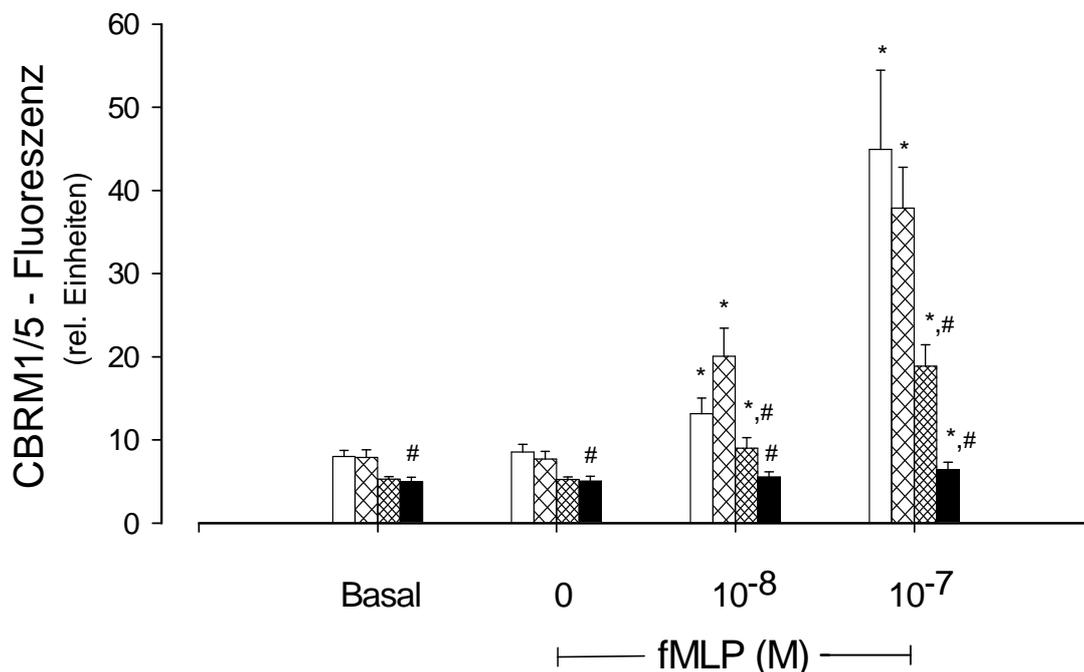
### 4.1. Effekte von Natriumchlorid modifizierter HBSS auf die fMLP-stimulierte Expression von Adhäsionsmolekülen

Vergleicht man die basale Expression der  $\beta_2$ -Integrine, die unmittelbar nach Blutentnahme bestimmt wurde, mit der  $\beta_2$ -Integrinexpression nach 45 minütiger Inkubation der Zellen in Natriumchlorid - modifizierter HBSS ohne Stimulation (fMLP 0 M), so zeigte sich kein statistisch signifikanter Effekt der Tonizität des HBSS – Mediums auf die Expression der  $\beta_2$ -Integrine (**Abb. 3A**). Wurden die Zellen in normotonem Medium für 30 Minuten inkubiert und anschließend durch fMLP in Konzentrationen von  $10^{-8}$  M bzw.  $10^{-7}$  M für weitere 15 Minuten stimuliert, so nahm die Expression der  $\beta_2$ -Integrine halbmaximal bzw. maximal zu. Bei einer fMLP Konzentration von  $10^{-6}$  M wurde keine weitere Steigerung der  $\beta_2$ -Integrinexpression beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die fMLP-stimulierbare numerische Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine wurde durch HBSS-Lösung mit aufsteigender NaCl abhängiger Osmolarität zunehmend gehemmt (**Abb. 3A**).



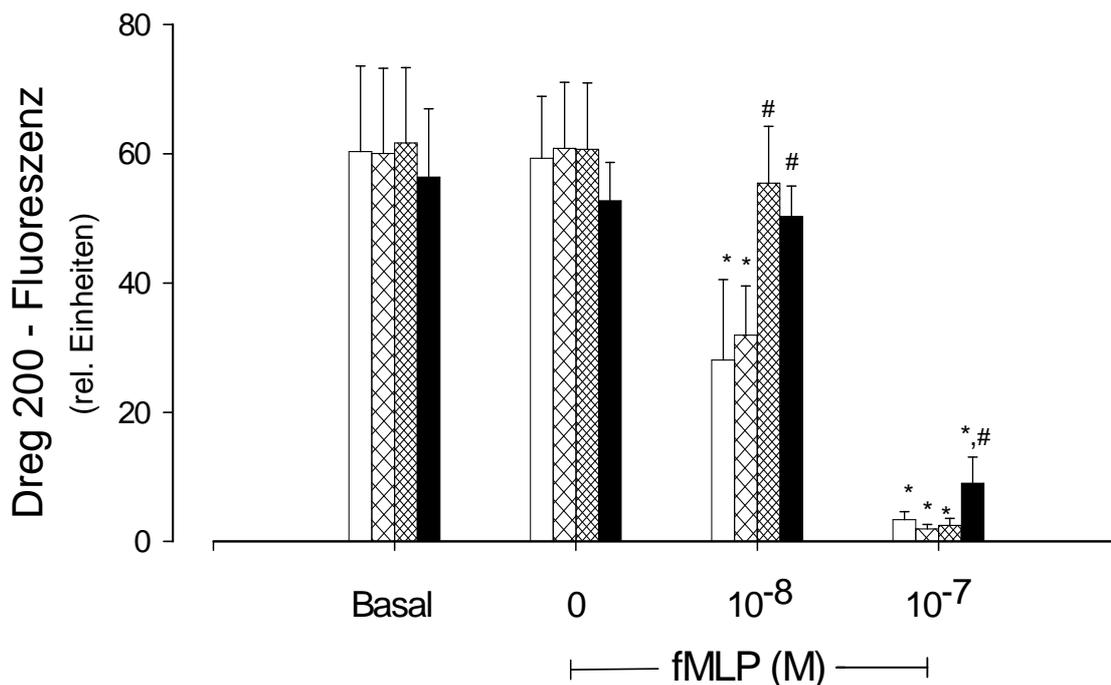
**Abb. 3A:** Wirkung von Natriumchlorid-modifizierter HBSS auf die basale und fMLP-stimulierte numerische Expression der  $\beta_2$ -Integrine. Die Bestimmung der  $\beta_2$ -Integrinexpression erfolgte nach Markierung der Zellen mit dem FITC markierten monoklonalen Antikörper IB<sub>4</sub> und der Durchflusszytometrie. Die basale Expression wurde unmittelbar nach Blutentnahme bestimmt. Nach Inkubation der Zellen für 30 min bei 37°C erfolgte die weitere Inkubation in Ab- bzw. Anwesenheit des chemotaktischen Tripeptids fMLP (0, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup> M). Die Osmolarität des HBSS Medium wurde durch Modifikation des Anteils an Natriumchlorid modifiziert und war auf folgende Werte in mosmol/l eingestellt: offene Säulen: 230; großkarierte Säulen: 290; feinkarierte Säulen: 350 und schwarze Säulen: 410. N = 6, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \*: p < 0,05 verglichen gegen fMLP 0M, #: p < 0,05 verglichen gegen 290 mosmol/l.

Die Stimulation der PMNL mit fMLP bewirkte nicht nur eine Zunahme der Zahl der  $\beta_2$ -Integrine auf der Zelloberfläche, sondern auch eine funktionelle Hochregulation, erkennbar an der Steigerung der Bindung des Antikörpers CBRM 1/5, der in der Lage ist, eine Neoepitop zu erkennen, welches in Folge einer aktivierungsabhängigen Konformationsänderung des  $\beta_2$ -Integrins CD11b/CD18 exprimiert wird (**Abb. 3B**). Die funktionelle Hochregulation von CD11b/CD18 wurde durch hypertone NaCl-modifizierte HBSS stark gehemmt (**Abb. 3B**).



**Abb. 3B:** Wirkung von Natriumchlorid-modifizierter HBSS auf die basale und fMLP-stimulierbare funktionelle Expression des  $\beta_2$ -Integrins CD11b/CD18. Die Bestimmung der funktionellen  $\beta_2$ -Integrinexpression erfolgte nach Markierung der Zellen mit dem Antikörper CBRM1/5 und einem fluoreszierendem Sekundärantikörper mittels Durchflusszytometrie. Für die Erklärung der Inkubationsbedingungen siehe Legende Abb. 3A. N = 6, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \*:  $p < 0,05$  verglichen gegen fMLP 0M, #:  $p < 0,05$  verglichen gegen 290 mosmol/l.

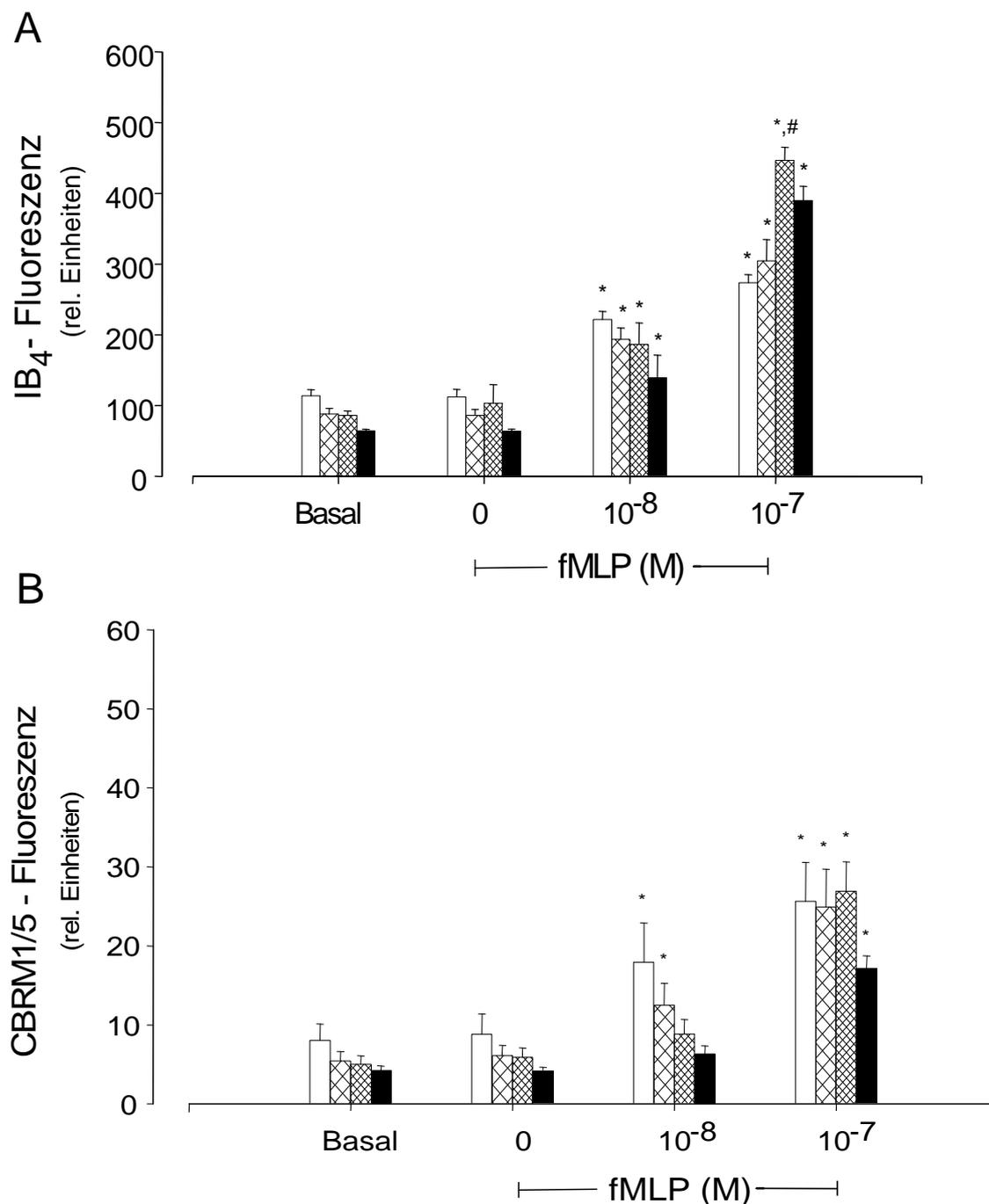
Im Gegensatz zur numerischen und funktionellen Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine, bewirkte die Stimulation der PMNL mit fMLP in Konzentrationen von  $10^{-8}$  M und  $10^{-7}$  M unter normotonen Bedingungen eine Abnahme der L-Selektine um die Hälfte bzw. einen maximalen Verlust (**Abb. 3C**). Die mit fMLP stimulierbare halb-maximale Reduktion der L-Selektinexpression ( $10^{-8}$  M) konnte mit hypertoner Natriumchlorid modifizierter HBSS nahezu vollständig unterdrückt werden, während bei maximaler Stimulation ( $10^{-7}$  M) die HBSS der höchsten Tonizität nur mehr einen geringen Hemmeffekt hatte.



**Abb. 3C:** Wirkung von Natriumchlorid-modifizierter HBSS auf die basale und fMLP-stimulierbare Reduktion der Expression der L-Selektine. Die Bestimmung der L-Selektinexpression erfolgte nach Markierung der Zellen mit dem FITC markierten monoklonalen Antikörper Dreg 200 und der Durchflusszytometrie. Für die Erklärung der Inkubationsbedingungen siehe Legende Abb. 3A. N = 6, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \*:  $p < 0,05$  verglichen gegen fMLP 0M, #:  $p < 0,05$  verglichen gegen 290 mosmol/l.

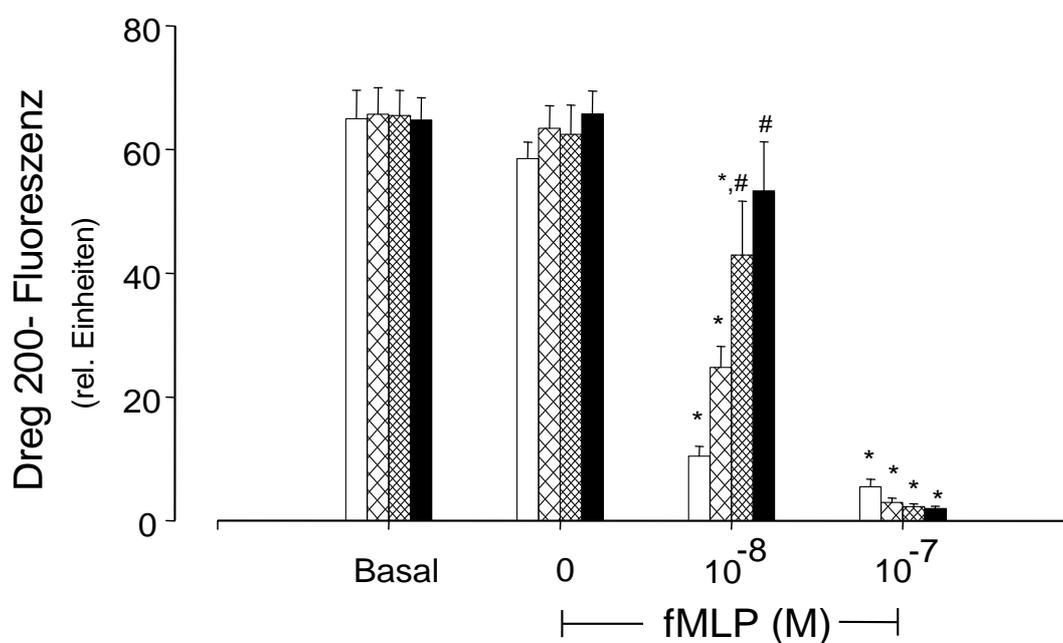
#### 4.2. Effekte von Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die fMLP-abhängige Expression der Adhäsionsmoleküle

Zu Klärung der Frage, ob die beobachteten Hemmeffekte Natriumchlorid modifizierter HBSS auf einer für das Natriumion spezifischen Wirkung beruht, wurden die gleichen Versuche wie in Abb. 3A-C dargestellt, mit HBSS-Lösungen durchgeführt, in welchen das einfach positiv geladene Natriumion durch das ebenfalls einfach positiv geladene Cholinion ersetzt wurde. Dabei führte die Inkubation der PMNL mit aufsteigenden Osmolaritäten Cholinchlorid-modifizierter HBSS zu keinen statistisch signifikanten Hemmeffekten weder auf die basale noch auf die fMLP-abhängige numerische (**Abb. 4 A**) oder funktionelle Hochregulation (**Abb. 4 B**) der  $\beta_2$ -Integrine.



**Abb. 4:** Effekt von Cholinchlorid-modifizierter HBSS auf die basale und fMLP-stimulierte numerische **(A)** und funktionelle **(B)** Expression der  $\beta_2$ -Integrine. Die Bestimmung der  $\beta_2$ -Integrinexpression erfolgte nach Markierung der Zellen mit dem FITC markiertem monoklonalem Antikörper IB<sub>4</sub> bzw. CBRM1/5 und FITC markiertem Sekundär-Antikörper und der Durchflusszytometrie. Zur Modifikation der Osmolarität der HBSS wurde anstelle von Natriumchlorid Cholinchlorid verwendet. Für die weitere Erklärung der Inkubationsbedingungen siehe Legende Abb. 3A. N = 6, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \*:  $p < 0,05$  verglichen gegen fMLP 0M, #:  $p < 0,05$  verglichen gegen 290 mosmol/l.

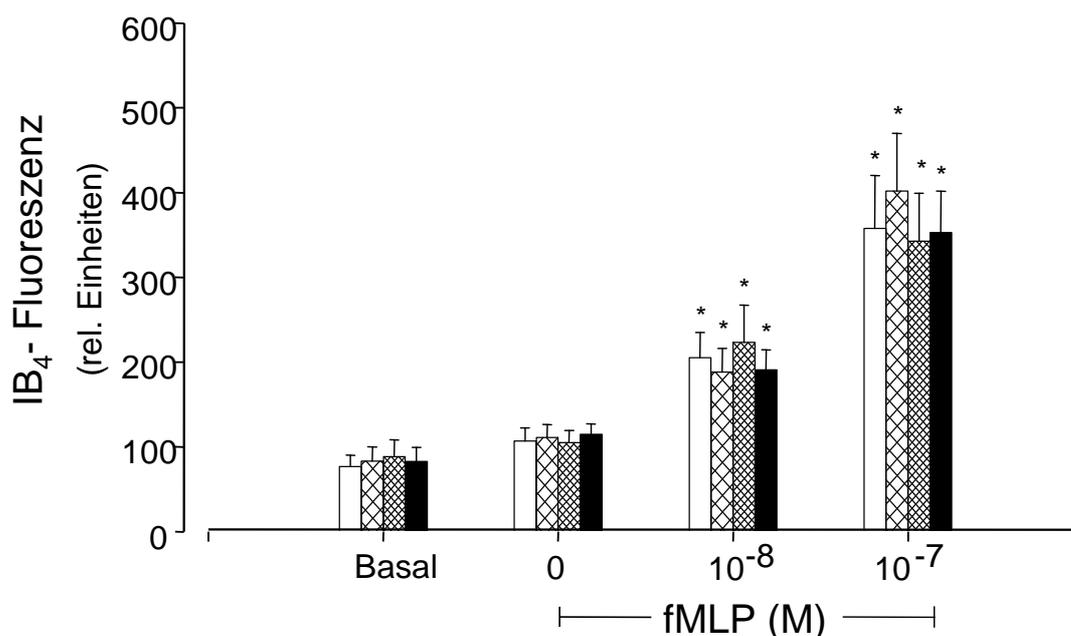
Im Gegensatz zum fehlenden Hemmeffekt hypertoner Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die fMLP-stimulierte numerische und funktionelle  $\beta_2$ -Integrin Hochregulation bewirkte Cholinchlorid modifizierte hypertone HBSS eine signifikante Reduktion des Verlustes der L-Selektinexpression bei halbmaximaler Stimulation der PMNL mit fMLP ( $10^{-8}$  M). Bei maximaler Aktivierung der Zellen ( $10^{-7}$  M) konnte jedoch kein Hemmeffekt auf das „Shedding“ der L-Selektine mehr beobachtet werden. (**Abb. 4C**)



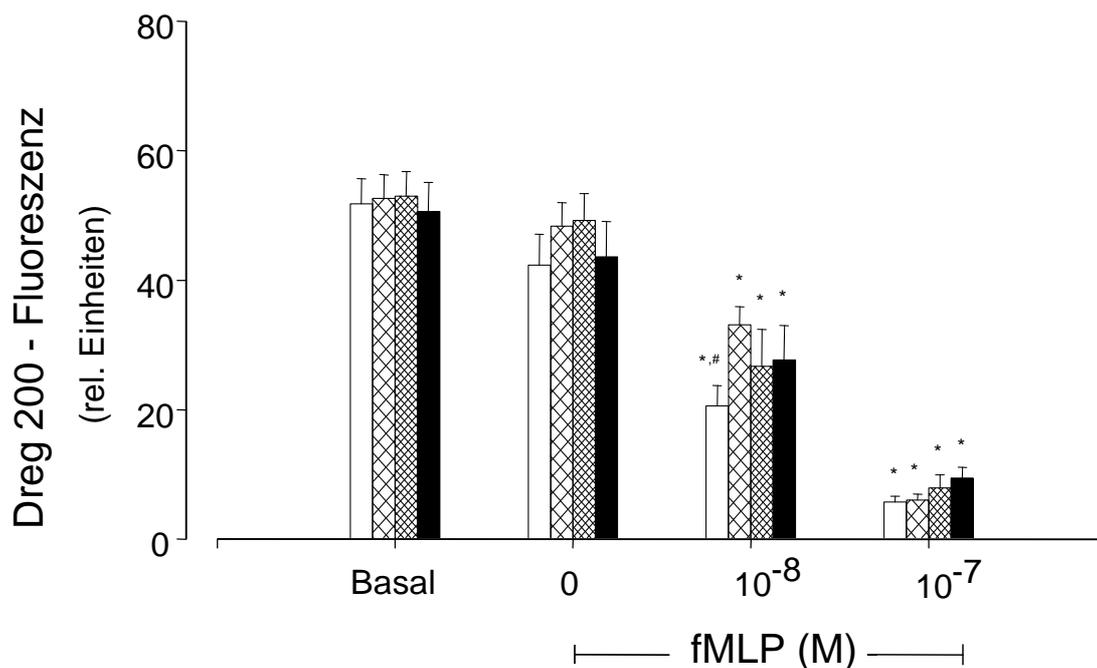
**Abb. 4C:** Effekte Cholinchlorid-modifizierter HBSS auf die basale und die fMLP-stimulierbare Reduktion der Expression der L-Selektine. Die Bestimmung der L-Selektinexpression erfolgte nach Markierung der Zellen mit dem FITC markierten monoklonalen Antikörper Dreg 200 und der Durchflusszytometrie. Für die Erklärung der Inkubationsbedingungen siehe Legende Abb. 3 A. N = 6, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \*:  $p < 0,05$  verglichen gegen fMLP 0M, #:  $p < 0,05$  verglichen gegen 290 mosmol/l.

#### 4.3. Effekte von Mannitol modifizierter HBSS auf die fMLP-abhängige Expression der Adhäsionsmoleküle

Um den Einfluss einer Erhöhung der Tonizität des Inkubationsmediums weitgehend unabhängig von den Elektrolyten im Extrazellularraum zu machen, wurde die Osmolarität in der HBSS mit zellwand impermeablem Mannitol modifiziert. Wie anhand Abb. 5 A und 5 B ersichtlich hatte die mit Mannitol modifizierten hypertone HBSS- Lösung keinen Effekt weder auf fMLP-stimulierte Hochregulation der Zahl der  $\beta_2$ - Integrine noch der Zahl der L-Selektine.



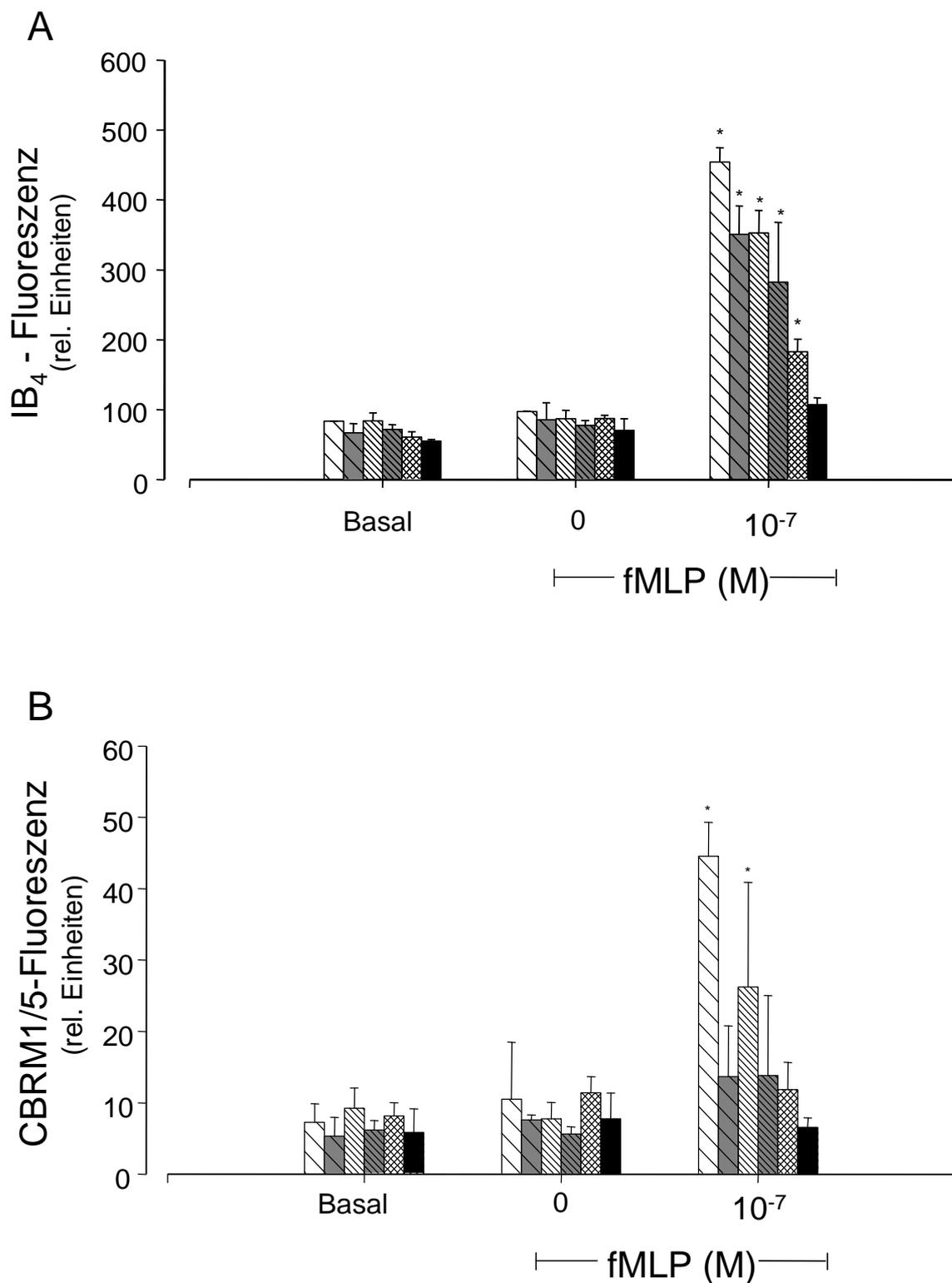
**Abb. 5A:** Effekt von Mannitol-modifizierter HBSS auf die basale und fMLP-stimulierte numerische Expression der  $\beta_2$ -Integrine. Die Bestimmung der  $\beta_2$ -Integrinexpression erfolgte nach Markierung der Zellen mit dem FITC markiertem monoklonalem Antikörper IB<sub>4</sub> und der Durchflusszytometrie. Zur Modifikation der Osmolarität der HBSS-Lösung wurde anstelle von Natriumchlorid Mannitol verwendet. Für die weiter Erklärung der Inkubationsbedingungen siehe Legende Abb. 3A. N = 6, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \*: p < 0,05 verglichen gegen fMLP 0M, #: p < 0,05 verglichen gegen 290 mosmol/l.



**Abb. 5B:** Effekt von Mannitol modifizierter HBSS auf die basale und die fMLP-stimulierbare Reduktion der Expression der L-Selektine. Die Bestimmung der L-Selektinexpression erfolgte nach Markierung der Zellen mit dem FITC markierten monoklonalen Antikörper Dreg 200 und der Durchflusszytometrie. Zur Modifikation der Osmolarität der HBSS wurde anstelle von Natriumchlorid Mannitol verwendet. Für die Erklärung der Inkubationsbedingungen siehe Legende Abb. 3A. N = 6, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \*:  $p < 0,05$  verglichen gegen fMLP 0 M, #:  $p < 0,05$  verglichen gegen 290 mosmol/l.

#### 4.4. Einfluss von Amilorid auf die fMLP-stimulierte Expression der $\beta_2$ -Integrine

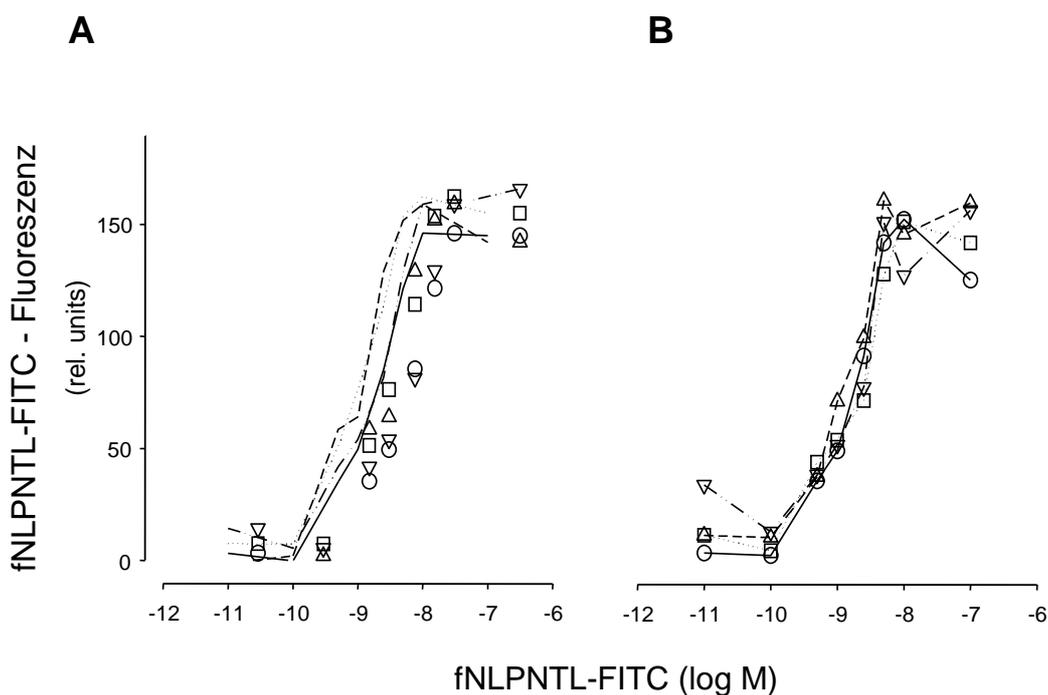
Amilorid ist ein potenter Hemmstoff des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiports und verhindert bei hyperton geschrumpften Zellen einen extra-/intrazellulären Ausgleich der Natriumkonzentration und damit die Wiederherstellung des initialen Zellvolumens. Abbildung 6A zeigt den Einfluss von Amilorid auf den Hemmeffekt von hyperosmolarer HBSS-Lösung auf die fMLP-stimulierte numerische Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine. Wie zu erwarten führt die Stimulation der Zellen mit fMLP zu einer deutlichen Erhöhung der  $\text{IB}_4$ -Fluoreszenz, wobei die fMLP-stimulierte Hochregulation mit wachsender Tonizität des Mediums abnimmt. In Anwesenheit von Amilorid wird dieser Effekt nicht aufgehoben, sondern verstärkt (**Abb. 6A**). Ebenfalls kann Amilorid die Hemmung der fMLP-stimulierten funktionellen Hochregulation des  $\beta_2$ -Integrins CD11b/CD18 nicht aufheben (**Abb. 6B**).



**Abb. 6:** Effekte Natriumchlorid-modifizierter HBSS auf die basale und fMLP-stimulierte numerische **(A)** und funktionelle **(B)** Expression der  $\beta_2$ -Integrine in An- bzw. Anwesenheit von  $10^{-3}$ M Amilorid. Die Bestimmung der  $\beta_2$ -Integrinexpression erfolgte nach Markierung der Zellen mit dem FITC markiertem monoklonalem Antikörper IB<sub>4</sub> bzw. CBRM1/5 und FITC markiertem Sekundär-Antikörper und der Durchflusszytometrie. Zur Modifikation der Osmolarität der HBSS wurde Natriumchlorid verwendet. Die Osmolaritäten waren wie folgt: Säulen mit grober Schraffierung: 290 mosmol/l; feine Schraffierung: 350 mosmol/l und feinkarierte Säulen: 410 mosmol/l. Die jeweils in dunklem Grau hinterlegten Säulen bzw. die schwarze Säule stellen in Anwesenheit von Amilorid erhobene Messwerte dar. N = 6, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \*: p < 0,05 verglichen gegen fMLP 0M.

#### 4.5. Einfluss von Natrium- bzw. Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die Bindung von fNLPNTL-FITC.

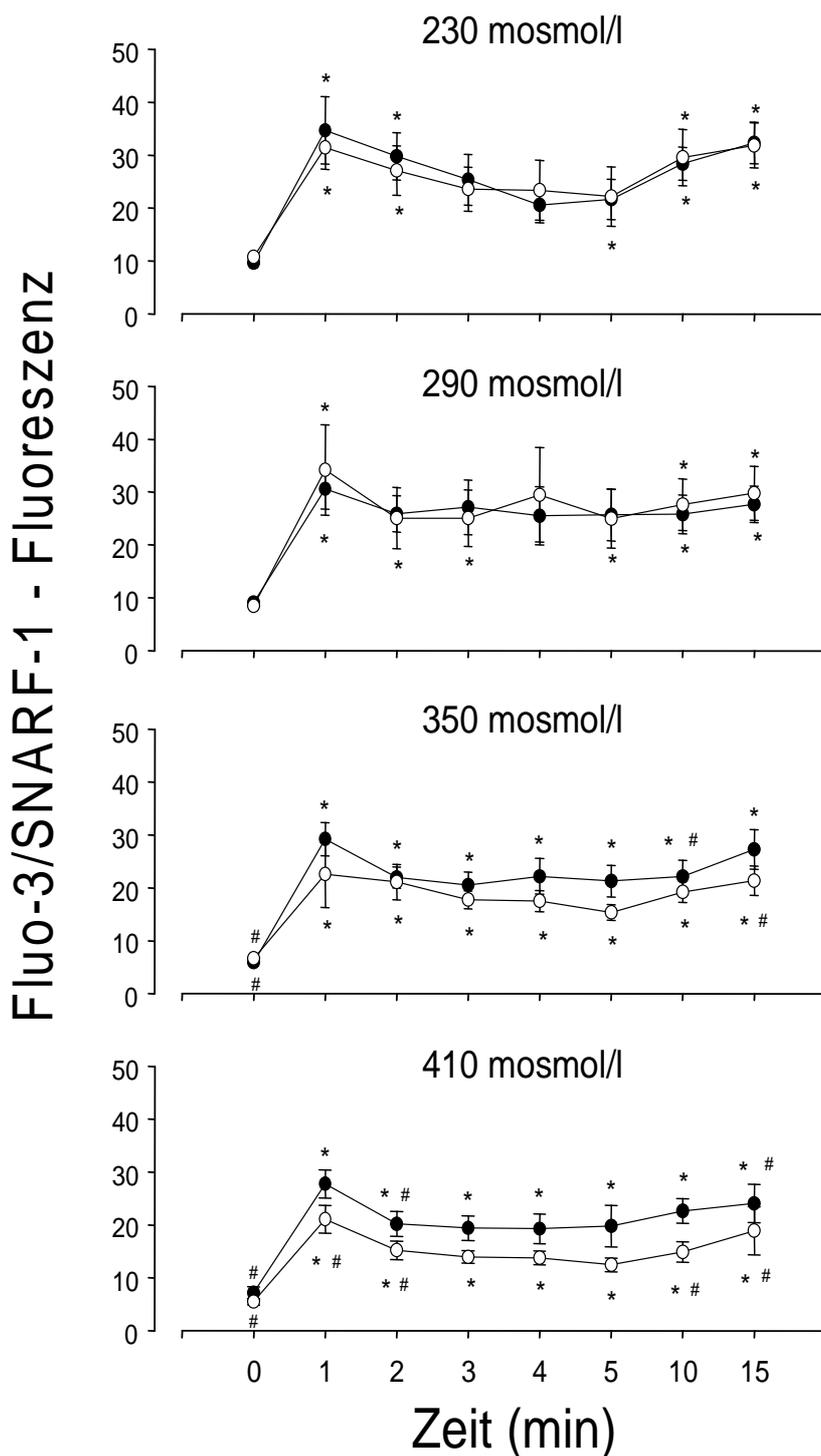
Um einen Effekt hypertoner Lösungen auf die Bindung von bakterieller N-formylierter chemotaktisch wirksamer Peptide an isolierte PMNL aufzuzeigen, wurde die spezifische Bindung von FITC-markiertem fNLPNTL an isolierte PMNL in Natrium- bzw. Cholinchlorid modifizierter HBSS bestimmt. Wie in **Abb. 7** gezeigt, wurde eine halbmaximale Sättigung von fNLPNTL-FITC bei  $2\text{-}3 \times 10^{-9}$  M sowohl für Natrium- als auch für Cholinchlorid modifizierte isoosmolarer HBSS erreicht, eine maximale Bindung war bei  $10^{-8}$  M des fMLP-Analogon zu erzielen. Weder die Osmolarität der gewählten Lösungen noch die Art des gewählten Kations hatten einen Einfluss auf die spezifische fNLPNTL Bindung.



**Abb. 7:** Vergleich der Effekte von Natriumchlorid- (**A**) und Cholinchlorid- (**B**) modifizierter HBSS auf die fMLP Rezeptorbindung. Heparinisiertes Blut wurde mit den Lösungen gewünschter Zusammensetzung und Osmolarität inkubiert und die spezifische Bindung von fNLPNTL-FITC wie unter Material und Methodik beschrieben bestimmt. Die Osmolaritäten (mosmol/l) der Lösungen waren wie folgt:  $\circ$ :230;  $\square$ :290;  $\triangle$ : 350;  $\nabla$ : 410; Die Symbole zeigen jeweils den Mittelwert von 5 Messungen mit Zellen von 5 gesunden Personen.

#### 4.6. Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration

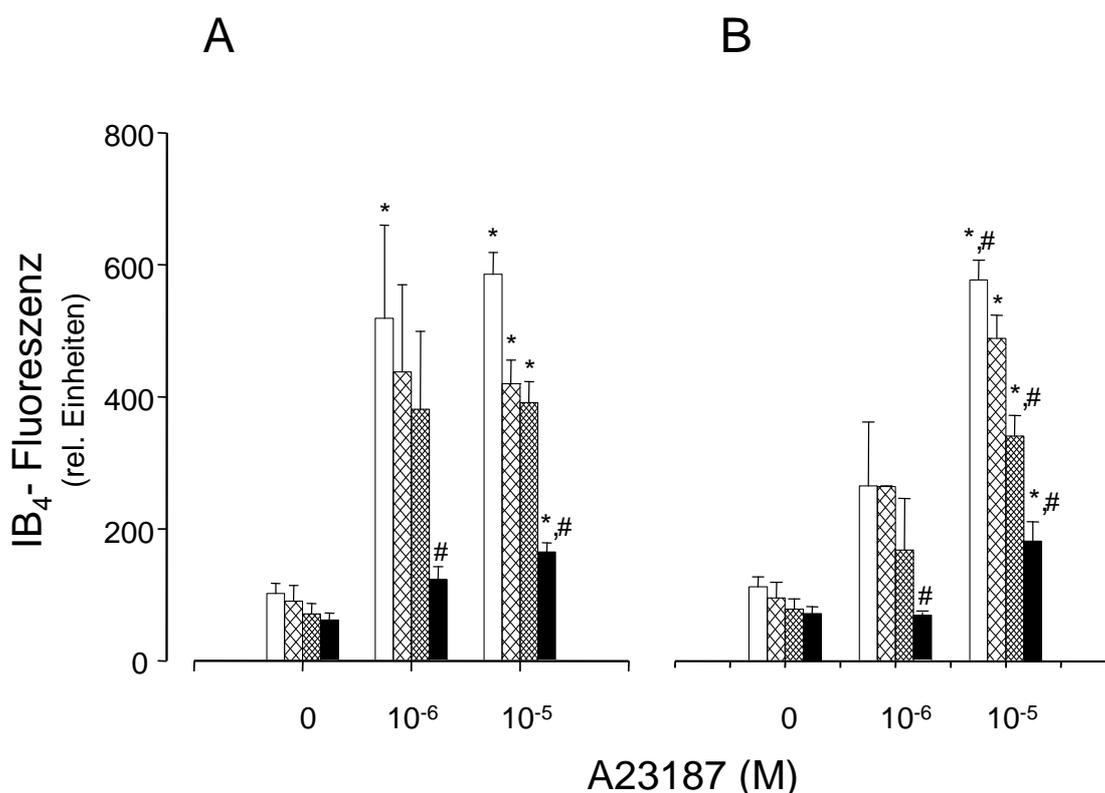
Die Analyse der Kinetik der intrazellulären Konzentrationen an ionisiertem Calcium (**Abb. 8**) wurde anhand des zeitlichen Verlauf des Fluo-3/SNARF-1 Verhältnisses bestimmt und zeigt für alle Osmolaritäten und Natrium- oder Cholinchlorid modifizierten HBSS – Lösungen einen biphasischen Verlauf nach Stimulation der PMNL mit fMLP. Eine maximale Zunahme des Fluo-3/SNARF-1 Verhältnisses wurde 1 Minute nach fMLP Stimulation gemessen, gefolgt von einer transienten Abnahme und erneuten Steigerung gegen Ende des Beobachtungszeitraumes. Für beide Arten von HBSS-Lösungen trat bei den höheren Osmolaritäten von 350 bzw. 410mosm/l eine teilweise signifikante Verminderung der Zunahme der Calciumionenkonzentration im Vergleich zu isoosmolaren Lösungen auf. Zwischen der Natrium- oder der Cholinchlorid modifizierten HBSS-Lösung ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Wirkung auf die Höhe oder die Kinetik der fMLP-stimulierten intrazellulären Calciumkonzentrationen.



**Abb. 8:** Vergleich der Effekte von Natriumchlorid- (●) und Cholinchlorid (○)- modifizierter HBSS auf die basale und fMLP-stimulierte intrazelluläre Calciumkonzentration. Die Zellen wurden wie unter Material und Methodik beschrieben mit Fluo-3/SNARF beladen, in den entsprechenden Medien inkubiert und mit fMLP ( $10^{-7}$  M) stimuliert. Die Kinetik des Fluoreszenzverhältnisses zwischen Fluo-3 und SNARF wurde per Durchflusszytometrie bestimmt. Zum Zeitpunkt 0 wurde der Basalwert bestimmt. Danach ist die Zeit in Minuten nach fMLP Stimulation angegeben. N=6, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \* :  $p < 0,05$  bezogen auf den Zeitpunkt 0 min, # :  $p < 0,05$  bezogen auf 290 mosmol/l.

#### 4.7. Effekte von Natrium- und Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die Ionophor A23187-abhängige Expression der $\beta_2$ -Integrine

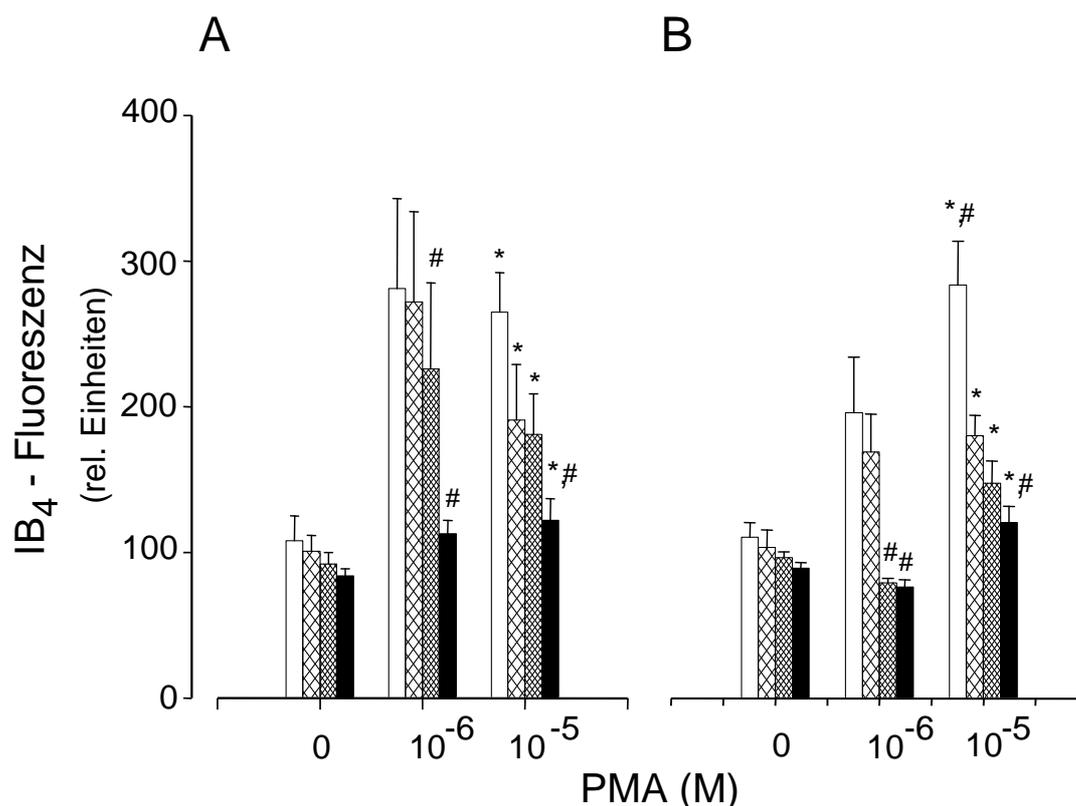
Nach Stimulation mit dem Calciumionophor A23187 in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M fand unter isoosmolaren Bedingungen eine halbmaximale bzw. eine maximale Hochregulation der Zahl der  $\beta_2$ -Integrine auf den PMNL statt (**Abb. 9**). Die Ionophor stimulierte Steigerung der numerischen  $\beta_2$ -Integrinexpression wurde sowohl durch hypertone Natrium- (**Abb. 9A**) als auch Cholinchlorid- (**Abb. 9B**) modifizierte HBSS signifikant gehemmt. Es ergab sich jedoch kein Unterschied im Hemmeffekt für das modifizierende Kation, d.h. weder Natriumchlorid noch Cholinchlorid hemmten die Stimulation durch A23187 signifikant mehr oder weniger.



**Abb. 9:** Vergleich der Effekte von Natriumchlorid-(**A**) und Cholinchlorid-(**B**) modifizierter HBSS auf die Ionophor A23187 induzierte numerische Expression der  $\beta_2$ -Integrine. Die Bestimmung der  $\beta_2$ -Integrinexpression erfolgte nach Markierung der Zellen mit dem FITC markierten monoklonalen Antikörper IB<sub>4</sub> und der Durchflusszytometrie. Für die weitere Erklärung der Inkubationsbedingungen siehe Legende Abb. 3A. N=6; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \*:  $p < 0,05$  vs. A23187 0 M; #:  $p < 0,05$  vs. 290 mosmol/l.

#### 4.8. Effekte von PMA auf die Natrium- und Cholinchlorid- abhängige Expression der $\beta_2$ -Integrine

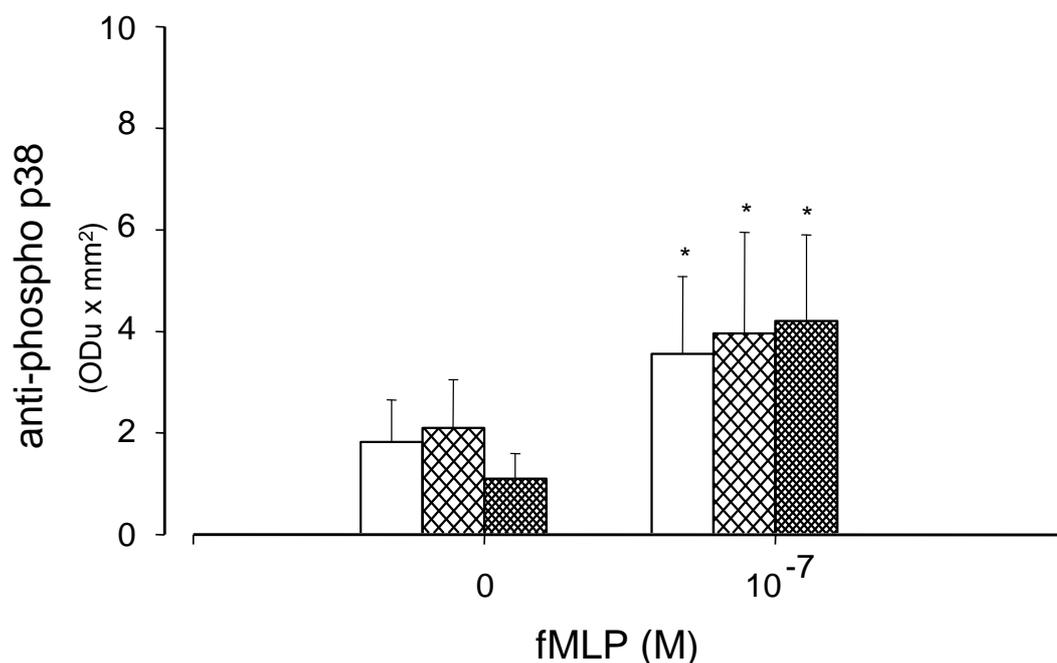
Nach Stimulation mit dem Proteinkinase C Aktivator Phorbolmyristataacetat (PMA) in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M fand unter isoosmolaren Bedingungen eine halbmaximale bzw. eine maximale Hochregulation der Zahl der  $\beta_2$ -Integrine auf den PMNL statt (**Abb. 10**). Die PMA stimulierte Steigerung der numerischen  $\beta_2$ -Integrinexpression wurde sowohl durch hypertone Natrium- (**Abb. 10A**) als auch Cholinchlorid- (**Abb. 10B**) modifizierte HBSS signifikant gehemmt. Es ergab sich kein Unterschied im Hemmeffekt für das modifizierende Kation, d.h. weder Natriumchlorid noch Cholinchlorid hemmten die Stimulation durch PMA signifikant mehr oder weniger.



**Abb. 10:** Vergleich der Effekte von Natriumchlorid-(A) und Cholinchlorid-(B) modifizierter HBSS auf die PMA induzierte numerische Expression der  $\beta_2$ -Integrine. Die Bestimmung der  $\beta_2$ -Integrinexpression erfolgte nach Markierung der Zellen mit dem FITC markierten monoklonalen Antikörper IB<sub>4</sub> und der Durchflusszytometrie. Für die weitere Erklärung der Inkubationsbedingungen siehe Legende Abb. 3A. N=6; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \*:  $p < 0,05$  vs. A23187 0M; #:  $p < 0,05$  vs. 290 mosmol/l.

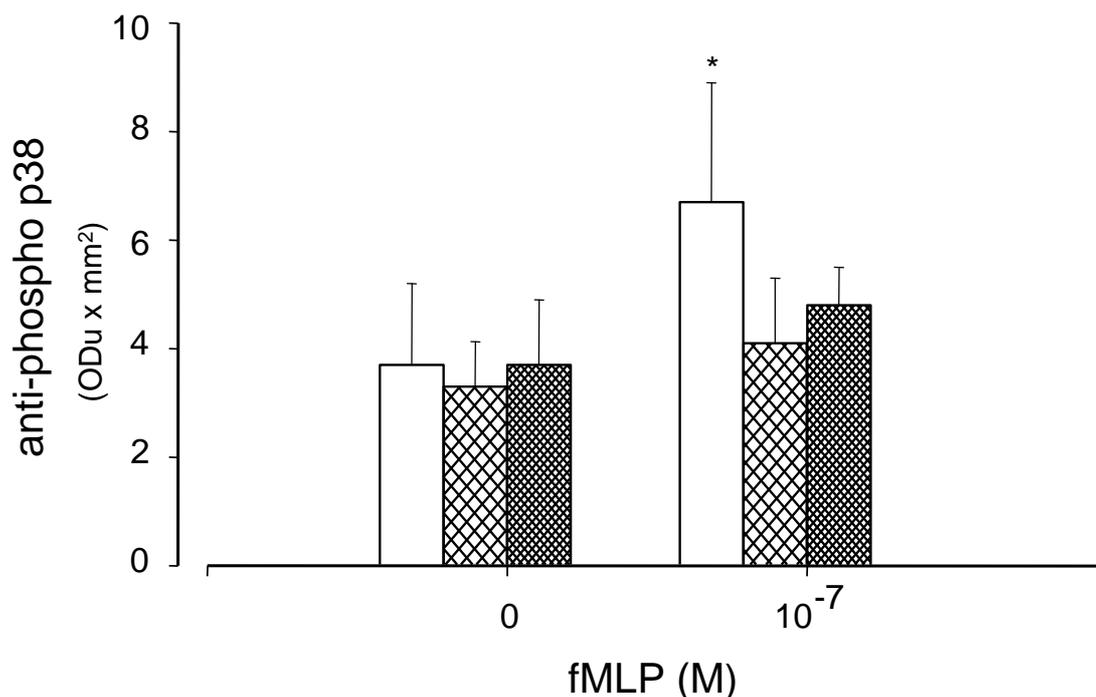
#### 4.9. Effekte von Natrium- und Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die fMLP-abhängige Phosphorylierung der MAPKinase p38 und ERK-1/2

Bei Inkubation von PMNL mit hypertoner Natrium- oder Cholinchlorid HBSS kam es im Vergleich zur isotonen Osmolarität von 290 mosmol/l weder bei 350 mosmol/l noch bei 410 mosmol/l zu einer Veränderung der Phosphorylierung der p38 MAPKinase. Erst nach Stimulation der Zellen mit fMLP  $10^{-7}$ M stieg der Grad der Phosphorylierung signifikant an. Bei einer Osmolarität von 350 mosmol/l ließ sich allerdings kein Unterschied zwischen der Natrium- oder Cholinchlorid modifizierten HBSS – Lösung bzw. im Vergleich zur isotonen Kontrolle erkennen (**Abb. 11A**).



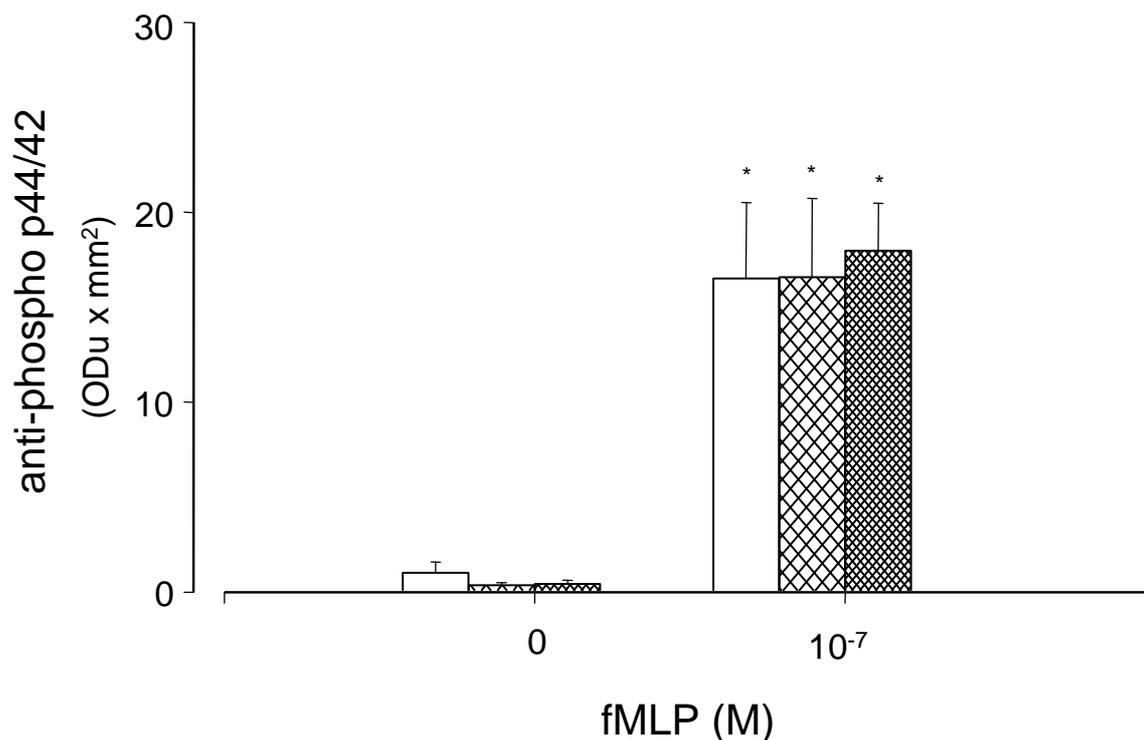
**Abb.11A:** Wirkung isoosmolarer und leicht hyperosmolarer (350 mosmol/l) Natriumchlorid- bzw. Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die Phosphorylierung der p38 MAPKinase in Ab- und Anwesenheit von fMLP. Die Inkubationsbedingungen und die Bestimmung der Phosphorylierung der p38 MAPK erfolgte wie in Material und Methodik beschrieben. Leere Säulen: 290 mosmol/l; grobkarierte Säulen: 350 mosmol/l NaCl-modifizierte HBSS; feinkarierte Säulen: 350 mosmol/l ChCl-modifizierte HBSS. N = 6; MW  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$  vs. fMLP 0 M.

Im Gegensatz dazu bewirkte eine weitere Erhöhung der Tonizität auf 410 mosmol/l eine signifikante Hemmung der Phosphorylierung der p38 MAPKinase im Vergleich zu den Werten der stimulierten isoosmolaren Kontrolle. Dabei war der Hemmeffekt der hypertonen Lösungen unabhängig davon, ob Natriumchlorid oder Cholinchlorid zur Modifikation der Osmolarität verwendet wurde (**Abb. 11B**).



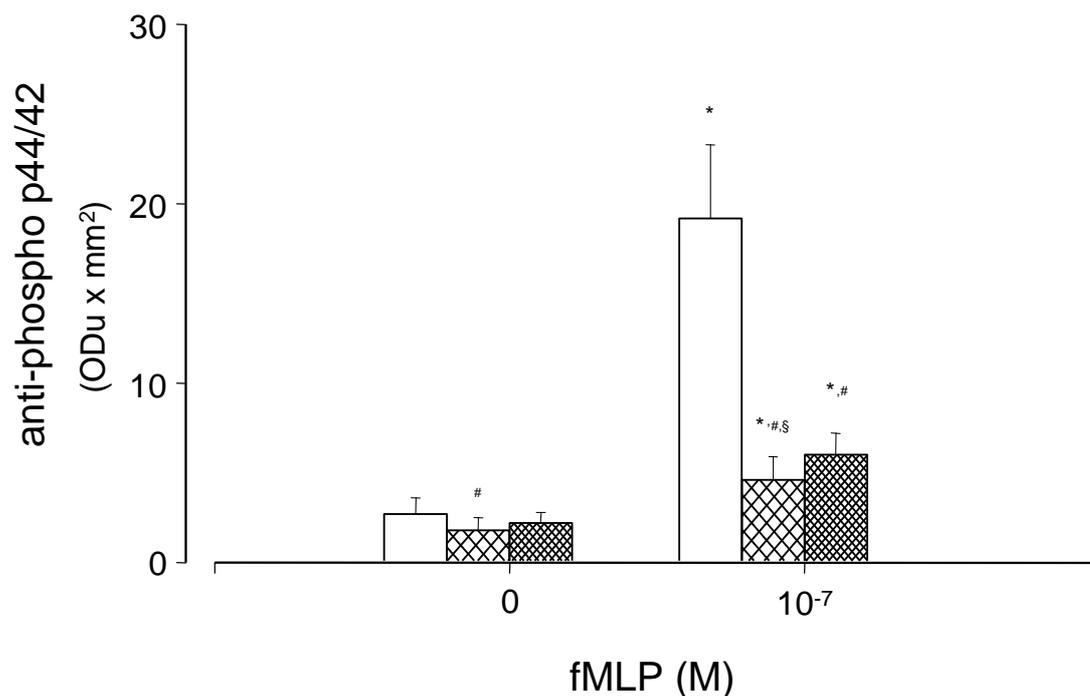
**Abb.11B:** Wirkung isoosmolarer und stärker hyperosmolarer (410 mosmol/l) Natriumchlorid- bzw. Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die Phosphorylierung der p38 MAPKinase in Ab- und Anwesenheit von fMLP. Die Inkubationsbedingungen und die Bestimmung der Phosphorylierung der p38 MAPK erfolgte wie in Material und Methodik beschrieben. Leere Säulen: 290 mosmol/l; grobkarierte Säulen: 410 mosmol/l NaCl-modifizierte HBSS; feinkarierte Säulen: 410 mosmol/l ChCl-modifizierte HBSS. N = 6; MW ± SD; \* p<0,05 vs. fMLP 0 M.

Ähnliche Ergebnisse wurden für die Wirkungen von Natrium- bzw. Cholinchlorid modifizierter isoosmolarer und hypertoner HBSS auf die Phosphorylierung der MAPKinase p44/42 in ruhenden und fMLP-stimulierten PMNL aufgezeigt. So hatte im Vergleich zur jeweils isoosmolaren Lösung weder die Natrium- noch die Cholinchlorid modifizierte HBSS mit 350 mosmol/l einen Effekt auf die Phosphorylierung der ERK-1/2 fMLP-stimulierter PMNL (**Abb.12A**).

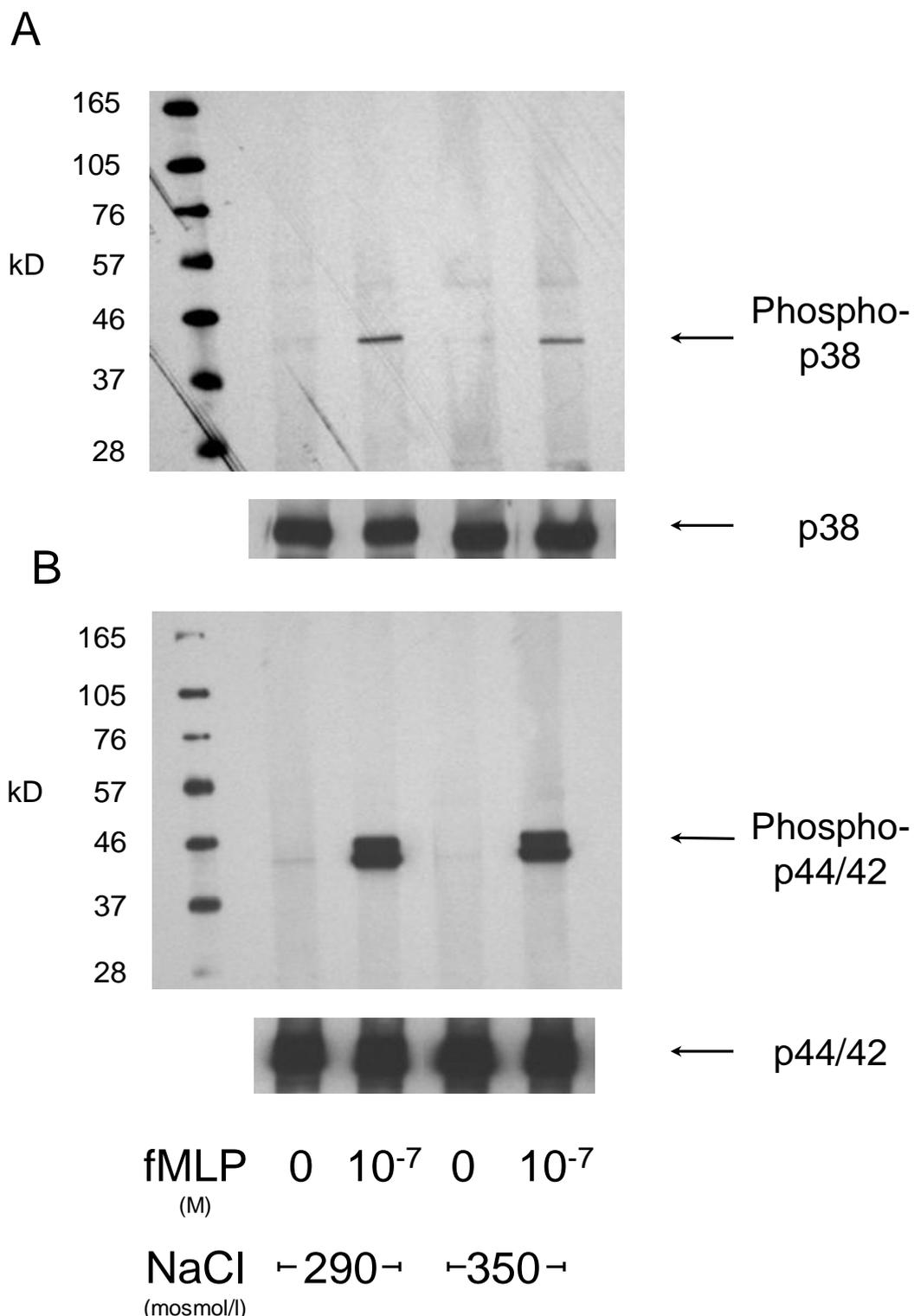


**Abb.12A:** Wirkung isoosmolarer und leicht hyperosmolarer (350 mosmol/l) Natriumchlorid- bzw. Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die Phosphorylierung der p44/42 MAPKinase in Ab- und Anwesenheit von fMLP  $10^{-7}$ M. Die Inkubationsbedingungen und die Bestimmung der Phosphorylierung der p44/42 MAPKinase ERK-1/2 erfolgte wie in Material und Methodik beschrieben. Leere Säulen: 290 mosmol/l; grobkarierte Säulen: 350mosmol/l NaCl-modifizierte HBSS; feinkarierte Säulen: 350 mosmol/l ChCl-modifizierte HBSS. N = 6; MW  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$  vs. fMLP 0 M.

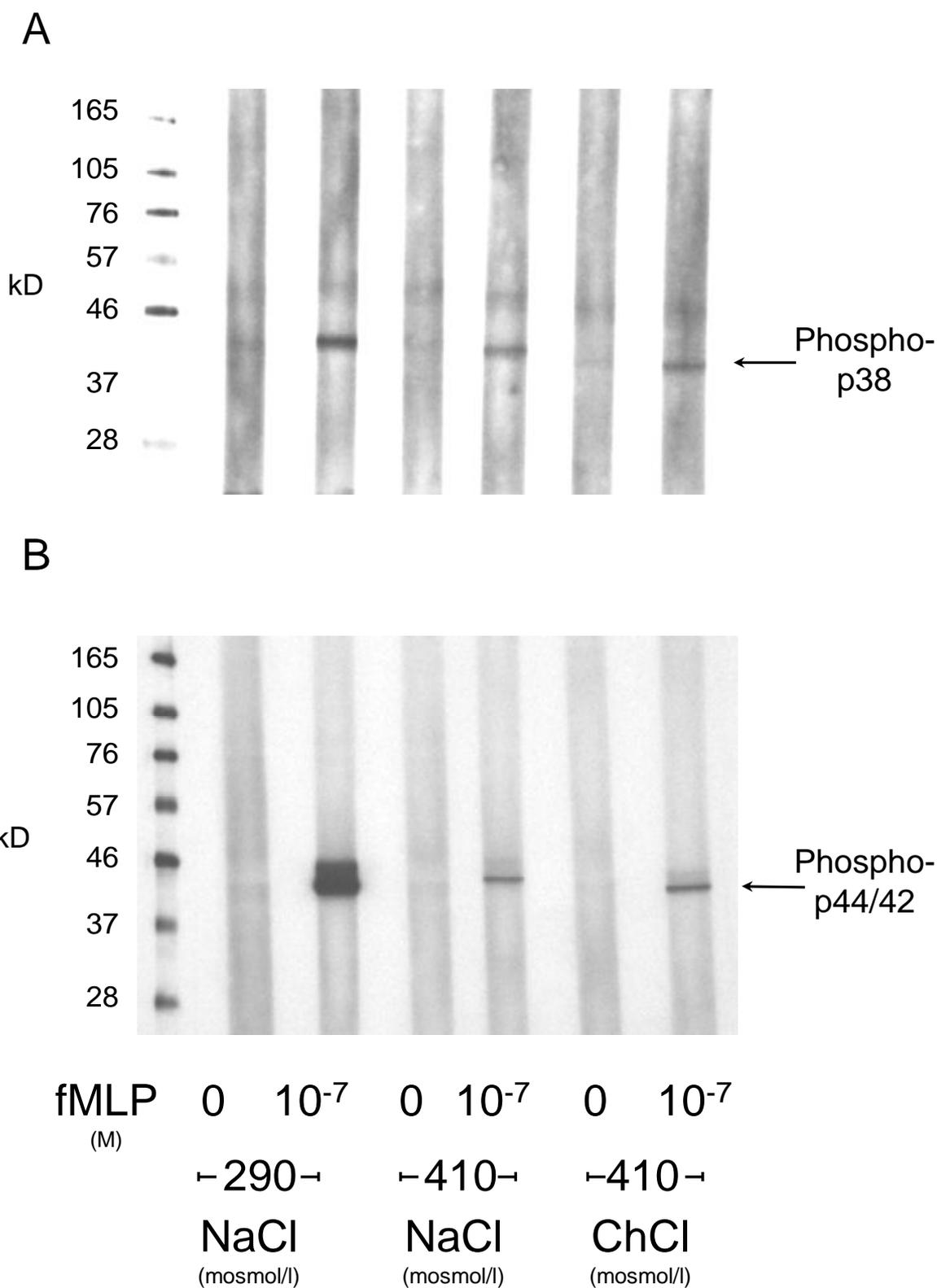
Erst bei weiterer Erhöhung der Osmolarität auf 410 mosmol/l kam es wie für die Phosphorylierung der MAPK p38 zuvor gezeigt, auch zu einer Hemmung Phosphorylierung der ERK-1/2 im Vergleich zu Zellen, die unter isoosmolaren Bedingung mit fMLP stimuliert wurden. Es ergab sich kein Unterschied zwischen den Natrium- bzw. Cholinchlorid modifizierten hypertonen Lösungen in ihrem Hemmeffekt auf die Phosphorylierung der MAPKinasen p38 oder der ERK-1/2 (**Abb. 12B**). Originalimmunoblots sind in den **Abb. 13A+B** und **Abb. 14A+B** gezeigt.



**Abb.12B:** Wirkung isoosmolarer und stärker hyperosmolarer (410 mosmol/l) Natriumchlorid- bzw. Cholinchlorid modifizierter HBSS auf die Phosphorylierung der p44/42 MAPKinase ERK-1/2 in Ab- und Anwesenheit von fMLP  $10^{-7}$ M. Die Inkubationsbedingungen und die Bestimmung der Phosphorylierung der ERK-1/2 erfolgte wie in Material und Methodik beschrieben. Leere Säulen: 290 mosmol/l; grobkarierte Säulen: 410 mosmol/l NaCl-modifizierte HBSS; feinkarierte Säulen: 410 mosmol/l ChCl-modifizierte HBSS. N = 6; MW  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$  vs. fMLP 0 M.



**Abb. 13A+B:** Eingescannte Bilder eines nach Immunoblot belichteten Röntgenfilms. Zusehen sind von links nach rechts: Molekulargewichtsstandart, 290 mosmol/l NaCl - modifizierte HBSS, 290 mosmol/l NaCl-modifizierte HBSS + 10<sup>-7</sup>M fMLP, 350mosmol/l NaCl-modifizierte HBSS, 350mosmol/l NaCl-modifizierte HBSS + 10<sup>-7</sup>M fMLP. Markierte Stellen entsprechen der Phospho-p38 für (A) und der Phospho-p44/42 für (B) jeweils im Vergleich zur Detektion der vergleichbaren gesamten MAPKinase unterhalb des jeweiligen Blots.



**Abb. 14A+B:** Eingescannetes Bild eines nach Immunoblot belichteten Röntgenfilms. Zusehen sind von links nach rechts: Molekulargewichtsstandart, 290 mosmol/l NaCl-modifizierte HBSS, 290 mosmol/l NaCl-modifizierte HBSS +  $10^{-7}$ M fMLP; 410 mosmol/l NaCl-modifizierte HBSS; 410mosmol/l NaCl-modifizierte HBSS +  $10^{-7}$ M fMLP; 410 mosmol/l ChCl-modifizierte HBSS, 410mosmol/l; ChCl-modifizierte HBSS +  $10^{-7}$ M fMLP. Markierte Stellen entsprechen der Phospho-P38 für **(A)** und der Phospho-P44/42 MAPKinase für **(B)**.

## 5. Diskussion

Neutrophile Granulozyten erfahren durch Hyperosmolarität eine Reihe von Funktionsänderungen. In den meisten Studien wurde die Stärke der Osmolarität häufig so gewählt, wie sie in den ableitenden Harnwegen vorkommt. Hierbei zeigte sich, dass die Erhöhung der Tonizität die bakteriziden Funktionen der PMNL inhibiert. Es gab Verminderungen in der Phagozytose, der Superoxidanionenproduktion und dem intrazellulären Abtöten von Mikroorganismen (Bryant et al., 1972; Lundberg and Wright, 1990). Die Degranulation (Stoehr and Smolen, 1988) und die Zellmigration (Rosengren et al., 1994) der Neutrophilen wurden ebenfalls herabgesetzt.

In dieser Arbeit wurde die Höhe der Osmolarität der gewählten Lösungen nicht an dem hohen Bereich der Harnwege ausgerichtet. Vielmehr wurde der im Blut vorkommende Osmolaritätsbereich gewählt, wie er nach Gabe einer „small volume resuscitation“ auftreten kann. So konnte zum Beispiel bei 12 von 47 schwer traumatisierten Patienten, die 250 ml einer 7,5% NaCl- Lösung infundiert erhielten, nach 15-30 Minuten eine Plasmaosmolalität von über 350 mosmol/kg gemessen werden. Ein Patient in dieser Studie erreichte den Maximalwert von 409 mosmol/kg. Die Blutalkoholkonzentration trug allerdings in dieser Studie zu einer Erhöhung der Plasmaosmolalität bei. Die Veränderungen der Tonizität blieben meisten über 4 Stunden hinaus nachweisbar (Vassar et al., 1990). Zu ähnlichen Ergebnissen kommt eine Multizenterstudie, die 182 Patienten randomisiert entweder mit isotoner NaCl/Dextran-Infusion oder mit einer „small volume resuscitation“ behandelte, um deren Sicherheit und Effektivität bei posttraumatischen Hypotensionen zu untersuchen (Mattox et al., 1991). Hier lag die mittlere Plasmaosmolalität bei 343 mosmol/l, die Standardabweichung betrug 34 mosmol/kg.

Neben umfangreichen Studien über die Veränderungen der bakteriziden Funktion von neutrophilen Granulozyten in einer hypertonen Umgebung existieren

nur wenige Untersuchungen, die die Wirkungen von Hypertonizität auf die Adhäsion der PMNL prüften. In in vivo Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion der PMNL an die Gefäßwand nach Ischämie-Reperfusion (Nolte et al., 1992), nach Trauma bedingten Rückenmarksschäden (Spera et al., 1998) sowie nach Lungenschäden (Angle et al., 1998; Rizoli et al., 1998) vermindert wurde. In einem Tiermodell wurden die Adhäsionsmoleküle von neutrophilen Granulozyten nach einem hämorrhagischen Schock untersucht, der entweder mit hypertoner Kochsalzlösung oder mit Ringerlaktatlösung behandelt wurde. Die hypertonen behandelten Versuchstiere wiesen dabei auf ihren Granulozyten eine deutlich verminderte Expression der L-Selektine im Vergleich zu der normoton behandelten Kontrollgruppe auf. Der Anstieg der  $\beta_2$ -Integrine war in beiden Gruppen gleich (Angle et al., 1998). In einer jüngeren Studie wurde in einem „second-hit“ Modell (hämorrhagischen Schock und nachfolgende Endotoxinexposition) die Abnahme der L-Selektinexpression bestätigt, wohingegen, im Gegensatz zu der zuvor genannten Studie, die Hochregulation des  $\beta_2$ -Integrins CD11b/CD18 unterdrückt wurde.

### **5.1. Hypertonizität und basale Expression der Adhäsionsmoleküle**

In in vitro Studien erfolgte ein „Shedding“ der L-Selektine in neutrophilen Granulozyten nach Exposition mit hypertonen Flüssigkeiten (500mosmol/l). Der Auslöser hierfür war das Schrumpfen der Zellen, denn auch bei Saccharose-induzierter Hyperosmolarität trat das „Shedding“ auf, nicht jedoch bei Harnstoff-bedingter Hypertonizität, welches frei über die Zellmembran diffundieren kann und damit keine Schrumpfung der Zellen zur Folge hat. Das „Shedding“ der L-Selektine konnte durch die Gabe des spezifischen p38 MAPKinaseinhibitors SB203580 vollständig verhindert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass über die p38 MAPKinase der Effekt des „Sheddings“ zumindest mitbestimmt wird (Rizoli et al.,

1999b). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnte in dieser Arbeit weder mit hyperosmolarer Natriumchlorid- noch mit Cholinchlorid- modifizierter HBSS für 45 Minuten inkubierten und ansonsten nicht stimulierten Zellen ein „Shedding“ der L-Selektine festgestellt werden (Abb. 3+4; fMLP 0 M). Es fand ebenfalls keine numerische oder funktionelle Hochregulation der basal exprimierten  $\beta_2$ -Integrine statt. Da für gewöhnlich eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen der numerischen Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine und dem Shedding der L-Selektine unter aktivierten Bedingungen existiert, wäre eine Erhöhung der  $\beta_2$ -Integrine unter höheren Osmolaritäten zu erwarten gewesen, wenn ein vermehrtes „Shedding“ der L-Selektine stattgefunden hätte. Es fand jedoch lediglich eine leichte Erhöhung der basalen  $\beta_2$ -Integrinzahl statt (Abb.3+4; fMLP 0M). Dies steht im Widerspruch zu früher berichteten Ergebnissen, die keinen Effekt der Hypertonizität auf die basale  $\beta_2$ -Integrinzahl nachwiesen. Ein „Shedding“ der L-Selektine oder eine erhöhte basale Expression der  $\beta_2$ -Integrine konnte ebenfalls nicht beobachtet werden, wenn die Hypertonizität mittels Mannitol induziert wurden, also mit die Zellmembran nicht permeablen Molekülen.

Ebenfalls konnte in der vorliegenden Arbeit keine Aktivierung der p38 MAPKinase bei Inkubation ruhender Zellen mit hyperosmolaren Lösungen nachgewiesen werden. Weder bei Natriumchlorid- noch bei Cholinchlorid- modifizierter HBSS von 350 bzw. 410 mosmol/l fanden eine Zunahme der Phosphorylierung und damit eine Aktivierung der p38 im Vergleich zu normotonen Bedingungen statt (Abb. 11+12). Dies steht im Widerspruch zu früheren Studien (Junger et al., 1998; Rizoli et al., 1999a). Mögliche Erklärungen hierfür sind, die niedrigere gewählte Tonizität in dieser Arbeit max. 410 mosmol/l vs. 500 mosmol/l in früheren Studien und die Dauer der Exposition der PMNL mit den Inkubationsmedien (45 min vs. Stunden). Sowohl die Phosphorylierung der p38 als auch das „Shedding“

der L-Selektine sind langsame Prozesse (Junger et al., 1998; Rizoli et al., 1999b). Das „Shedding“ der L-Selektine erfährt sein Maximum erst nach 4h in hypertoner Lösung von 500 mosmol/l (Rizoli et al., 1999b). Ob eine Phosphorylierung und Aktivierung der p38 als Zellantwort auf osmotischen Stress existiert, ist in der Literatur umstritten (Junger et al., 1998; Krump et al., 1997a).

## **5.2. Hypertonizität und fMLP-stimulierte Expression der Adhäsionsmoleküle**

Während PMNL in normotonen Inkubationsmedien nach Stimulation mit dem chemotaktischen Tripeptid fMLP in halbmaximaler Konzentration ein „Shedding“ der L-Selektine zeigen, konnte dieser Effekt bei Steigerung der Umgebungstonizität mittels Cholinchlorid bzw. Natriumchlorid modifizierter HBSS fast vollständig gehemmt werden. Es bestand kein vom gewählten Kation verursachter Unterschied. Interessanterweise konnte eine Steigerung der Osmolarität durch Mannit die fMLP-induzierte Abspaltung der L-Selektine nicht vermindern. Hieraus kann ein möglicher Effekt des gewählten Anions Chlorid auf das fMLP-stimulierte „Shedding“ der L-Selektine abgeleitet werden. Dies aufzuzeigen bleibt jedoch zukünftigen Studien vorbehalten.

Neben Veränderungen der L-Selektinexpression wurden in der vorliegenden Arbeit auch die numerischen sowie die funktionellen Veränderungen der  $\beta_2$ -Integrinexpression auf den PMNL analysiert. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers IB<sub>4</sub> konnte die numerische Expression der  $\beta_2$ -Integrine erfasst werden. Da jedoch die Zahl dieser Adhäsionsmoleküle nur wenige Schlüsse über deren Funktion zulässt, wurde durch den CBRM1/5-Antikörper weiter untersucht. CBRM 1/5 bindet spezifisch gegen ein Neo-Epitop der  $\alpha$ -Kette von CD18 für den Fall, dass zuvor eine Konformitätsänderung in Form einer Aktivierung stattgefunden hat (Diamond and Springer, 1993). In Übereinstimmung mit Beobachtungen anderer Forschergruppen

konnte in dieser Arbeit eine signifikant geringere numerische und funktionelle Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine festgestellt werden (Rizoli et al., 1998), wenn die neutrophilen Granulozyten vor Stimulation mit fMLP in einer Natriumchlorid-modifizierten hypertonen HBSS inkubiert wurden (Abb. 3). Die Tatsache, dass eine verminderte Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine nicht auftrat, wenn als Inkubationmedien hypertone Cholinchlorid- und Mannitol modifizierte HBSS gewählt wurde (Abb. 4+5), legt den Schluss nahe, dass der Effekt der Hemmung der  $\beta_2$ -Integrin-Hochregulation abhängig vom gewählten Kation und nicht alleine durch die Höhe der extrazellulären Osmolarität zu erklären ist. Der beobachtete Hemmeffekt hypertoner Kochsalzlösung auf die fMLP-stimulierte  $\beta_2$ -Integrinexpression ist demnach eine Natrium spezifische Wirkung.

### **5.3. Effekte hypertoner Natrium- bzw. Cholinchlorid-modifizierter HBSS auf die Rezeptorbindung von fMLP und klassische rezeptor-abhängige Signalwege**

Um einen möglichen Mechanismus zu identifizieren, über den die Natriumionen die Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine hemmen können, wurden in dieser Arbeit die Wirkungen hypertoner Natriumchlorid- und Cholinchlorid-modifizierter HBSS auf verschiedene Abschnitte der fMLP-Rezeptor abhängigen Signalkaskade vergleichend analysiert.

Ob die verschiedenen hypertonen Lösungen die Bindung des verwendeten chemotaktischen Tripeptids fMLP an seinen Rezeptor auf eine unterschiedliche Weise verändern, wurde mit Hilfe des FITC-markierten Analogons des fMLPs, dem fNLPNTL, untersucht. Weder die Art des verwendeten Kations noch die Stärke der Osmolarität konnten einen signifikanten Unterschied bewirken (Abb. 7). Es ergaben sich ebenfalls keine unterschiedlichen Veränderungen in der Rolle des intrazellulären Calciums in Abhängigkeit der gewählten hypertonen Flüssigkeit bezüglich der durch

fMLP oder durch das Calciumionophor A23187 induzierten Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine (Abb. 8 + 9). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen, die eine Unterdrückung des fMLP-induzierten intrazellulären Calciumanstiegs unter hypertonen Inkubationsbedingungen beobachteten. Diese Suppression war unabhängig davon, ob als gewählte hypertone Substanz HEPES gepufferte Salzlösung, Natriumsulfat oder Saccharose verwendet wurde (Kazilek et al., 1988).

Betrachtet man die Wirkung von hypertoner Natriumchlorid- bzw. Cholinchloridmodifizierter HBSS auf den Signalweg der Proteinkinase C, so stellt man eine in beiden Fällen in gleichem Maße verminderte numerische Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine fest (Abb. 10). Ähnliche Ergebnisse finden sich zu den Effekten von Natriumchlorid bedingter Hypertonizität auf die fMLP- bzw. PMA-stimulierte numerische Expression von CD11b/CD18 (Rizoli et al., 1998) und auf die Produktion von Sauerstoffradikalen ausgelöst durch chemotaktische Peptide oder Phorbolsterverbindungen (Kuchkina et al., 1993; Matsumoto et al., 1991). Es gibt derzeit keine vergleichbaren Daten in Hinsicht auf die Wirkung von hypertoner Cholinchloridlösung auf die Adhäsionsmolekülexpression oder die Superoxidanionenproduktion.

Zusammenfassend kann man eine Wirkung von hypertonen Flüssigkeiten auf das intrazelluläre Calcium und den Proteinkinase C abhängigen Signalweg in Form einer Inhibierung feststellen. Die Wahl des verwendeten Kations scheint hierbei keine Rolle zu spielen. Da eine verminderte numerische und funktionelle Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine nach Stimulation mit fMLP lediglich in Anwesenheit von hypertoner Natriumchlorid-, nicht aber von Cholinchloridlösung stattfand, können die klassischen fMLP-Rezeptor abhängigen Signalwege mit Aktivierung

Calcium/Kalmodulin- und Proteinkinase C abhängiger Effektoren hierfür keine alleinige Erklärung bieten.

#### **5.4. Effekte von hypertoner Natriumchlorid- und Cholinchlorid-modifizierter HBSS auf die fMLP-stimulierte Phosphorylierung der MAPKinasen p38 und p44/42**

In verschiedenen Studien wird insbesondere der aktivierten und damit phosphorylierten MAPkinase p38 nicht nur eine wesentliche Rolle beim „Shedding“ der L-Selektine zugesprochen (Rizoli et al., 1999b), sondern auch bei der Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine bspw. nach Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit Endotoxin (Rizoli et al., 1999a) oder Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (Detmers et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Endotoxin zu einer ausgeprägten Phosphorylierung der p38 führt und gleichzeitig eine Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine induziert. Durch die Blockade der Tyrosinkinase p38 mit Hilfe des Inhibitors SB203580 wurde sowohl bei Stimulation durch Endotoxin als auch durch TNF $\alpha$  eine Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine unterdrückt (Detmers et al., 1998).

Ferner führte die Inkubation von PMNL mit hypertoner Kochsalzlösung bereits alleine zu einer geringen Phosphorylierung der p38. Allerdings zeigten in hypertonem Medium inkubierte Granulozyten eine deutlich verminderte Aktivierung der p38, wenn sie mit Endotoxin oder fMLP stimuliert wurden (Junger et al., 1998). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde angenommen, dass eine osmolaritätsbedingte Vorstimulation der p38 zu einem refraktären Verhalten der MAPKinase auf eine nachfolgende Stimulationen führt. In dieser aber auch in anderen Arbeiten (Krump et al., 1997a) konnte jedoch keine Phosphorylierung der p38 durch eine hypertone Umgebung von 350 bzw. 410 mosmol/l beobachtet werden. Eine verminderte Aktivierung der p38 durch fMLP nach Inkubation in hypertoner Kochsalzlösung

konnte wie auch in der vorliegenden Arbeit nur im Falle einer Osmolarität von 410 mosmol/l gezeigt werden (Abb. 11B). Zwischen 350 mosmol/l und isotoner HBSS bestand kein Unterschied (Abb. 11A). Die fMLP bedingte Phosphorylierung der p38 bei menschlichen Granulozyten ist zum Teil abhängig von einer Aktivierung der Proteinkinase C und der intrazellulären Calciumionenkonzentration (Krump et al., 1997b). Auch hier konnte in dieser Arbeit nur bei der höheren Osmolarität von 410 mosmol/l eine verminderte Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine durch Stimulation mit Calcium und PMA gezeigt werden (Abb. 9A+B). Die Ergebnisse für hypertone Cholinchloridlösungen sind hier analog zu denen von Natriumchloridlösungen (Abb. 10A+B). Nur eine höher gewählte Konzentration unterdrückte die A23187 und PMA induzierte Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine. Wie zu erwarten, traten keine unterschiedlichen Veränderungen in der Phosphorylierung der p38 bei Natriumchlorid- und Cholinchlorid-modifizierter HBSS auf. Sowohl die basale Phosphorylierung der p38 als auch die fMLP-stimulierte Phosphorylierung ergab keine Unterschiede zwischen den beiden Lösungen bezogen auf die verwendeten Tonizitäten von 350 bzw. 410 mosmol/l.

Der Natrium spezifische Effekt in der hyperosmolar-bedingten Unterdrückung der fMLP-abhängigen Stimulation der  $\beta_2$ -Integrine kann also nicht durch die Phosphorylierung bzw. Aktivierung der p38 erklärt werden. Dass die fMLP-bedingte  $\beta_2$ -Integrinhochregulation schon bei Osmolaritäten von 350 mosmol/l signifikant vermindert ist (Abb. 3A+B), nicht aber die Phosphorylierung der p38 (Abb. 11B), macht eine alleinige Wirkung der p38 in diesem Zusammenhang ebenfalls unwahrscheinlich. Eine Inhibierung der p38 mittels SB 203580 führte in einer früheren Studie ebenfalls nicht zu einer fMLP-bedingten Adhäsion von neutrophilen Granulozyten (Detmers et al., 1998).

Betrachtet man eine mögliche Rolle der p44/42, um einen Natrium-spezifischen Hemmeffekt zu erklären, finden sich zur p38 analoge Ergebnisse. Weder Cholinchlorid noch Natriumchlorid unterschieden sich in ihrer Wirkung auf die Phosphorylierung der p44/42 unter basalen Bedingungen oder nach fMLP-stimulierter Aktivierung in Abhängigkeit der Osmolarität. Allerdings trat bei Osmolaritäten von 410 mosmol/l eine signifikant stärkere Inhibierung der fMLP-induzierten Aktivierung auf (Abb. 12A+B). Ein Natrium-spezifischer Effekt ist jedoch auch hier unwahrscheinlich, da Cholinchlorid-modifizierte HBSS diese Wirkung ebenfalls hatte. Eine selektive Blockade der p44/42 MAPKinase durch PD98059 hatte in einer anderen Studie zudem keinen Effekt auf eine Tumonekrosefaktor-induzierte Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine (Tandon et al., 2000). Desweiteren muss man berücksichtigen, dass, wie bei der p38, eine Osmolarität von 350 mosmol/l die fMLP-bedingte Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine inhibierte (Abb. 3A+B), aber zu keiner Änderung in der Aktivierung der p44/42 führte (Abb. 12A). Zuletzt erwähnt sei, dass Endotoxin zu einer deutlichen Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine und einem Shedding der L-Selektine führt ohne dabei eine Phosphorylierung der ERK-1/2 zu bewirken (Ergebnisse nicht gezeigt).

Betrachtet man zusammenfassend die Ergebnisse der MAP Kinasen in dieser Arbeit, so kann man weder der Aktivierung der p38 noch der p44/42 eine wesentliche Rolle für einen Natrium-spezifischen Hemmeffekt auf die fMLP-bedingte Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine zuschreiben.

### **5.5. Effekte von Tonizität-bedingten Änderungen des Zellvolumens auf die fMLP-stimulierte Expression der $\beta_2$ -Integrine**

Da Zellen Veränderungen in ihrem Zellvolumen erkennen und daraufhin Regulationmechanismen aktivieren können, die darauf abzielen, das Volumen einer

Zelle konstant zu halten, wurden in dieser Arbeit ebenso die Effekte von hypertoner Natriumchlorid- und Cholinchlorid-modifizierter HBSS auf die im Durchflusszytometer gemessenen Vorwärtslicht-Streu-Werte gemessen. Nach Inkubation der PMNL für 30 min in 37°C ergaben sich für Natriumchlorid-modifizierte HBSS deutliche höhere Messwerte als für Cholinchlorid-modifizierte HBSS der gleichen Osmolarität. Diese Beobachtung zeigt die Möglichkeit der Zellen, im Natriumchlorid modifiziertem Medium ihr Volumen wieder zu erhöhen, wohingegen im Cholinchlorid modifiziertem Medium ein Volumenausgleich nicht stattfinden kann, da das Cholinchlorid nicht durch den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Austauscher in die Zelle aufgenommen wird (Grinstein and Furuya, 1984). Eine der Inkubation mit hypertoner Flüssigkeit folgende Stimulation der PMNL mit fMLP zeigte ebenfalls nur für Natriumchlorid eine Zunahme des Zellvolumens. Aufgrund dieser Beobachtungen könnte man nun annehmen, dass ein für die Regulation des Zellvolumens notwendiger Mechanismus die Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine nach fMLP-Stimulation unterdrückt. Nimmt man allerdings den in hypertoner Natriumchloridlösung inkubierten Zellen ihre Möglichkeit zur Erhöhung des Zellvolumens, indem man sie mit einer geeigneten Konzentration von Amilorid inkubiert (Grinstein and Furuya, 1984; Rosengren et al., 1994), so findet weiterhin eine Inhibition der durch fMLP-induzierten Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine statt. Es lässt sich sogar eine Verstärkung dieser Wirkung beobachten (Abb. 6). Weder Zellsignale, ausgelöst durch das Schrumpfen der Zellen im hypertonen Medium alleine, noch die Fähigkeit der Zellen ihren Natriumhaushalt mit Hilfe des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiports zu regulieren, können also als Erklärung für die verminderte fMLP-induzierte Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine bei hypertoner Kochsalzlösung als Medium herangezogen werden.

In jüngeren Studien über die osmotische Wirksamkeit auf die Exozytose der neutrophilen Granulozyten wird hypertoner Kochsalzlösung eine Unterdrückung der

Exozytose in allen Granula zugesprochen. Hypertone Natriumchloridlösung führt zu Veränderungen der submembranös gelegenen F-Aktin-Ring-Konformation und zu einer verminderte Depolymerisation unabhängig von den verwendeten Zellstimuli (fMLP, PMA, A23187, LPS)(Rizoli et al., 2000). Da eine Vermeidung aber auch eine verminderte Induktion der F-Aktin Polymerisation den Hemmeffekt der hypertonen Natriumchloridlösung verstärkte, scheinen Veränderungen im Zytoskelett der Zelle eine Schlüsselfunktion zu haben. Interessanterweise hatte in dieser Studie die Blockade spezifischer MAPKinasen, z.B. der p38 durch SB203580 keinen Effekt auf die Osmolaritäts-bedingte Induktion der Aktinpolymerisation. Da eine Zunahme der Polymerisation des Aktins bei konstantem Zellvolumen mit Hilfe einer Permeabilisierung der Zellmembran durch Zugabe von Nystatin und Natriumchlorid (+100mM) erfolgte, jedoch die Zugabe von Saccharose (+200mM) lediglich ein Schrumpfen der Zelle nicht aber eine Aktivierung des F-Aktins zur Folge hatte, schlossen die Autoren dieser Studie, dass die Erhöhung der intrazellulären Ionenstärke einen wichtigeren Effekt auf die Aktivierung des F-Aktins besitzt als die Veränderung des Zellvolumens. Diese Beobachtungen stimmen mit denen dieser Arbeit überein, wenn man berücksichtigt, dass nur die Verwendung von Natriumchlorid-modifizierter HBSS zu einer Hemmung der  $\beta_2$ -Integrin-Expression führte, nicht aber die Verwendung von Cholinchlorid oder Mannit. Die Zellwand ist für diese Stoffe nicht permeabel und führt daher lediglich zu einem Schrumpfen der Zellen, nicht aber zu Veränderungen der intrazellulären Ionenstärke. Ein Argument gegen diese These ist, dass die Gabe von Amilorid die Supression der Hochregulation der  $\beta_2$ -Intergine verstärkte (Abb.6), obwohl die intrazelluläre Natriumkonzentration durch Blockade des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters nicht ansteigen konnte. Eine mögliche Ursache liegt in weiteren Regulationsmechanismen der Zellen für

ihren Natriumhaushalt, auch wenn diese, verglichen mit dem Antiporter, nur einen geringen Teil ausmachen.

## 6. Zusammenfassung

Polymorphkernige Leukozyten (PMNL) spielen eine zentrale Rolle in der Abwehr von Infektionen. Dafür sind sie ausgestattet mit einem großen Arsenal an bakteriziden Mechanismen, wie die Fähigkeit an eingedrungene Mikroorganismen zu adhären, diese nach Kontaktaufnahme zu phagozytieren und durch die nachfolgende Bildung an reaktiven Sauerstoffspezies abzutöten. Dabei sind es zum Teil die gleichen Mechanismen, wie die überschießende Adhäsion an das Gefäßendothel und die Freisetzung von zytotoxischen Produkten wodurch überschießend aktivierte PMNL beim hämorrhagisch-traumatischen Schock oder in Phasen von Ischämie und Reperfusion zur Gewebeschädigung beitragen können. Vor diesem pathophysiologischen Hintergrund wären somit Therapieansätze sinnvoll, die neben der Wiederherstellung stabiler hämodynamischer Verhältnisse auch eine Reduktion überstimulierter Funktionen polymorphkerniger Leukozyten auf ein physiologisch sinnvolles Maß ermöglichen würden. Viel versprechend in dieser Hinsicht ist die „small volume resuscitation“, da sie nicht nur mit einer raschen Wiederherstellung der Makrohämodynamik, sondern auch mit einer Reduktion der Adhäsion von PMNL an das Gewebsendothel einhergeht. Über welche Mechanismen hypertone Kochsalzlösungen diese Wirkungen erzielen, ist bis heute allerdings nur unzureichend verstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, welchen Einfluß hypertone Kochsalzlösung auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf polymorphkernige Leukozyten hat. Prinzipiell lassen sich die  $\beta_2$ -Integrine (CD18) und die L-Selektine (CD62L) auf den PMNL unterscheiden. L-Selektine sind wie die Zähne eines Zahnrades und führen durch die Interaktion mit ihren Liganden auf dem Endothel zum Phänomen des Entlangrollens, so dass die Geschwindigkeit gegenüber der Gefäßwand reduziert wird und dadurch mehr Zeit für den Kontakt mit

endothelabhängig gebildeten inflammatorischen Mediatoren verfügbar wird, um in einem zweiten Schritt die PMNL zu aktivieren. Die Aktivierung der PMNL führt zu einem Verlust der L-Selektine („Shedding“) und zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen aus der Familie der  $\beta_2$ -Integrine. Durch die Interaktion der  $\beta_2$ -Integrine mit endothelialen „Intercellular Adhesion Molecules-1/2“ kommt es zur Ausbildung eines festen Kontaktes (Adhäsion), dem dann die Auswanderung der PMNL in das Interstitium (Emigration) folgt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine durch hypertone Kochsalzlösung modifizierte hyperosmolare HBSS-Lösung auf die spontane Expression von L-Selektinen oder  $\beta_2$ -Integrinen ruhender PMNL keinen Effekt hatte. Nach Stimulation der Zellen mit dem chemotaktischen Tripeptid fMLP unter normoosmolaren Bedingungen kam es zu einem Verlust der L-Selektine und zu einer numerischen sowie funktionellen Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine. Die fMLP stimulierten Veränderungen der Adhäsionsmolekülexpression wurden durch Erhöhung der Osmolarität der Natriumchlorid-modifizierten HBSS-Lösung zunehmend gehemmt. Von Interesse ist, dass der Hemmeffekt einer hyperosmolarer HBSS-Lösung auf das „Shedding“ auch dann vorhanden war, wenn anstelle von Natriumchlorid Cholinchlorid eingesetzt wurde. Im Gegensatz dazu konnte die numerische und funktionelle Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine durch eine Cholinchlorid-modifizierte hyperosmolare HBSS-Lösung nicht vermindert werden. Diese Befunde sprechen für einen Natrium-spezifischen Effekt über welchen hypertone Kochsalzlösungen die Hochregulation der Adhäsionsmoleküle aus der Familie der  $\beta_2$ -Integrine hemmen. Dieser Hemmeffekt beruht dabei nicht auf der Fähigkeit der Zelle nach einem Volumenverlust beim Wechsel in ein hypertones Medium durch Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporters wieder an Volumen zu gewinnen, da eine Blockade des Antiporters durch Amilorid, den Hemmeffekt hyperosmolarer

Natriumchlorid-modifizierter HBSS-Lösung nicht aufhob.

Auf welchem Weg der aufgezeigte Natrium-spezifische Hemmeffekt hyperosmolarer Lösungen auf die fMLP-stimulierte  $\beta_2$ -Integrinexpression stattfindet, sollte durch weitere Untersuchungen des fMLP-Rezeptor Signalweges geklärt werden. Eine Erhöhung der Osmolarität führte in diesen Versuchen zu keiner relevanten Veränderung der Bindung des fMLP-Analogons fNLPNTL an den fMLP-Rezeptor. Hierbei ergab sich kein Unterschied zwischen einer Natrium- oder Cholinchlorid modifizierten hyperosmolaren HBSS – Lösung. Auch bestand kein Unterschied zwischen beiden Lösungen in ihrem Hemmeffekt auf die nach fMLP Stimulation der PMNL einsetzende Erhöhung des intrazellulären Calciums. Ebenfalls konnte kein Unterschied bzgl. des Hemmeffektes der beiden Lösungen auf den Calcium/Kalmodulin – und Protein Kinase C abhängigen Signalweg der Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine aufgezeigt werden. Die fMLP-induzierbare Aktivierung des Signalwegs der MAPKinasen, identifiziert durch die Phosphorylierung der MAPK p38 und der MAPK p44/42, wurde durch die beiden Arten an hyperosmolaren HBSS-Lösungen ebenfalls nicht unterschiedlich gehemmt.

Zusammengefasst zeigen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass sich die Hemmung der numerischen und funktionellen Hochregulation der Adhäsionsmoleküle aus der Familie der  $\beta_2$ -Integrine nach fMLP-Stimulation von PMNL durch hypertone Natriumchloridlösung auf einen Natriumkationen spezifischen Effekt zurückführen lässt. Eine Erhöhung der extrazellulären Osmolarität spielt eine untergeordnete Rolle.

Der zugrunde liegende Mechanismus des aufgezeigten Natrium-spezifischen Hemmeffektes lässt sich weder mit der Bindungsfähigkeit des chemotaktischen Tripeptids fMLP zu seinem Rezeptor, noch mit Veränderungen der klassischen Zellsignalwege, noch der bekannten Signalwege des fMLP über die MAPKinasen p38 und p44/42 erklären.

Unabhängig vom zugrundeliegenden Mechanismus kann der Natrium-bedingte Hemmeffekt der Hochregulation der  $\beta_2$ -Integrine die in vivo dokumentierte Reduktion der Adhäsionsfähigkeit der PMNL an das Gefäßendothel gut erklären, und damit eine Wirkung, die auch zu den anti-inflammatorischen Wirkungen der „small-volume-resuscitation“ maßgeblich beitragen kann.

## 7. Abkürzungen

- APS: Ammoniumpersulfat
- CD: cluster of differentiation
- ChCl: Cholinchlorid
- FACS: Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorter)
- FITC: Fluoreszeinisothiocyanat
- fMLP: N-formyl-methionyl-phenyl-alanin
- HBSS: Hank´s balanced salt solution
- ICAM1: intercellular adhesion molecule 1 (CD54)
- Ig: Immunoglobulin
- LPS: Lipopolysaccharid
- NF- $\kappa$ B: nuclear factor  $\kappa$ B
- MAPK: mitogen aktivierte Proteinkinase
- NaCl: Natriumchlorid
- PMNL: Polymorphkerniger Leukozyt (polymorphonuclear leukocyte)
- PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid
- SDS: sodium dodecyl sulfate
- TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
- TNF- $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$

## 8. Literaturverzeichnis

- Angle N, Hoyt DB, Cabello Passini R, Herdon Remelius C, Loomis W, Junger WG. 1998. Hypertonic saline resuscitation reduces neutrophil margination by suppressing neutrophil L selectin expression. *J Trauma* 45: 7-12.
- Bryant RE, Sutcliffe MC, McGee ZA. 1972. Effect of osmolalities comparable to those of the renal medulla on function of human polymorphonuclear leukocytes. *J Infect Dis* 126: 1-10.
- Chosay JG, Essani NA, Dunn CJ, Jaeschke H. 1997. Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of liver during endotoxin-induced injury. *Am J Physiol* 272: G1195-200.
- Detmers PA, Zhou D, Polizzi E, Thieringer R, Hanlon WA, Vaidya S, Bansal V. 1998. Role of stress-activated mitogen-activated protein kinase (p38) in beta 2-integrin-dependent neutrophil adhesion and the adhesion-dependent oxidative burst. *J Immunol* 161: 1921-1929.
- Diamond MS, Springer TA. 1993. A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol* 120: 545-556.
- Grinstein S, Furuya W. 1984. Amiloride-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in human neutrophils: mechanism of activation by chemotactic factors. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 755-762.
- Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. 1990. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 4: 3355-3359.
- Junger WG, Hoyt DB, Davis RE, Herdon Remelius C, Namiki S, Junger H, Loomis W, Altman A. 1998. Hypertonicity regulates the function of human neutrophils by modulating chemoattractant receptor signaling and activating mitogen-activated protein kinase p38. *J Clin Invest* 101/12: -2779).
- Kazilek CJ, Merkle CJ, Chandler DE. 1988. Hyperosmotic inhibition of calcium signals and exocytosis in rabbit neutrophils. *Am J Physiol* 254: C709-18.
- Korchak HM, Rutherford LE, Weissmann G. 1984. Stimulus response coupling in the human neutrophil. *J Biol Chem* 259: 4070-4075.
- Krump E, Nikitas K, Grinstein S. 1997a. Induction of tyrosine phosphorylation and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activation during shrinkage of human neutrophils. *J Biol Chem* 272: 17303-17311.
- Krump E, Sanghera JS, Pelech SL, Furuya W, Grinstein S. 1997b. Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. *J Biol Chem* 272: 937-944.

- Kuchkina NV, Orlov SN, Pokudin NI, Chuchalin AG. 1993. Volume-dependent regulation of the respiratory burst of activated human neutrophils. *Experientia* 49: 995-997.
- Lundberg C, Wright SD. 1990. Relation of the CD11/CD18 family of leukocyte antigens to the transient neutropenia caused by chemoattractants. *Blood* 76: 1240-1245.
- Matsumoto T, van der Auwera P, Watanabe Y, Tanaka M, Ogata N, Naito S, Kumazawa J. 1991. Neutrophil function in hyperosmotic NaCl is preserved by phosphoenol pyruvate. *Urol Res* 19: 223-227.
- Mattox KL, Maningas PA, Moore EE, Mateer JR, Marx JA, Aprahamian C, Burch JM, Pepe PE. 1991. Prehospital hypertonic saline/dextran infusion for post-traumatic hypotension. The U.S.A. Multicenter Trial. *Ann Surg* 213: 482-491.
- Nolte D, Bayer M, Lehr HA, Becker M, Krombach F, Kreimeier U, Messmer K. 1992. Attenuation of postischemic microvascular disturbances in striated muscle by hyperosmolar saline dextran. *Am J Physiol* 263: H1411-H1415.
- Richter J. 1992. Effect of adenosine analogues and cAMP-raising agents on TNF-, GM-CSF-, and chemotactic peptide-induced degranulation in single adherent neutrophils. *J Leukocyte Biol* 51: 270-275.
- Rijkers GT, Justement LB, Griffioen AW, Cambier JC. 1990. Improved method for measuring intracellular Ca<sup>++</sup> with fluo-3. *Cytometry* 11: 923-927.
- Rizoli SB, Kapus A, Fan J, Li YH, Marshall JC, Rotstein OD. 1998. Immunomodulatory effects of hypertonic resuscitation on the development of lung inflammation following hemorrhagic shock. *J Immunol* 161: 6288-6296.
- Rizoli SB, Kapus A, Parodo J, Rotstein OD. 1999a. Hypertonicity prevents lipopolysaccharide-stimulated CD11b/CD18 expression in human neutrophils in vitro: role for p38 inhibition. *J Trauma* 46: 794-798.
- Rizoli SB, Rotstein OD, Kapus A. 1999b. Cell volume-dependent regulation of L-selectin shedding in neutrophils. A role for p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 274: 22072-22080.
- Rizoli SB, Rotstein OD, Parodo J, Phillips MJ, Kapus A. 2000. Hypertonic inhibition of exocytosis in neutrophils: central role for osmotic actin skeleton remodeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C619-C633.
- Rosengren S, Henson PM, Worthen GS. 1994. Migration-associated volume changes in neutrophils facilitate the migratory process in vitro. *Am J Physiol* 267: C1623-C1632.
- Spera PA, Arfors KE, Vasthare US, Tuma RF, Young WF. 1998. Effect of hypertonic saline on leukocyte activity after spinal cord injury. *Spine* 23: 2444-2448.
- Stoehr SJ, Smolen JE. 1988. Osmotic forces are not critical for Ca<sup>2+</sup>-induced secretion from permeabilized human neutrophils. *J Cell Physiol* 135: 169-178.

Tandon R, Sha'afi RI, Thrall RS. 2000. Neutrophil beta2-integrin upregulation is blocked by a p38 MAP kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 858-862.

Thiel M, Chambers JD, Chouker A, Fischer S, Zourelidis C, Bardenheuer HJ, Arfors KE, Peter K. 1996. Effect of adenosine on the expression of beta(2) integrins and L-selectin of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J Leukoc Biol* 59: 671-682.

Thiel M, Imendorffer S, Chouker A, Groh J, Briegel J, Anthuber J, Kramling H, Arfors KE, Peter K, Messmer K. Expression of adhesion molecules on circulating polymorphonuclear leukocytes during orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 28, 1538-1550. 1998.

Ref Type: Journal (Full)

Vassar MJ, Perry CA, Holcroft JW. 1990. Analysis of potential risks associated with 7.5% sodium chloride resuscitation of traumatic shock [published erratum appears in *Arch Surg* 1991 Jan;126(1):43]. *Arch Surg* 125: 1309-1315.

Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi EY, Arfors KE, Harlan JM. 1988. A monoclonal antibody to the adherence-promoting leukocyte glycoprotein, CD18, reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock and resuscitation in rabbits. *J Clin Invest* 81: 939-944.

von Andrian UH, Chambers JD, Berg EL, Michie SA, Brown DA, Karolak D, Ramezani L, Berger EM, Arfors KE, Butcher EC. 1993. L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl LewisX-dependent and -independent recognition pathways. *Blood* 82: 182-191.

## 9. Danksagung

Mein erster Dank geht an die Klinik für Anästhesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität zu München unter der Direktion von Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter sowie Herrn Prof. Dr. med. B. Zwissler. Die zahlreichen Möglichkeiten des Labors und die hervorragende Betreuung durch ihre Mitarbeiter haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. M. Thiel für seine große Geduld und beste fachliche Betreuung in allen Phasen meiner Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. F. Büßecker, Dr. I. Kaufmann und Dr. A. Choukèr für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und die große Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit.

Für die andauernde fachliche und moralische Unterstützung und das freundschaftliche Arbeitsklima im Forschungslabor möchte ich mich bei Ursula Göttler, Marion Hörl, Gaby Gröger und Stefan Meindl ganz herzlich bedanken.

Weiterer Dank gilt den zahlreichen Spendern von Blut für die Experimente, hier hervorzuheben sind neben den bereits oben genannten Personen, die Herren Drs. Sören Kühnapfel, Christoph Bentele und Christian Neumaier.

Abschließend danke ich meinen Eltern, da nur durch ihre Unterstützung das Medizinstudium und damit diese Arbeit möglich wurden.

## 10. Curriculum vitae

Kay Eberhardt

- 1974 Geboren am 19.02.1974 als Sohn der Eheleute Matthias Eberhardt und Dr. Christa Eberhardt, geb. Kirschmann, in Mölln, Kreis Herzogtum Lauenburg, Deutschland
- 1980 Einschulung in der Till Eulenspiegel Grundschule, Mölln
- 1984 Besuch der Lauenburgischen Gelehrtenschule Ratzeburg
- 1993 Erlangen der Hochschulreife
- 1993 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz; Mölln
- 1995 Immatrikulation im Fach Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1997 Ärztliche Vorprüfung
- 1998 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2000 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2001 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2002 Arzt im Praktikum
- 2003 Approbation als Arzt
- Seit 2004 Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München