

Aus dem Experimental and Clinical Research Center  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die immunmodulatorischen Effekte intravenöser  
Immunglobuline auf Neutrophile und Endothelzellen im LPS-  
induzierten Nierenversagen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bilgin Osmanodja

aus Dresden

Datum der Promotion: 14. September 2018

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Kurzzusammenfassung.....	1
2 Abstract.....	2
3 Einleitung.....	3
3.1 Klinischer Kontext.....	3
3.1.1 Sepsis und Endotoxämie.....	3
3.1.2 Akute Nierenschädigung im Rahmen der Sepsis.....	4
3.2 Pathophysiologie der Sepsis.....	5
3.3 Neutrophile.....	7
3.4 Pathophysiologie der Albuminurie.....	10
3.5 Albuminurie und Akutes Nierenversagen.....	11
3.6 Intravenöse Immunglobuline.....	12
3.6.1 Allgemeines, Zulassung, Anwendungsgebiete und Pharmakologie der Intravenösen Immunglobuline.....	12
3.6.2 Mechanismen der immunmodulatorischen Wirkung von IVIG.....	13
3.6.3 IVIG-Effekte auf Neutrophile.....	15
3.6.4 IVIG-Effekte auf Endothelzellen.....	16
3.7 LPS-induziertes akutes Nierenversagen in der Maus.....	16
3.8 Herleitung der Fragestellung.....	18
4 Materialien und Methoden.....	20
4.1 Geräte und Materialien.....	20
4.1.1 Puffer, Medien, Experimentelle Agenzien und Pharmaka.....	20
4.1.2 Materialien für die Fragmentierung von IVIG in F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente.....	20
4.1.3 Materialien für die Aufreinigung der Neutrophilen.....	20
4.1.4 Materialien für die Stimulierung humaner neutrophiler Granulozyten, Generierung von Zytoplasmaextrakten und Überständen.....	21
4.1.5 Materialien für die HUVEC-Zellkultur.....	21

4.1.6	Materialien für die Stimulierung von HUVECs und Generierung von Zellextrakten	21
4.1.7	Materialien für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blotting .....	21
4.1.8	Materialien für Apoptosebestimmung im Annexin-V-Assay .....	21
4.1.9	Materialien für Apoptosebestimmung von Neutrophilen mittels Sub-G0-Phasen-Quantifizierung durch Propidiumiodid-DNA-Färbung .....	22
4.1.10	Materialien für ROS-Produktion im DHR-Assay.....	22
4.1.11	Materialien für ROS-Produktion im Ferricytochrom-C-Assay .....	22
4.1.12	Materialien für Migration.....	22
4.1.13	Geräte, Klinik- und Laborbedarf .....	22
4.2	Methoden .....	23
4.2.1	Fragmentierung von IVIG in F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente und Pufferaustausch der IVIG ...	23
4.2.2	Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten .....	24
4.2.3	Stimulierung humaner neutrophiler Granulozyten, Generierung von Zytoplasmaextrakten und Überständen .....	24
4.2.4	Präparation und Kultivierung von humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVECs) .....	25
4.2.5	Stimulierung von humanen umbilikalvenösen Endothelzellen und Generierung von Gesamtzelllysaten .....	26
4.2.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blotting .....	26
4.2.7	Apoptosebestimmung von Neutrophilen mit Annexin-V-Färbung.....	27
4.2.8	Apoptosebestimmung von Neutrophilen mittels Sub-G0-Phasen-Quantifizierung durch Propidiumiodid-DNA-Färbung.....	27
4.2.9	Intrazelluläre ROS-Produktion im DHR-Assay.....	28
4.2.10	ROS-Produktion im Ferricytochrom-C-Assay .....	28
4.2.11	FACS-Analyse der Bindung von IVIG und F(ab') <sub>2</sub> -Fragmenten an Neutrophile und HUVECs.....	28
4.2.12	Migration .....	29
4.2.13	Statistische Auswertung .....	29
5	Ergebnisse .....	30
5.1	Spaltung von IVIG in F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente und deren Aufreinigung .....	30

5.2	Bindungsfähigkeit von IVIG und F(ab') <sub>2</sub> -Fragmenten an Neutrophile und Endothelzellen .....	32
5.3	IVIG, aber nicht F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente oder Humanalbumin hemmen die LPS-induzierte NF-κB-Induktion in humanen Neutrophilen .....	34
5.4	IVIG, aber nicht F(ab') <sub>2</sub> oder Humanalbumin hemmen die LPS-induzierte Apoptoseverzögerung in humanen Neutrophilen .....	36
5.5	IVIG induzieren ERK und p38-Phosphorylierung, sowie die Produktion intrazellulärer Sauerstoffradikale .....	38
5.6	IVIG, aber nicht F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente hemmen die fMLP-induzierte Migration von primären humanen Neutrophilen .....	42
5.7	Zellfreie Überstände LPS-stimulierter Neutrophiler führen zu einer stärkeren NF-κB Aktivierung in Endothelzellen als die alleinige LPS Stimulation .....	44
5.8	Weder IVIG, F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente noch Humanalbumin hemmen die LPS-induzierte NF-κB-Anschaltung in HUVECs .....	46
6	Diskussion .....	48
6.1	Wirkung intravenöser Immunglobuline auf Neutrophilenfunktionen .....	48
6.2	Wirkung Intravenöser Immunglobuline auf Endothelzellen .....	52
6.3	Schluss .....	53
7	Literaturverzeichnis .....	VII

## Abkürzungsverzeichnis

ACR	Albumin Creatinin Ratio
AIHA	Autoimmunhämolytische Anämie
ANCA	Anti-Neutrophile Cytoplasmatische Antikörper
ANS	Akute Nierenschädigung
DAMP	Danger Associated Molecular Patterns
DHR	Dihydrorhodamin-123
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ESL	Endothelial Surface Layer
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting
F(ab') <sub>2</sub>	Fragment antigen-binding
FasR	Fas-Rezeptor
Fc	Fragment crystallizable region
Fcγ-R	Fcγ-Rezeptor
fMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCAEC	Human coronary artery endothelial cell (humane koronararterielle Endothelzellen)
HUVEC	Human umbilical venous endothelial cell (humane umbilikalvenöse Endothelzellen)
IκB-α	Inhibitor of Nuclear Factor kappa B alpha
IgG	Immunglobulin G
ITP	Immunthrombozytopenie
IVIG	Intravenöse Immunglobuline

KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	Monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NET	Neutrophil Extracellular Traps
NF-κB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	Polymorphonuclear leukocyte (Polymorphkerniger Leukozyt, neutrophiler Granulozyt)
PRR	Pattern Recognition Receptor (Mustererkennungsrezeptor)
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
Rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelectrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
TBS-T	Tris-buffered Saline Tween-20
TF	Tissue Factor
TLR	Toll-like-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

# 1 Kurzzusammenfassung

Sepsis ist ein schweres Krankheitsbild in Folge systemischer Infektion, welches teilweise durch die Immunantwort des Wirtes auf zirkulierende Pathogene oder pathogenassoziierte molekulare Muster wie Lipopolysaccharid entsteht. Neben anderen Organdysfunktionen kommt es im Verlauf einer schweren Sepsis häufig zu einem akuten Nierenversagen, welches mit Albuminurie assoziiert ist und dessen Auftreten die Prognose der Patienten verschlechtert.

Intravenöse Immunglobuline (IVIg) sind gepoolte IgG-Antikörper gesunder Spender, welche hochdosiert im Rahmen von autoinflammatorischen Erkrankungen zum Einsatz kommen.

Im murinen Modell eines LPS-induzierten akuten Nierenversagens konnten wir zeigen, dass sowohl Neutrophilendepletion als auch die therapeutische Behandlung mit IVIg vor LPS-induzierter Albuminurie schützen, sowie zu einem verminderten Einstrom von Neutrophilen in die Glomeruli führen.

In dieser Arbeit zeigen wir *in vitro*, dass IVIg die Migration von Neutrophilen auf chemotaktische Stimulation hin hemmen und darüber hinaus den apoptoseverzögernden Effekt von LPS aufheben. Für die proapoptotischen Effekte von IVIg auf Neutrophile liefern wir zwei mögliche Erklärungen: zum einen hemmen IVIg die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Anschaltung in Neutrophilen und zum anderen induzieren sie die Bildung intrazellulärer Sauerstoffradikale, führen aber nicht zu einer Freisetzung dieser in den Extrazellularraum.

Sowohl die antimigratorischen als auch die proapoptotischen Effekte von IVIg auf Neutrophile stellen Erklärungsansätze für die protektive Wirkung im LPS-induzierten akuten Nierenversagen dar, dessen Pathogenese neutrophilenabhängig ist. Es bedarf jedoch weiterer Forschung, um die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen. Während der Einsatz von IVIg bei Sepsis in einer Metaanalyse von Studien mit geringerem Bias-Risiko keinen Benefit zeigte, könnte der gezielte Einsatz bei Patienten, welche zusätzlich ein akutes Nierenversagen entwickeln, ein neues Einsatzgebiet dieses nebenwirkungsarmen Blutprodukts sein, und zur Verbesserung des schlechten Outcomes dieser Patientengruppe beitragen.

## 2 Abstract

Sepsis remains a severe condition with underlying infection and is at least in part mediated by the host's response to circulating pathogens or pathogen associated molecular patterns, such as lipopolysaccharide. Among other organ dysfunctions acute kidney injury (AKI), that is associated with albuminuria, commonly develops during sepsis and is a main reason for the poor prognosis of patients with severe sepsis.

Intravenous immunoglobulins are pooled IgG-antibodies from thousands of healthy donors and are therapeutically applied in high dosage to treat autoinflammatory diseases.

In a murine model of LPS-induced AKI we show that neutrophil depletion as well as therapeutic application of high-dose IVIG attenuate LPS-induced albuminuria and reduce neutrophil influx into glomeruli.

Herein we demonstrate *in vitro* that IVIG inhibit chemotactic migration of neutrophils and furthermore abrogate the antiapoptotic effects of LPS on neutrophils. We propose two possible explanations for the proapoptotic effects of IVIG: on the one hand IVIG inhibit LPS-induced NF- $\kappa$ B-activation in neutrophils and on the other hand treatment of neutrophils with IVIG induces the production of intracellular reactive oxygen species, without increasing the release of superoxide into the extracellular compartment.

Both, the antimigratory and proapoptotic properties of IVIG may explain the protective effects of IVIG in LPS-induced AKI, that has been shown to be neutrophil-dependent, but further research is required to enlighten details of the underlying mechanisms.

While IVIG treatment of septic patients did not show any beneficial effects in meta-analysis of low-bias trials, the targeted application of IVIG in patients, who additionally develop an AKI may be a scope of application for this blood product with few adverse effects, which could improve outcome of this subpopulation of septic patients.

### **3 Einleitung**

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der Wirkung von intravenösen Immunglobulinen (IVIG) auf humane neutrophile Granulozyten und Endothelzellen im Rahmen der Lipopolysaccharid (LPS)-vermittelten Zellaktivierung. In murinen Endotoxinmodellen kommt es zur Schädigung multipler Organsysteme, hierunter auch zu einer akuten und teilweise irreversiblen Nierenschädigung. Die LPS-induzierte Nierenschädigung bildet die komplexe Pathogenese des akuten Nierenversagens im Rahmen der Sepsis durch die Wirkung des bakteriellen Zellwandbestandteils Lipopolysaccharid nach.

Im Folgenden werden zunächst die Krankheitszustände Sepsis, akutes Nierenversagen und Albuminurie und die zugrunde liegenden pathophysiologischen Zusammenhänge erläutert, wobei insbesondere auf die Rolle der neutrophilen Granulozyten eingegangen wird. Desweiteren erfolgt eine Übersicht über die Indikationen und Wirkungen von IVIG und über präliminäre Ergebnisse aus unserem Labor, woraus die dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung resultierte.

#### **3.1 Klinischer Kontext**

##### **3.1.1 Sepsis und Endotoxämie**

Sepsis ist ein schweres Krankheitsbild mit einer hohen Letalität und die häufigste Todesursache intensivpflichtiger Patienten in der westlichen Welt.<sup>1,2</sup> Durch das wachsende Verständnis der Pathogenese und neue Erkenntnisse in der intensivmedizinischen Behandlung septischer Patienten unterliegt die Definition der Sepsis regelmäßigen Veränderungen und wurde 2016 im Rahmen der Sepsis 3 Konsensus Definition erneuert. Hiernach ist Sepsis eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, welche durch eine dysregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion hervorgerufen wird.<sup>3</sup> Die Endorganschädigung wird nach dem SOFA-Score (Sepsis-related/Sequential Organ Failure Assessment Score – siehe Tabelle 1) beurteilt, welcher Atmungs-, Gerinnungs-, Herz-Kreislauf-, Leber-, ZNS und Nierenfunktion berücksichtigt.<sup>4</sup> Die klinische Diagnose einer Sepsis kann bei einem durch Infektion bedingten Anstieg des SOFA-Scores  $\geq 2$  Punkte gegenüber einem Ausgangswert (0 Punkte für unbekannte Patienten) gestellt werden. Damit wird gegenüber den zuvor angewandten SIRS Kriterien die Organdysfunktion in das Zentrum der Erkrankung gestellt, da diese prognosebestimmend ist.<sup>5</sup>

Ferner wird der septische Schock als Unterform der Sepsis unterschieden, der durch Störungen der Hämodynamik und Zirkulation, sowie zelluläre und metabolische Funktionsstörungen zu einem aggravierten Krankheitsbild mit deutlicher Mortalitätssteigerung über 40% führt. Klinisch fallen Patienten mit septischem Schock zusätzlich durch persistierende Hypotension mit Vasopressorbedarf zur Aufrechterhaltung eines arteriellen Mitteldrucks  $\geq 65$  mmHg und einem Serumlaktat  $> 2$  mmol/L (18 mg/dl) trotz adäquater Volumensubstitution auf.<sup>6</sup>

<b>SOFA Score</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Atmung</b>				
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mmHg)	<400	<300	<200 mit Atemunterstützung	<100 mit Atemunterstützung
<b>Gerinnung</b>				
Thrombozyten (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	<150	<100	<50	<20
<b>Leber</b>				
Bilirubin (mg/dl)	1,2 – 1,9	2,0 - 5,9	6,0 - 11,9	>12,0
<b>Kardiovaskulär <sup>1</sup></b>				
Hypotonie	Arterieller Mitteldruck <70 mmHg	Dopamin ≤5 oder Dobutamin	Dopamin >5 oder Noradrenalin ≤0.1	Dopamin >15 oder Noradrenalin >0.1
<b>ZNS</b>				
Glasgow Coma Scale	13 - 14	10 - 12	6 - 9	<6
<b>Niere</b>				
Kreatinin (mg/dl) oder verminderte Urinproduktion (ml/d)	1,2 - 1,9	2,0 - 3,4	3,5 – 4,9 oder <500	>5,0 oder <200

**Tabelle 1:** SOFA-Score (adaptiert nach Singer et al. <sup>3</sup>) - Punktesystem zur Abschätzung der Organdysfunktion bei Sepsis nach Sepsis-3 Definition. Ein infektionsbedingter Anstieg des SOFA-Scores  $\geq 2$  Punkte definiert eine Sepsis. <sup>1</sup> Katecholamindosen in  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  bei Applikation für mindestens 1h. PaO<sub>2</sub> – arterieller Sauerstoffpartialdruck, FiO<sub>2</sub> – inspiratorische Sauerstofffraktion.

Endotoxämie hingegen bezeichnet das Vorhandensein von Endotoxin, also Lipopolysaccharid (LPS) im Blut. Ebenso wie eine Bakteriämie (das Vorhandensein von Bakterien im Blut) ist eine Endotoxämie bei Sepsis zwar häufig nachweisbar, wird aber ebenso bei anderen Krankheitszuständen und bei Gesunden nach starker sportlicher Belastung<sup>7</sup>, nach einer fettreichen Mahlzeit<sup>8</sup> oder bei Rauchern<sup>9</sup> angetroffen. Da nicht alle Bakterien Endotoxin freisetzen, ist eine Endotoxämie jedoch keine Voraussetzung für die Entstehung einer Sepsis.

### 3.1.2 Akute Nierenschädigung im Rahmen der Sepsis

Sepsis geht oft mit einer akuten Nierenschädigung (ANS) einher, welche die Prognose der Patienten weiter verschlechtert.<sup>10</sup> Der SOFA-Score berücksichtigt die Schwere der ANS abhängig

vom Kreatinin im Serum mit 0 bis 4 Punkten, wobei 0 Punkte keine und 4 Punkte eine schwere Nierenfunktionseinschränkung anzeigen. Alternativ dazu kann auch eine verminderte Urinausscheidung <500 ml (3 Punkte) bzw. <200 ml pro Tag (4 Punkte) Ausdruck einer schweren Nierenschädigung bei Sepsis sein.

Sepsis kann auch ohne septischen Schock und folglich adäquatem Perfusionsdruck zur Nierenfunktionseinschränkung führen. Diese ist demnach nicht zwangsläufig im Rahmen eines Schocks und des damit verminderten renalen Perfusionsdrucks zu erklären, sondern ihr liegt eine intrarenale Pathogenese mit der Beteiligung von Immunzellen, ortsständigen Zellen und zahlreichen Mediatoren zugrunde.

Neben der Ausscheidung von sogenannten Urämietoxinen (u.a. Harnstoff und Kreatinin), der Regulation der Erythropoese, des Elektrolyt- und Säurebasehaushalts und der Volumenregulation kommt der Niere, und hierbei insbesondere dem glomerulären Filter eine zentrale Bedeutung beim Zurückhalten von Albumin und anderen Proteinen im Blutkreislauf zu. Ist diese Funktion gestört, kommt es zur Ausscheidung des ubiquitären Plasmaproteins Albumin in den Urin – der sogenannten Albuminurie.

Diese wird üblicherweise in Mikroalbuminurie, welche als Albuminausscheidung von 30 - 300 mg Albumin im 24-Stunden-Urin definiert ist und ein häufiges Frühsymptom einer diabetischen Nephropathie darstellt und Makroalbuminurie eingeteilt. Aktuelle Untersuchungen belegen die Bedeutung der Albuminurie als Schädigungsmarker beim akuten Nierenversagen, und werden unter 3.5 genauer beleuchtet.

### **3.2 Pathophysiologie der Sepsis**

Trotz der zahlreichen Erkenntnisse, die in den letzten Jahren zur Pathogenese der Sepsis gesammelt wurden, konnten neue immunmodulierende Pharmaka keinen Nutzen in klinischen Studien zeigen. Das könnte daran liegen, dass Sepsis als Krankheit zu heterogen ist, um bei allen Patienten gleich behandelt zu werden.

Während der Auslöser eines septischen Geschehens eine Infektion ist, kommt es im Verlauf der Erkrankung zunächst zu einer Verstärkung der Immunantwort und anschließend zu ihrer kompletten Dysregulation entweder in Richtung Hyperinflammation mit Überaktivierung der angeborenen Immunantwort, Zytokinsturm und einer Aktivierung des Gerinnungssystems oder aber durch überwiegend antiinflammatorische Effekte zu einer Überwältigung des Immunsystems durch das Pathogen mit ebenso fatalen Folgen für den Wirt.

Die häufigsten Pathogene, die bei septischen Patienten gefunden werden, sind die grampositiven Bakterien *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus*, sowie die gramnegativen Bakterien *Escherichia coli*, *Klebsiella* ssp. und *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>11,12</sup> Ferner nimmt in

Anbetracht der steigenden Zahl immunkompromittierter Patienten die Zahl von Pilzinfektionen mit *Candida ssp.* zu.

Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) sind essentiell für die Erkennung von körperfremden Strukturen und führen zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen konservierte molekulare Muster von Pathogenen (engl. Pathogen Associated Molecular Patterns – PAMPs) wie Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglycane, Lipopeptide, Lipoteichonsäure (Zellwandkomponente grampositiver Bakterien), Flagellin (ein bakterieller Motilitätsfaktor) und bakterielle DNA.<sup>13,14</sup> Darüber hinaus sind sie in der Lage endogene Gefahrensignale zu erkennen (engl. Danger Associated Molecular Patterns – DAMPs), welche im Rahmen von akutem Stress (z.B. Verbrennung, Trauma, Gewebsnekrose) freigesetzt werden und ebenfalls zu einer Aktivierung des Immunsystems führen.<sup>15,16</sup> Neben den membranständigen PRR, deren wichtigste Vertreter die Toll Like Rezeptoren (TLRs) sind, existieren auch intrazelluläre PRR – NOD-like Rezeptoren und RIG-I-like Rezeptoren.

TLR spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Sepsis. Zum einen sind sie unentbehrlich für die rasche Erkennung der Pathogene und die Einleitung einer Immunantwort, was sich bei Kindern mit Defizienz im MyD88<sup>17</sup> oder IRAK4-Gen<sup>18</sup> zeigt, welche unter rekurrierenden purulenten Infektionen leiden. Beides sind Signalmoleküle, die zentral in die Signaltransduktionskaskade der TLRs involviert sind.

Andererseits kann eine unkontrollierte TLR-Stimulation durch PAMPs oder durch inflammatorischen Stress freigesetzte DAMPs, zur Gewebeschädigung führen und somit durch weitere DAMP-Freisetzung die inflammatorische Antwort perpetuieren.

TLR4 als klassischer LPS-Rezeptor wird zum Beispiel auch durch zahlreiche DAMPs wie Hitzeschockproteine, Fibrinogen, Hyaluronsäure und high-mobility group box-1 protein (HMGB-1) aktiviert.<sup>19,20</sup>

Neben den zellulären Effektoren der angeborenen Immunantwort kommt auch dem Zytokinmilieu große Bedeutung in der Regulation der Immunantwort zu. Die beiden am besten untersuchten Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 sind in der Lage, Immunzellen zu aktivieren und die Produktion weiterer Entzündungsmediatoren zu stimulieren. Verschiedene weitere proinflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  und G-CSF sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 sind ebenfalls bekannte Regulatoren der Wirtsantwort bei Sepsis.

Ferner kommt es bei Sepsis häufig zu Veränderung der Blutgerinnung, welche von geringfügigen Laborwertveränderungen bis zu einer fulminanten disseminierten intravasalen Koagulation (DIC) reichen können, welche in 30 – 50 % der Patienten mit septischem Schock auftritt.

Sepsis führt zu einem prokoagulatorischen Zustand, der über (a) Tissue Factor (TF) -vermittelte Thrombinbildung, (b) dysfunktionale antikoagulative Mechanismen und (c) eingeschränkte Fibrinolyse zur vermehrten Fibrinablagerung führt.

TF kann in Form von Mikropartikeln von Leukozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Thrombozyten abgegeben werden und dann an nicht TF-produzierende Zellen, wie Neutrophile binden, was ebenfalls zur Entstehung der Sepsis beiträgt.<sup>21</sup>

Den Zellen des angeborenen Immunsystems – besonders den Neutrophilen als größte Leukozytenpopulation im peripheren Blut – und ihrer Aktivierung durch PAMPs kommt somit eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Sepsis zu, aus ihrer Beeinflussung würden sich neue therapeutische Möglichkeiten ergeben.

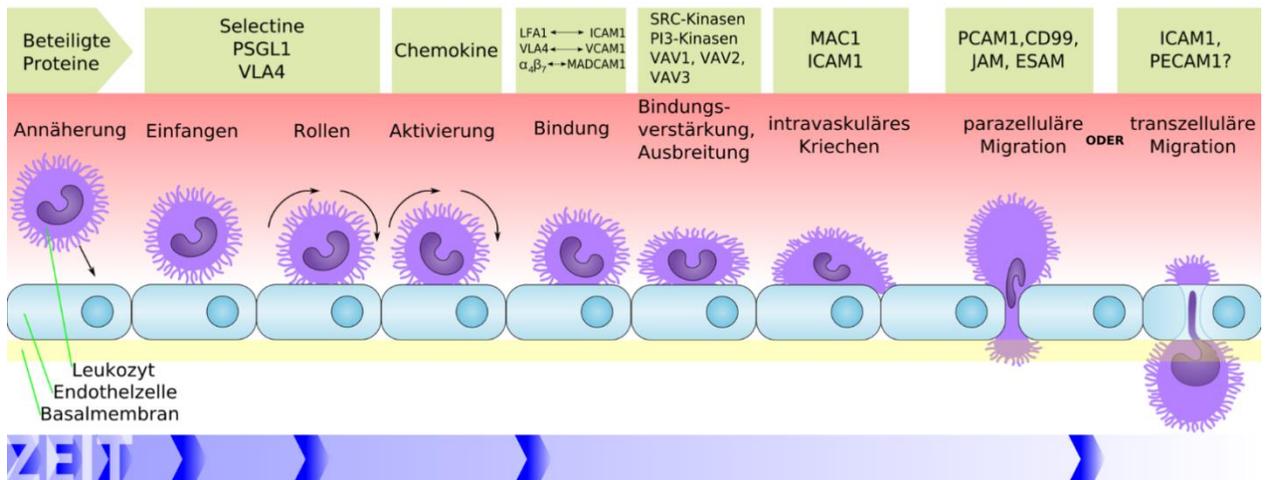
### **3.3 Neutrophile**

Neutrophile (Synonym: neutrophile Granulozyten, polymorphkernige Neutrophile – PMN) gehören zu den wichtigsten zellulären Effektoren der angeborenen Immunantwort auf Verletzung oder Infektion und machen beim Menschen 50 - 70% der Leukozyten im peripheren Blut aus. Sie zeichnen sich durch einen segmentierten Zellkern, sowie zahlreiche Granula und sekretorische Vesikel im Zytoplasma aus.

Um zur Auflösung von Infektion und Gewebeschädigung beizutragen, können Neutrophile nach Anheftung und Rollen auf dem Endothel durch dieses migrieren und so an den Ort der Entzündung gelangen (*siehe Abbildung 1*). Die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1) von gewebeständigen Entzündungszellen führt u.a. durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zur vermehrten Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen, wodurch die Bindung von zirkulierenden Leukozyten ermöglicht wird. Unterstützt wird dies durch eine Vasodilatation und der resultierenden Flussverlangsamung. Diese entsteht durch eine verstärkte endotheliale NO-Synthese, ausgelöst durch die Freisetzung von Histamin und Thrombin.

Durch die zahlreichen proinflammatorischen Mediatoren, die auf die Endothelzellen wirken, ziehen sich diese zusammen und die dichten Zonulae occludentes (engl. tight junctions, deutsch: Schlussleistenkomplex) zwischen ihnen lockern sich, wodurch es zum Austritt von Plasmaflüssigkeit ins Interstitium und zur Ausbildung des entzündlichen Ödems kommt.

# Die einzelnen Phasen der Leukozytenmigration



**Abbildung 1: Phasen der Leukozytenmigration.** (Quelle: „Leukozytenmigration 01“ von Armin Kübelbeck. Lizenziert unter Creative Commons Attribution 3.0 über Wikimedia Commons [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leukozytenmigration\\_01.pngmediaviewer/Datei:Leukozyte](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leukozytenmigration_01.pngmediaviewer/Datei:Leukozyte))

Leukozyten können nun entlang eines Chemokingradienten (u.a. IL-8) durch zytoskelettale Umformungen und Ausbildung einer zellulären Polarität durch die Lücken im Endothel hindurchwandern. Neben dieser parazellulären Migration können Leukozyten auch transzellulär durch die Endothelzellen selbst ins subendotheliale Bindegewebe gelangen. Um weiter dem Chemokingradienten zum Entzündungsfokus zu folgen, müssen die Basalmembran und Schichten aus Binde- und Stützgewebe durch degradierende Enzyme wie Elastasen, Proteasen und Hyaluronidasen überwunden werden.

Nach dem Vordringen zum Entzündungsort stehen den Neutrophilen verschiedene Mechanismen der Pathogenelimination zur Verfügung. Sie sind in der Lage, über PRR, Fc-R und Komplementrezeptoren freie oder mit Antikörpern bzw. Komplement beladene Pathogene zu erkennen und anschließend zu phagozytieren. Diese können anschließend mittels reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und durch die Fusion des Phagosoms mit den zahlreichen mikrobiziden Granula effektiv abgetötet werden.

Bei der Phagozytose kommt es im Rahmen des „respiratory burst“ zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs von Granulozyten um das 50 bis 100-fache, was bereits 1933 durch Baldrige und Gerhard beschrieben wurde. Die Aktivierung der Neutrophilen führt zur Rekrutierung zytosolischer Faktoren (p47, p67, p40, und rac2) an membrangebundenes Cytochrom B558 und somit zur Formierung der aktiven NADPH-Oxidase, welche die Übertragung eines Elektrons von zytosolischem NADPH auf  $O_2$  unter der Bildung von  $O_2^-$  (Superoxidradikal bzw. Superoxidation) katalysiert. Aus den entstehenden Superoxidradikalen wird unter Katalyse des Enzyms Superoxiddismutase  $H_2O_2$  gebildet. Diese beiden frühen ROS sind für das Abtöten für Bakterien und anderen Pathogenen nicht ausreichend, weshalb aus ihnen in Folgereaktionen andere

Substanzen mit höherer mikrobizider Potenz synthetisiert werden. Neutrophilenspezifisch kommt in den primären azurophilen Granula, welche bei der Neutrophilenaktivierung mit den Phagosomen verschmelzen, das Enzym Myeloperoxidase vor. Es katalysiert die Reaktion von  $H_2O_2$  mit  $Cl^-$  Ionen zu hypochloriger Säure (HOCl), einer stark mikrobiziden ROS.

Der zweite wesentliche Abwehrmechanismus gegen phagozytierte Pathogene sind die neutrophilen Granula, von denen drei verschiedene Formen existieren: Azurophile oder primäre Granula werden früh im Rahmen der Neutrophilendifferenzierung gebildet und enthalten eine Vielzahl an präformierten Proteinen, die im Rahmen der Pathogenabtötung in die Phagosomen abgegeben werden.

Spezifische Granula enthalten verschiedene antimikrobiell wirksame Proteine, während Gelatinase-Granula mit Enzymen angereichert sind, welche exozytiert werden und im Rahmen der transendothelialen Migration die Degradation von interzellulären Verbindungen und EZM bewirken. Ferner existieren sekretorische Vesikel, die als intrazellulärer Membranspeicher fungieren, welcher bei Neutrophilenbewegung zum Inflammationsfokus und Phagozytose an die Zelloberfläche mobilisiert wird und zahlreiche membranständige Proteine enthält.<sup>22</sup>

Da ROS wie Superoxidanionen und Enzyme wie Kollagenase, Elastase, Gelatinase und Proteinase-3 außer in die Phagosomen auch in das umliegende Gewebe abgegeben werden, wo sie neben Mikrobizidie auch Gewebetoxizität vermitteln, ist eine schnelle und möglichst gut regulierte Entfernung der Neutrophilen vom Entzündungsort essentiell für eine Begrenzung der Gewebeschädigung. Während Nekrose zur unkontrollierten Freisetzung von Neutrophilenspezifischen toxischen Agenzien und proinflammatorischen DAMPs führen würde, zeigen Neutrophile vor allem zwei Arten des Zelltods: Apoptose und NETose. Unter nicht inflammatorischen Bedingungen wandern Neutrophile bereits nach wenigen Stunden aus der Zirkulation in Knochenmark, Leber und Milz aus und gehen dort in den kontrollierten Zelltod, die Apoptose. Dabei sterben sie zügig und ohne Freisetzung intrazellulärer Substanzen und werden anschließend von ortsständigen Makrophagen phagozytiert und abgebaut. Durch inflammatorische Stimuli wie LPS verzögert sich die Apoptose der Neutrophilen stark, wodurch sie zur Ausübung ihrer mikrobiziden Effekte am Entzündungsort befähigt werden.<sup>23,24</sup> Anschließend gehen sie am Entzündungsort in die Apoptose und werden wiederum von Makrophagen entfernt.

Die beschriebenen antimikrobiellen Abwehrmechanismen der Neutrophilen sind zwar hocheffektiv, aber unselektiv, weshalb sie ihre Aufgabe, Infektionen oder Verletzungen zu beseitigen, auf Kosten einer Gewebeschädigung erfüllen. Der neutrophilenvermittelten Gewebeschädigung, welche Lunge<sup>25-28</sup>, Leber<sup>29</sup>, Niere<sup>30</sup> und Gastrointestinaltrakt<sup>31</sup> betreffen kann, kommt auch in der Pathogenese der Sepsis eine zentrale Rolle zu.

### 3.4 Pathophysiologie der Albuminurie

Albuminurie ist eine der wichtigsten Folgen einer Schädigung der glomerulären Barriere und kann im Rahmen von Glomerulonephritiden schwerste Ausprägungen im Sinne eines nephrotischen Syndroms annehmen. Dabei tragen zelluläre und nicht-zelluläre Bestandteile in unterschiedlichem Maße zur glomerulären Integrität bei.

#### *Podozyten:*

Podozyten sind die spezialisierten und hoch differenzierten epithelialen Zellen des Glomerulus und bilden das innere Blatt der Bowman'schen-Kapsel. Diese spezialisierten Zellen bestehen aus einem großen Zellkörper und langen zytoplasmatischen Fußfortsätzen zwischen denen jeweils ein Filtrationsschlitz von 25 – 60 nm Breite entsteht, der von einem Diaphragma bedeckt ist.<sup>32</sup>

Die molekularen Komponenten des Diaphragmas (u.a. Nephrin) sind unentbehrlich für die glomeruläre Permselectivität, was bei Mutationen im Nephrin-Gen deutlich wird, die zur kongenitalen Proteinurie führen.<sup>33,34</sup>

Weiterhin kann elektronenmikroskopisch im Rahmen proteinurischer Erkrankungen häufig eine Veränderung der Struktur der Podozytenfüßchen (engl. podocyte effacement) und auch die Apoptose und Ablösung der Podozyten von der glomerulären Basalmembran beobachtet werden.<sup>35</sup> Diese strukturellen Veränderungen im Zytoskelett und in den Zell-Zell-Verbindungen der Podozyten können sowohl Folge als auch Ursache einer Proteinurie sein, verdeutlichen aber die zentrale Rolle der Podozyten für die glomeruläre Integrität.<sup>34,35</sup>

#### *Glomeruläre Basalmembran:*

Die GBM besteht aus einem Netzwerk aus Typ IV Kollagen, Laminin und Nidogen, welche mit Proteoglycanen wie Perlecan und Agrin sowie verschiedenen Glykoproteinen verknüpft sind.<sup>36</sup> Da die GBM die gemeinsame Basalmembran von Endothelzellen und Podozyten darstellt, ist sie mit 240 – 370 nm wesentlich dicker als die anderer Gefäßbetten (40 – 80 nm).<sup>36</sup> Während lange Zeit angenommen wurde, die GBM bilde den wichtigsten Teil der glomerulären Barriere, konnte sich diese Annahme bei der in vitro Untersuchung isolierter Basalmembranen nicht bestätigen.<sup>38,39</sup> Sie stellt dennoch einen wichtigen Teil der glomerulären Barriere dar, da sie in wesentlichem Maße zur Begrenzung des Flüssigkeitsflusses beiträgt.

#### *Endothelzellen & Glykokalix:*

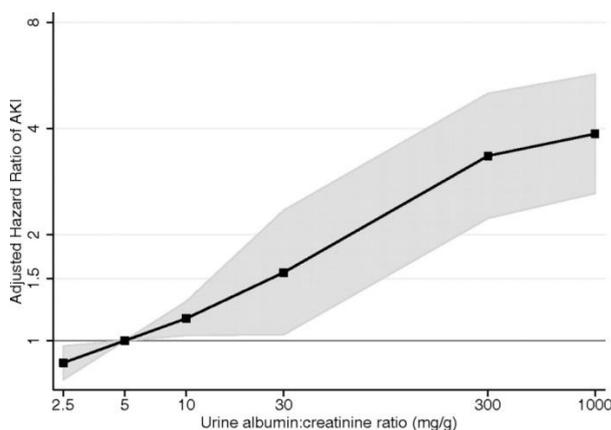
Glomeruläre Endothelzellen sind besonders flach und stark fenestriert, was eine hohe Permeabilität für Wasser und kleine gelöste Stoffe ermöglicht. Während die Fenestrae einen Durchmesser von ca. 60 nm haben, beträgt der hydrodynamische Radius von Albumin lediglich 3,6 nm, was die Annahme nahe legt, die Endothelzelle leiste keinen Beitrag zur Permselectivität der glomerulären Barriere. Jedoch wurde von Rostgaard und Qvortrup eine hohe Dichte von

Fasern in den Fenestrae beschrieben,<sup>40</sup> und auch andere Befunde deuten auf eine permselektive Schicht auf Höhe der Endothelzellschicht hin.<sup>41-43</sup> Eine besondere Bedeutung scheint dabei die die Endothelzellen umgebende Oberflächenschicht (engl. endothelial surface layer) zu haben. Die ESL besteht neben der Glykokalix, dem an die Plasmamembran gebundenen Teil, aus einem größeren, lockerer verbundenen Teil – dem endothelialen Zellmantel (engl. endothelial cell coat). Die ESL enthält negativ geladene Glykoproteine, Glykosaminoglykane und membranassoziierte und sezernierte Proteoglykane und ist an der Regulation von Gerinnung<sup>44</sup>, Angiogenese<sup>45</sup>, Rheologie<sup>46</sup>, und der Funktion der kapillären Barriere<sup>43</sup> beteiligt. Mesangialzellen, der vierte Zelltyp des Glomerulus, sind myofibroblastenähnliche Zellen, deren Anteil an der Permselektivität der glomerulären Barriere eher gering ist. Gemeinsam mit der von ihnen synthetisierten extrazellulären Matrix bilden sie das glomeruläre Mesangium, welches für den Erhalt der Struktur und Funktion des Glomerulus verantwortlich ist. Krankheitszustände mit Beteiligung des Mesangiums, wie die IgA-Nephropathie<sup>47</sup> und die diabetische Nephropathie<sup>48</sup> sind meist durch mesangiale Proliferation und Matrixerweiterung gekennzeichnet, was zur Reduzierung der Filtrationsfläche bis hin zur Okklusion des Kapillarlumens führt.

Die Schädigung jeder Schicht der glomerulären Barriere kann zum Verlust der Permselektivität führen, was die Rationale für die Untersuchung der Bedeutung glomerulärer Endothelzellen in der Entstehung der LPS-induzierten Albuminurie darstellt.

### 3.5 Albuminurie und Akutes Nierenversagen

Albuminurie ist ein bekannter Risikofaktor für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, chronischem Nierenversagen und Tod. Grams et al. identifizierten Albuminurie zudem als eigenständigen Risikofaktor für das Auftreten einer akuten Nierenschädigung (s. *Abbildung 2*).<sup>49</sup>



**Abbildung 2: Albuminurie ist ein eigenständiger Risikofaktor für das Auftreten einer akuten Nierenschädigung** (entnommen a3us Grams et al. <sup>49</sup> – mit freundlicher Genehmigung von Prof. Josef Coresh – coresh@jhu.edu).

An abdominalchirurgisch behandelten Patienten konnte gezeigt werden, dass die präoperative Albumin-Creatinin-Ratio (ACR) bei Patienten, die im Verlauf eine akute Nierenschädigung entwickelten, signifikant erhöht war.<sup>50</sup> Ferner wurde bei herzchirurgisch behandelten Patienten gezeigt, dass sich die ACR neben NGAL und IL-18 als Biomarker für eine akute Nierenschädigung eignet.<sup>51</sup> Es ist zudem bekannt, dass eine akute Nierenschädigung einen Risikofaktor für die Entstehung eines chronischen Nierenversagens darstellt, welches wiederum stark mit dem Auftreten von Albuminurie assoziiert ist. Einer Albuminurie kommt deshalb auch als Schadensmarker der akuten Nierenschädigung eine immer größere Bedeutung zu, was als Rationale dafür diente, die durch LPS ausgelöste Albuminurie als Endpunkt in einem Modell von LPS-induzierter akuter Nierenschädigung der Maus zu verwenden.

### **3.6 Intravenöse Immunglobuline**

#### **3.6.1 Allgemeines, Zulassung, Anwendungsgebiete und Pharmakologie der Intravenösen Immunglobuline**

Intravenöse Immunglobuline (IVIG) sind ein Blutprodukt und bestehen aus gepoolten IgG-Antikörpern aus dem Plasma von ca. 3000 - 60000 gesunder Spender.<sup>52</sup> Während sie initial zur Behandlung von Immundefizienzsyndromen mit Hypogammaglobulinämie eingesetzt wurden,<sup>53</sup> erkannte man früh ihre immunmodulierende Wirkung bei Erkrankungen wie der Immunthrombozytopenie (ITP)<sup>54,55</sup> und dem Kawasaki-Syndrom.<sup>56</sup>

Neben der indizierten Therapie bei ITP, Kawasaki-Syndrom, Guillain-Barré-Syndrom (GBS) und der chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP), kommen IVIG Off-Label bei therapierefraktären Patienten mit verschiedensten chronisch inflammatorischen Erkrankungen, u.a. Multipler Sklerose (MS), systemischen Vaskulitiden, Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD), rheumatoider Arthritis (RA), systemischem Lupus erythematoses (SLE), autoimmunhämolytischer Anämie (AIHA) aber auch bei akuten hyperinflammatorischen Erkrankungen wie Sepsis zur Anwendung.<sup>57-59</sup>

Eine Subgruppenanalyse aus dem Jahr 2013 von zehn Studien ergab zwar, dass die Behandlung mit IVIG bei Patienten mit Sepsis zu einer signifikanten Mortalitätsreduktion führte. Dennoch ist eine Erstlinientherapie mit IVIG bei Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock nach aktuellem Stand der Forschung nicht begründet, da, wurden nur erstklassige Studien mit geringem Bias-Risiko ausgewertet, IVIG-Behandlung keine signifikante Mortalitätsreduktion zeigte.<sup>60</sup> Entsprechend wird eine additive Therapie mit IVIG bei Erwachsenen mit schwerer Sepsis oder septischem Schock in der S2-Leitlinie Sepsis aus dem Jahr 2010 nicht empfohlen.<sup>61</sup> Offen bleibt dabei, ob IVIG in therapierefraktären Fällen oder bei Patienten mit akutem Nierenversagen wirksam sind. Die Beantwortung dieser Frage hat eine große Bedeutung, da durch die hohe Mortalität und Prävalenz der Sepsis immer noch sehr viele Patienten profitieren könnten.

IVIG kommen prinzipiell in zwei verschiedenen Dosierungen, niedrig- und hochdosiert, zur Anwendung. Bei Immundefizienzsyndromen kommt die niedrige Dosis von 0,5 g/kg Körpergewicht (KG) zum Einsatz, wohingegen bei autoinflammatorischen Erkrankungen die Dosierungen 1 – 3 g/kg KG betragen.<sup>62</sup>

Während die IgG-Serum-Spiegel von Gesunden bei 7 - 16 mg/ml liegen, wurden bei Patienten mit GBS zwei Wochen nach hoch-dosierter IVIG-Gabe (2 g/kg KG) Serum-IgG-Spiegel von durchschnittlich 18,8 mg/ml und bei einzelnen Patienten sogar solche über 30 mg/ml gemessen.<sup>63</sup>

### **3.6.2 Mechanismen der immunmodulatorischen Wirkung von IVIG**

Die exakten Mechanismen der Wirkung von IVIG sind nur unvollständig geklärt, wobei die Vielzahl der existierenden Hypothesen kurz beleuchtet werden soll.

#### *IVIG interagieren mit Fc-Rezeptoren:*

Bei der ITP und AIHA geht man davon aus, dass die Hauptwirkung über die Blockade von Fcγ-Rezeptoren (Fcγ-R) des mononukleären Phagozytensystems zustande kommt, wodurch ein Abbau von autoantikörperbeladenen Thrombozyten bzw. Erythrozyten effektiv verhindert wird.<sup>64</sup> Zusätzliche Bedeutung wird den inhibitorischen Fcγ-RIIb zugeschrieben, da deren experimentelle Ausschaltung im murinen Modell zur Aufhebung des protektiven IVIG-Effekts führte.<sup>65</sup> Vermutlich wird durch die Bindung von IVIG an diese Rezeptoren der Aktivierungszustand und damit die Phagozytoseleistung der Monozyten bzw. Makrophagen herunterreguliert, was zu einer verlängerten Überlebenszeit von autoantikörperbeladenen Thrombozyten bzw. Erythrozyten führt.

Es existieren außer Fcγ-R auch weitere Fc-Rezeptoren, u.a. FcRn, welche über Pinozytose internalisierte Immunglobuline binden und so vor lysosomaler Degradation schützen. Hohe zirkulierende IgG-Konzentrationen könnten diese Rezeptoren blockieren und in der Folge würden zirkulierende Autoantikörper schneller abgebaut werden, was als möglicher immunmodulatorischer Mechanismus bei autoantikörpervermittelten Erkrankungen diskutiert wird.<sup>66</sup>

#### *IVIG modulieren NF-κB:*

NF-κB ist ein zentraler Transkriptionsfaktor, der die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen stimuliert und normalerweise an seinen Inhibitor IκB-α gebunden vorliegt. Zahlreiche Stimuli, u.a. die Bindung von LPS an TLR4 führen zur Phosphorylierung von IκB-α durch IκB-Kinasen mit nachfolgender Degradation von IκB-α, wodurch der NF-κB-Komplex in den Kern translozieren und dort die Genexpression modulieren kann.

Es gibt in vitro Daten in humanen koronaren Endothelzellen <sup>67</sup> und Monozyten <sup>68</sup>, welche inhibitorische Effekte von IVIG auf die NF-κB-Signaltransduktion zeigen, was insbesondere beim Kawasaki-Syndrom als wichtiger Wirkmechanismus gilt, jedoch auch für viele andere Erkrankungen von Bedeutung sein könnte.

*IVIG enthalten anti-idiotypische Antikörper:*

Ein alternativer Mechanismus ist die Anwesenheit von natürlich vorkommenden Antikörpern, die gegen das Paratop von Autoantikörpern gerichtet sind. Diese anti-idiotypischen-Antikörper in IVIG sind für viele häufig vorkommende Autoantikörper nachgewiesen worden, darunter anti-DNA-Ak,<sup>69,70</sup> anti-Phospholipid-Ak,<sup>70,71</sup> anti-Faktor-VIII-Ak, anti-Intrinsic-Factor-Ak, anti-Thyreoglobulin-Ak <sup>69</sup> und auch ANCA <sup>72</sup>. Ob die Menge für einen immunmodulierenden Effekt ausreicht, ist schwer abzuschätzen, wobei zu berücksichtigen ist, dass durch IVIG-Therapie gleichwohl hohe IgG-Konzentrationen erreicht werden.

*IVIG enthalten anti-Fas-agonistische- und -antagonistische-Antikörper:*

Der Fas-Rezeptor ist ein Todesrezeptor, der nach Interaktion mit dem Fas-Liganden zur Apoptoseinduktion in der Fas-Rezeptor-tragenden Zelle führt. In IVIG wurden sowohl antagonistische anti-Fas-Rezeptor-Antikörper, welche antiapoptotisch wirken, als auch agonistische anti-Fas-Rezeptor-Antikörper gefunden, die die Apoptose von Fas-tragenden Zellen induzieren.<sup>73,74</sup> Bei der toxischen epidermalen Nekrolyse (TEN) führte die Behandlung mit IVIG zur Reduktion der Hautläsionen bei allen Patienten einer Pilotstudie <sup>75</sup> und aktuellen Metaanalysen zufolge tragen IVIG zur Mortalitätsreduktion bei Patienten mit TEN bzw. Stevens Johnson Syndrom bei.<sup>76</sup> Pathogenetisch geht man davon aus, dass Fas-L tragende Keratinozyten zur Apoptoseinduktion von benachbarten Keratinozyten führen, was eine bullöse Hautablösung zur Folge hat. Antagonistische anti-Fas-Rezeptor-Antikörper können hier hemmend auf die Keratinozytenapoptose wirken.

*IVIG verringern die Leukozyten-Rekrutierung:*

In einem murinen multiple Sklerose Modell konnte durch die Behandlung mit IVIG eine signifikante Reduktion von Leukozytenanhaftung und –rolling gezeigt werden. In vitro konnte eine verminderte Bindung von IVIG-behandelten Leukozyten der o.g. Mäuse an immobilisiertes VCAM und eine verminderte Anheftung von IVIG-behandelten Leukozyten von MS-Patienten an humane Endothelzellen gezeigt werden.<sup>77</sup> Möglicherweise spielen diese Mechanismen auch in anderen inflammatorischen Settings eine Rolle.

#### *Anti-Zytokin-Antikörper:*

In IVIG konnten natürlich vorkommende Antikörper gegen GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IFN- $\alpha$ <sup>78</sup> und IFN- $\gamma$ <sup>79</sup> gefunden werden. Eine antikörpervermittelte Regulation des Zytokinmilieus könnte somit zur Begrenzung auto- oder hyperinflammatorischer Zustände beitragen. Ein direkter Einfluss auf das Zytokinmilieu durch IVIG-Gabe ist aufgrund der sehr niedrigen Zytokinspiegel in IVIG-Präparationen unwahrscheinlich.<sup>80</sup>

### **3.6.3 IVIG-Effekte auf Neutrophile**

Es existieren sowohl in vitro als auch in vivo Daten zur Wirkung von IVIG auf Neutrophile als auch auf die Wechselwirkung von Neutrophilen und Endothelzellen.

Insbesondere die in vitro Daten liefern zum Teil widersprüchliche Informationen über die Funktionen, die IVIG in Neutrophilen beeinflussen.

Teeling et al. konnten nachweisen dass IVIG zur Degranulation der Neutrophilen führen, wobei dieser Effekt durch anti-Fc $\gamma$ -RII-mAb unterdrückbar war und durch dimere und polymere Immunglobuline in IVIG-Zubereitungen getriggert wurde.<sup>81</sup>

Einen weiteren Aspekt fanden Jarius et al., als sie ANCA-ähnliche Antikörper in IVIG fanden und gleichzeitig nachweisen konnten, dass sowohl IVIG als auch deren F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente Radikalproduktion in TNF- $\alpha$  geprimten Neutrophilen induzieren können.<sup>82</sup>

IVIG üben immunmodulatorische Effekte im Rahmen von Autoimmunität und -inflammation aus, was teilweise durch die Beeinflussung der Neutrophilen bedingt ist.

Takeshita et al. zeigen, dass IVIG in LPS behandelten Neutrophilen proapoptotisch wirken, nicht aber in unstimulierten Neutrophilen. Ferner zeigen sie, dass dies nicht Fas-abhängig, sondern Fc $\gamma$ -R-abhängig abläuft.<sup>83</sup>

Vor dem Hintergrund der vorherigen Studien, analysierten Casulli et al. den Einfluss von IVIG auf verschiedene Neutrophilenfunktionen konzentrationsabhängig und haben dabei für die Behandlung mit niedrigen Dosen IVIG (1 mg/ml – 5 mg/ml), was den therapeutischen Plasmaspiegeln in Patienten mit primären Immundefizienzsyndromen entspricht, folgende Effekte beobachtet: Eine CD11b-Hochregulation als Marker einer Aktivierung der Neutrophilen, Priming der Neutrophilen für fMLP-induzierte Radikalproduktion sowie eine Verzögerung der Apoptose. Alle Effekte konnten sowohl mit IVIG als auch mit daraus präparierten F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten beobachtet werden.

Im zweiten Teil der Untersuchung wurden gegenläufige Effekte durch Behandlung mit hohen Dosen IVIG (15 mg/ml – 25 mg/ml) auf LPS-stimulierte Neutrophile beschrieben, was den therapeutischen Plasmaspiegeln in Patienten mit Hochdosis-IVIG-Therapie entspricht: Sowohl IVIG als auch F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente inhibierten die LPS-induzierte Hochregulation von CD11b. IVIG

inhibierten die fMLP-induzierte Radikalproduktion in LPS-geprimten Neutrophilen leicht, wohingegen der Effekt von äquimolaren Konzentrationen F(ab')<sub>2</sub> deutlich stärker ausfiel.

Es ist bekannt, dass LPS-Stimulation zu einer Apoptoseverzögerung in Neutrophilen führt. Ein inhibitorischer Effekt auf LPS-induzierte Apoptoseverminderung konnte durch hohe Dosen IVIG und äquimolare Konzentrationen von F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten erreicht werden.<sup>84</sup>

Von Gunten et al. beschrieben 2006 anti-SIGLEC-9-Antikörper in IVIG, welche für die zelltodinduzierende Wirkung von IVIG in Dosen ab 5-10 mg/ml bedeutsam sind. Sie zeigten einen besonders hohe Apoptoserate in GM-CSF-stimulierten Neutrophilen in Anwesenheit von IVIG.<sup>85</sup> Sie wiesen damit auf die hohe immunmodulatorische Potenz von IVIG in einem zytokinreichen Milieu hin, wie es bei Autoimmunerkrankungen vorliegt. Die Bedeutung von GM-CSF für die Etablierung eines solchen zytokinreichen Milieus ist in neuroinflammatorischen Modellen von Codarri et al. gezeigt worden.<sup>86</sup>

#### **3.6.4 IVIG-Effekte auf Endothelzellen**

Hochdosierte IVIG in Kombination mit hochdosierter Acetylsalicylsäure sind die Erstlinientherapie beim Kawasaki-Syndrom, einer akuten, fieberhaften Systemerkrankung, die durch eine nekrotisierende Vaskulitis der kleinen und mittleren Arterien gekennzeichnet ist. Die folgenden Studien untersuchten die Wirkungen von IVIG auf TNF- $\alpha$  stimulierte humane koronare Endothelzellen (HCAEC):

Ichiyama et al. fanden einen inhibierenden Effekt von IVIG auf die Aktivierung des proinflammatorischen NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionswegs in HCAEC. Dabei reduzierten IVIG die IL-6-Freisetzung und inhibierten die E-Selectin-Hochregulation, deren Expression durch NF- $\kappa$ B gesteigert wird.<sup>67</sup>

Matsuda et al. untersuchten 2012 in ähnlichen experimentellen Anordnungen die Effekte von IVIG auf HCAEC und konnten dabei die frühe Beeinflussung von Signaltransduktionswegen wie von Ichiyama et al. beschrieben, nicht reproduzieren.<sup>87</sup> Sie untersuchten jedoch ferner die TNF- $\alpha$  induzierte Zytokinfreisetzung von HCAEC und zeigten, dass IVIG die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine hemmen konnten.

Somit gibt es bereits Hinweise in der Literatur darauf, dass IVIG auch antiinflammatorisch auf Endothelzellen wirken.

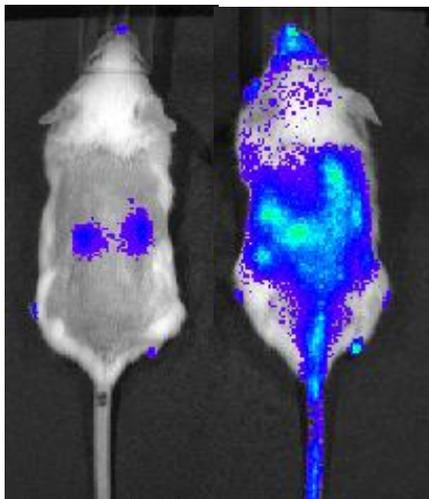
### **3.7 LPS-induziertes akutes Nierenversagen in der Maus**

Die Herleitung der Fragestellung dieser Arbeit ergab sich aus Experimenten und vorläufigen Daten meiner Betreuerin PD Dr. med. M. Choi.

Die Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit Mechanismen neutrophilenvermittelter Gewebeschädigungen, insbesondere der Glomerula der Niere, wie sie bei bestimmten Formen

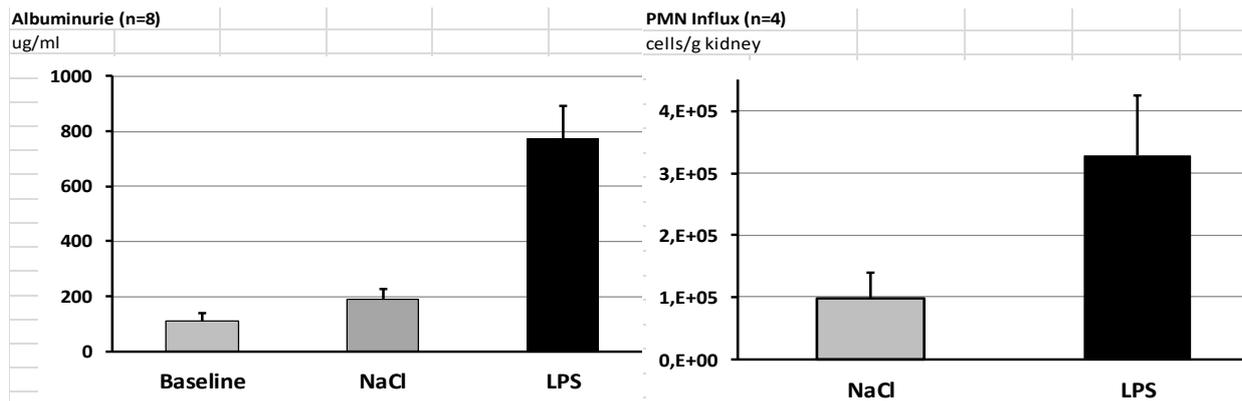
von Autoimmunerkrankungen und neutrophilen-spezifischen Entzündungsprozessen auftreten. Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B ist dabei einer der Forschungsschwerpunkte.<sup>88,89</sup>

In einem aktuellen Projekt wird die Wirkung von IVIG im Tiermodell einer LPS-induzierten Nephritis untersucht. Nach intraperitonealer Gabe von LPS aus *E. coli* konnte in Mäusen eine akute albuminurische Nierenschädigung induziert werden, in deren Rahmen es einerseits zu einer verstärkten NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den Nieren kam, welche durch Biolumineszenzmessung in NF- $\kappa$ B-Luciferase-Reporter-Mäusen quantifiziert wurde (*siehe Abbildung 3*) und andererseits ein verstärkter Neutrophileninflux in die Glomeruli auftrat, welcher mittels durchflusszytometrischer Analyse von Nierengewebe der Versuchstiere bestimmt wurde. (*siehe Abbildung 4*). Darüber hinaus zeigen präliminäre Daten einen Trend zur Reduktion der Albuminurie, des Neutrophileninflux in die Glomeruli und der renalen NF- $\kappa$ B-Anschaltung nach einer therapeutischen Gabe von IVIG.



i.p.	NaCl	LPS
i.v.	NaCl	NaCl

**Abbildung 3: LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Anschaltung in den Nieren.** Biolumineszenzmessung der NF- $\kappa$ B-Anschaltung in NF- $\kappa$ B-Luciferase-Reporter-Mäusen, denen intraperitoneal NaCl oder LPS injiziert wurde.



**Abbildung 4: LPS führt zur Induktion einer akuten albuminurischen Nierenschädigung mit Neutrophileninflux.** Quantifizierung von Albuminurie und Neutrophileninflux 18 h nach LPS-Gabe.

Diese Daten weisen darauf hin, dass die Behandlung mit IVIG vermutlich über Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in einem oder mehreren beteiligten Zelltypen oder über Reduktion des Neutrophileninflux zu einer Verminderung der Albuminurie führt.

Ergebnisse von van Meurs et al. deuteten darauf hin, dass Neutrophilendepletion die LPS-induzierte Albuminurie verhinderte, was die Beteiligung der Neutrophilen in der Pathogenese der akuten Nierenschädigung unterstreicht.<sup>90</sup>

### 3.8 Herleitung der Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen in vitro Mechanismen der Wirkweise von IVIG untersucht werden. Der NF- $\kappa$ B-Anschaltung sowohl in Immunzellen wie Neutrophilen als auch in Endothelzellen kommt in der Pathogenese der Organdysfunktion bei Sepsis eine entscheidende Bedeutung zu, weshalb die erste Fragestellung ist, welche Effekte IVIG auf die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Anschaltung in Neutrophilen und Endothelzellen haben, und welche Zellfunktionen durch die mögliche Interaktion beeinflusst werden.

Da Neutrophile in der Pathogenese der Modellerkrankung involviert sind und IVIG vor LPS-induziertem Neutrophileninflux und Albuminurie schützen, soll die Wirkung von IVIG auf einige der in 3.3 dargelegten Neutrophilenfunktionen wie Migration, Adhäsion, Sauerstoffradikalproduktion, Apoptose, sowie auf deren zugrundeliegende Signaltransduktionswege analysiert werden.

Da eine intakte endotheliale Barriere entscheidend für die Verhinderung einer Albuminurie ist, sollte anschließend noch untersucht werden, inwiefern LPS-Behandlung und IVIG-Therapie endotheliale Dysfunktion als zentrales Element der Pathogenese von Sepsis und Albuminurie beeinflussen. Somit ergeben sich drei zentrale Fragestellungen:

1. Beeinflussen IVIG die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Neutrophilen oder Endothelzellen und welche Konsequenzen für Zellfunktionen hat dies?
2. Beeinflussen IVIG Neutrophilenfunktionen, u.a. Sauerstoffradikalproduktion, Apoptose, und Migration?
3. Welche Effekte haben LPS und IVIG auf die endotheliale Dysfunktion?

## **4 Materialien und Methoden**

### **4.1 Geräte und Materialien**

Detaillierte Rezepte für die unten aufgeführten Puffer können den Tabellen im Anhang entnommen werden.

#### **4.1.1 Puffer, Medien, Experimentelle Agenzien und Pharmaka**

PBS-/- - #L1825 (Biochrom, Berlin, Deutschland)

HBSS+/- (Biochrom)

RPMI Medium 1640 (Biochrom)

Fetales Kälberserum / fetales bovines Serum = FCS/FBS (Biochrom)

Penicillin/Streptomycin = P/S - #A2213 (Biochrom)

Bovines Serumalbumin = BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

TNF- $\alpha$  (Sigma-Aldrich)

LPS aus Escherichia coli O26:B6 (Sigma-Aldrich)

0,9 % NaCl 10ml (B. Braun, Melsungen, Deutschland)

IVIG-Präparation: Gammagard S/D 10% (Baxter)

Humanalbumin: Albiomin 5% 50 g/l - #5748536 (Biotest, Dreieich, Deutschland)

Phorbolmyristataacetat = PMA (Sigma-Aldrich)

#### **4.1.2 Materialien für die Fragmentierung von IVIG in F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente**

Natriumacetat-Essigsäurepuffer pH 4,0 - 0,1M (siehe Anhang)

PD-10 Desalting Columns (GE Healthcare, Amsterdam, Niederlande)

Pepsin from porcine gastric mucosa (Sigma-Aldrich)

2 M Tris-Base (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland - siehe Anhang)

HiTrap-rProtein-A-FF (GE Healthcare)

Centriplus YM-50 (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)

#### **4.1.3 Materialien für die Aufreinigung der Neutrophilen**

Dextran 4% in ddH<sub>2</sub>O - #17-0320-01 (Amersham Biosciences – GE Healthcare)

Histopaque-1083 (Sigma-Aldrich)

ISOTON II diluent (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)

#### **4.1.4 Materialien für die Stimulierung humaner neutrophiler Granulozyten, Generierung von Zytoplasmaextrakten und Überständen**

Lysepuffer-PMN-I $\kappa$ B- $\alpha$  (siehe Anhang)

Lysepuffer-PMN-pERK/p38 (siehe Anhang)

NP40 10% - #28324 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)

#### **4.1.5 Materialien für die HUVEC-Zellkultur**

EGM-2 BulletKit - #CC-3156, #CC-4176 (Lonza, Basel, Schweiz)

Collagenase-IV - #C4-22 (Biochrom)

#### **4.1.6 Materialien für die Stimulierung von HUVECs und Generierung von Zellextrakten**

Endothelzell-Lysepuffer (siehe Anhang)

#### **4.1.7 Materialien für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blotting**

BioRad-Protein-Assay (BioRad, Hercules, CA, USA)

Trenngel 10%-SDS-Polyacrylamidgel (siehe Anhang)

Sammelgel 10%-SDS-Polyacrylamidgel (siehe Anhang)

6xLadepuffer (siehe Anhang)

6xLadepuffer + 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol (siehe Anhang)

Polyacrylamidgelelektrophorese-Laufpuffer (siehe Anhang)

Transferpuffer (siehe Anhang)

Methanol (Carl Roth)

PVDF-Membran (Merck Millipore)

Whatman Chromatography Paper (GE Healthcare)

Polyclonal-Rabbit-anti-I $\kappa$ B- $\alpha$ -Antibody - #9242 (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA)

ECL anti-Rabbit-IgG Horseradish Peroxidase Coupled (from Donkey) (GE Healthcare)

SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific)

#### **4.1.8 Materialien für Apoptosebestimmung im Annexin-V-Assay**

Annexin-V-Bindungspuffer (siehe Anhang)

FITC-Annexin-V (BD Biosciences)

APC-Annexin-V (BD Biosciences)

Propidiumiodid = PI (Sigma-Aldrich)

RPML mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (siehe Anhang)

#### **4.1.9 Materialien für Apoptosebestimmung von Neutrophilen mittels Sub-G0-Phasen-Quantifizierung durch Propidiumiodid-DNA-Färbung**

RPML mit 10%FCS (Biochrom)

DNase freie RNase A (Sigma-Aldrich)

PI-Apoptose-Lösung A (PBS -/- mit 0.5mM EDTA und 1% BSA)

PI-Apoptose-Lösung B (PBS -/- mit RNase 150 µg/ml)

PI-Apoptose-Lösung C (PBS -/- mit PI 50 µg/ml)

#### **4.1.10 Materialien für ROS-Produktion im DHR-Assay**

Dihydrorhodamin-123 = DHR (Sigma-Aldrich)

#### **4.1.11 Materialien für ROS-Produktion im Ferricytochrom-C-Assay**

Ferricytochrom C (Sigma-Aldrich)

Superoxiddismutase (Sigma-Aldrich)

#### **4.1.12 Materialien für Migration**

Transwell® Polycarbonate Membrane Permeable Supports mit 6,5 mm Membrandurchmesser und 3,0 µm Porendurchmesser (Corning)

Fibronectin aus bovinem Plasma - #F1141 (Sigma-Aldrich)

Triton-X-100 (Sigma-Aldrich)

Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin = fMLP (Sigma-Aldrich)

MPO-Substrat = 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid - #A3219 (Sigma-Aldrich)

#### **4.1.13 Geräte, Klinik- und Laborbedarf**

BD FACSCalibur (BD Biosciences)

Chemilumineszenzsystem Chemi-Smart 5000 (Peq-Lab, Erlangen, Deutschland)

Sicherheitswerkbank Laminair HB 2448 (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Mikroskop Nikon TMS-F (Nikon, Minato, Tokio, Japan)

PowerPac Basic (BioRad)

Fastblot B43 (Biometra, Göttingen, Deutschland)

Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad)

Thermomixer Compact (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Absorptionsfotometer SpectraMax 340 PC 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)

Zellzähler „Coulter-Counter“Z-Serie (Beckmann Coulter)

Zentrifuge Centrifuge 5810-R und 5430 (Eppendorf)

Zentrifuge Biofuge Fresco (Heraeus)

Spritzen und Kanülen (B. Braun)

Reagenz- und Zentrifugenröhrchen, Zellkulturplatten, Zellkulturflaschen, Mikrotiterplatten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

## **4.2 Methoden**

Die „Satzung der Charité zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis“ wurde bei der vorliegenden Untersuchung berücksichtigt.

### **4.2.1 Fragmentierung von IVIG in F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente und Pufferaustausch der IVIG**

Da Gammagard S/D 10% in einer Glukose- und Glycin-haltigen 1,8%igen NaCl-Lösung gelöst ist, wurde mittels PD-10-desalting-columns ein Pufferaustausch auf den für den Reaktionsablauf notwendigen Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH 4,0 – 0,1M) gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Anschließend wurde die Proteinkonzentration im Bradford-Assay bestimmt und in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH 4,0 - 0,1 M) gelöstes Pepsin (Konzentration 10 mg/ml) den IgG-Lösungen im Massenverhältnis 1:20 zugegeben. Im Anschluss wurden die Reaktionsansätze für 15 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit einer 2M Tris-Base-Lösung im Verhältnis 1:7 abgestoppt, wodurch der pH-Wert in den neutralen Bereich angehoben wurde und Pepsin irreversibel inaktiviert wurde.

Zur Eliminierung intakter Immunglobuline und nicht vollständig verdauter Fc-Fragmente wurde eine Affinitätschromatografie mittels Protein-A-Säule (HiTrap-rProtein-A-FF) gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Anschließend wurde zum Zwecke der Eliminierung von Spaltprodukten der Fc-Fragmente sowie von Pepsin eine Ultrafiltration mit einem MWCO von 50kDa durchgeführt.

Abschließend wurde die Proteinkonzentration des Produkts bestimmt und die aufgereinigten F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente mittels SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung analysiert.

IVIG wurde gemäß den Angaben des Herstellers zu einer 10 % Lösung (100 mg/ml) aus lyophilisiertem Pulver rekonstituiert und direkt vor der weiteren Verwendung mit ddH<sub>2</sub>O zu einer 5% Lösung verdünnt, so dass es in 0,9% NaCl-Lösung gelöst vorlag.

Alle Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **4.2.2 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten**

Humane neutrophile Granulozyten wurden aus heparinisiertem, peripher venösem Blut von gesunden, erwachsenen Probanden isoliert. Dies geschah entsprechend der Genehmigung durch die Ethikkommission der Charité und die Ethik-Kommission des Landes Berlin und mit dem informierten Einverständnis der Probanden. Hierzu wurde zunächst eine Erythrozytensedimentation in Anwesenheit von 1% Dextran für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt und der überstehende leukozytenreiche Blutanteil in ein neues Falcon bei 4°C überführt, wo er anschließend mit Histopaque-1083 unterschichtet und für 15 Minuten bei 290 g und für weitere 15 Minuten bei 222 g zentrifugiert wurde. Dieser und alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Dabei aggregieren die Erythrozyten durch die enthaltene Polysucrose und bilden gemeinsam mit den Neutrophilen, welche sich durch ihre höhere Dichte von den anderen Leukozyten unterscheiden, ein Zellpellet am Boden des Falcons, welches durch den Histopaque-Gradienten, dessen Dichte mit 1,083 kg/l über der der restlichen Leukozyten und Thrombozyten liegt, von diesen getrennt ist. Über dieser dünnen Schicht aus mononukleären (Monozyten und Lymphozyten) Zellen befinden sich das zellfreie Plasma und die Thrombozyten.

Nach dem Absaugen der oberen drei Schichten, wurden die im Pellet befindlichen Erythrozyten durch hypotone Lyse mit 10 ml ddH<sub>2</sub>O für 15 Sekunden lysiert und die Isotonie durch Zugabe von 3,33 ml 3,6%iger NaCl-Lösung wiederhergestellt. Anschließend wurde die Suspension 10 Minuten bei 222 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das verbleibende Zellpellet in HBSS+/+ aufgenommen, wobei die Zelldichte auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt wurde.

Diese wurde mittels elektronischer Zellzahlbestimmung der Zellen mit einer Größe von 7 µm bis 11 µm ermittelt.

#### **4.2.3 Stimulierung humaner neutrophiler Granulozyten, Generierung von Zytoplasmaextrakten und Überständen**

Humane Neutrophile ( $5 \times 10^6$  Zellen / ml) wurden für die angegebene Zeitdauer mit TNF-α (2 ng/ml) oder LPS (1 µg/ml) bei 37°C stimuliert. Wenn angegeben, wurden humane PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen / ml) mit IVIG (10 mg/ml) oder der äquimolaren Menge F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente (in PBS/- 7,33 mg/ml) für 30 Minuten bei 4°C vorinkubiert, bevor sie einer Stimulation unterzogen wurden.

Für die Generierung von Zytoplasmaextrakten wurden die Zellen nach der Stimulation zunächst gewaschen, indem sie nach Zugabe von 500 µl kaltem HBSS +/- bei 4°C für 5 Minuten bei 2.700 rpm zentrifugiert wurden, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 500µl kaltem HBSS +/- resuspendiert wurde. Anschließend wurden die Zellen für 1 Minute bei 13.000 rpm pelletiert, und

nach Absaugen des Überstandes bei 4°C in 40 µl Lysepuffer für IκB-α (IκB-α-Western Blots) bzw. 20 µl Lysepuffer für phospho-p38 und phospho-ERK (pp38 und pERK-Western-Blots) resuspendiert und für 10 Minuten inkubiert. Für die IκB-α-Western-Blots wurden die Proben nach Zugabe von 1% NP40 10 Sekunden lang gevortext. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Die so gewonnen Überstände entsprechen Zytoplasmaextrakten und wurden in gesonderte Eppendorfgefäße überführt und wie unter 2.2.6 beschrieben weiterverwendet.

Für die Generierung von zellfreien Überständen, wurden die Proben wie oben beschrieben behandelt und für die jeweils angegebene Zeitdauer bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Proben zur Entfernung von Zellen und Zelldebris für 5 Minuten bei 8.000 rpm zentrifugiert, der generierte zellfreie Überstand entnommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **4.2.4 Präparation und Kultivierung von humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVECs)**

Als Endothelzellmodell dienten humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVECs). Es wurden lediglich Nabelschnüre verwendet, die maximal 24 Stunden alt waren und von der Entnahme bis zur Präparation in 4°C kaltem, sterilen PBS mit 1% Penicillin/Streptomycin gelagert wurden. Falls die Nabelschnur Defekte oder Abklemmungen aufwies, wurde sie unter Aussparung dieser in mehrere Abschnitte zerteilt und die einzelnen Teile wie im Folgenden beschrieben präpariert.

Es wurde eine Knopfkanüle in der Vene platziert und mittels Arterienklemme abgedichtet. Die Vene wurde mit 100 ml 37°C warmer 0,9% NaCl-Lösung gespült und anschließend zur restlosen Entleerung durchlüftet. Danach wurde das nicht kanülierte Ende der Nabelschnur ebenfalls mit einer Arterienklemme verschlossen und die Vene vollständig mit 0,2% Collagenase IV befüllt, die Knopfkanüle verschlossen und die Nabelschnur 25 Minuten in 37°C warmem PBS inkubiert. Im Anschluss daran wurde durch Massieren der Nabelschnur und Umherschwenken die enzymatische Ablösung der Zellen mechanisch unterstützt. Nach Öffnung der Knopfkanüle wurde die Zellsuspension in einem sterilen Röhrchen aufgefangen und die Nabelschnurvene zwei weitere Male mit PBS gespült, wobei die anfallende Zellsuspension stets aufgefangen wurde. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 400 g wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 15 ml HUVEC-Medium, welches aus dem EGM-2 Bullet-Kit entsprechend der Herstelleranleitung hergestellt wurde, resuspendiert und die Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS-/- gewaschen und anschließend in frischem Medium weiterkultiviert. Dies

wurde nach weiteren 24 Stunden wiederholt und die Zellen anschließend für zwei bis drei Tage bis zum Erreichen von 90-100% Konfluenz kultiviert.

Für die Passage wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und nach zweimaligem Waschen mit 37°C warmem PBS/- wurden die Zellen für 5 Minuten bei 37°C mit 5 ml Trypsin/EDTA inkubiert und somit enzymatisch abgelöst. Dies wurde mikroskopisch bestätigt und die Reaktion mit Zellkulturmedium mit 5% FCS abgestoppt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension für 10 Minuten bei 400g wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät. Für Experimente mit HUVECs wurde die Zellsuspension in 48-well-Platten ausgesät. Hierbei wurden Zellen der zweiten bis einschließlich der vierten Passage verwendet.

#### **4.2.5 Stimulierung von humanen umbilikalvenösen Endothelzellen und Generierung von Gesamtzelllysaten**

Konfluente humane umbilikalvenöse Endothelzellen in einer 48-well-Platte wurden nach Absaugen des Mediums mit 300 µl der angegebenen Testlösung für die angegebene Zeitdauer bei 37°C inkubiert. Falls angegeben, wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit 200 µl IVIG in angegebener Konzentration oder der äquimolaren Menge F(ab')<sub>2</sub> vorinkubiert und anschließend der Stimulation unterzogen.

Zur Generierung von Gesamtzelllysaten wurden die Zellen in der Platte nach zweimaligem Waschen mit raumtemperiertem PBS/- auf Eis gestellt und mit 30 µl des Endothelzell-Lysepuffers lysiert und anschließend für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Überführen der Lysate in Eppendorfgefäße wurden die Proben für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und die Überstände als Gesamtzelllysate für die weitere Analyse asserviert und wie unter 2.2.6 beschrieben weiterverwendet.

#### **4.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blotting**

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration im BioRad-Protein-Assay mit einem BSA-Standard gemäß der Anleitung des Herstellers wurden die gleiche Menge Protein pro Probenansatz für 5 Minuten bei 95°C in Ladepuffer (250 mM Tris-HCl, pH 6.8 mit 4% SDS, 20% Glycerol, 0.01% Bromphenolblau, 10% β-Mercaptoethanol) inkubiert. Anschließend wurden 5 bis 20 µg Protein pro Lane auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% fettfreier Trockenmilch in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur geblockt und nach 3 Waschschrinen mit TBS-T über Nacht mit dem angegebenen Primärantikörper bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen für 1 h mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert und die Membran anschließend in einem Chemilumineszenz Substrat (ECL; Pierce)

inkubiert und in einem Chemilumineszenzdetektor belichtet. Die optische Dichte der Banden wurde densitrometrisch mittels ImageJ ausgewertet.

#### **4.2.7 Apoptosebestimmung von Neutrophilen mit Annexin-V-Färbung**

Neutrophile Granulozyten in HBSS wurden 6 min bei 2.700 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet entweder in RPMI/10%FCS oder in RPMI-Medium, welches zusätzlich 10 mg/ml IVIG, 10 mg/ml Humanalbumin oder 7,33 mg/ml F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente enthielt, resuspendiert. 1x10<sup>7</sup> Zellen/ml wurden so 30 Minuten bei 4°C vorinkubiert und anschließend mit 100 ng/ml LPS für 20 h bei 37°C kultiviert.

Die Neutrophilen wurden 7 min bei 230 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 200 µl Annexin-V-Bindungspuffer mit 2 µl FITC-Annexin-V resuspendiert.

Nach 15 minütiger lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur wurden weitere 200 µl Annexin Bindungspuffer hinzugegeben, die Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt und der Anteil von Annexin-V-positiven Zellen durchflusszytometrisch im FL-1-Kanal bestimmt und als Apoptoserate angegeben.

#### **4.2.8 Apoptosebestimmung von Neutrophilen mittels Sub-G0-Phasen-Quantifizierung durch Propidiumiodid-DNA-Färbung**

Neutrophile Granulozyten in HBSS wurden 6 min bei 2.700 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet entweder in RPMI/10%FCS oder in RPMI-Medium, welches zusätzlich 10 mg/ml IVIG, 10 mg/ml Humanalbumin oder 7,33 mg/ml F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente enthielt, resuspendiert. 5x10<sup>6</sup> Zellen/ml wurden so 30 Minuten bei 4°C vorinkubiert und anschließend mit 100 ng/ml LPS für 20 h bei 37°C kultiviert. Nach Abschluss der Kultivierung wurden die Proben nur noch bei 4°C behandelt.

Die Neutrophilen wurden 7 min bei 230 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 150 µl PBS/- mit 0.5mM EDTA resuspendiert und anschließend 450 µl Ethanol (-20°C) zugegeben. Die Zellsuspension wurde über 24 h bei -20°C gelagert.

Anschließend wurden die Proben 7 min bei 230 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 200 µl PI-Apoptose-Lösung A, 200 µl PI-Apoptose-Lösung B und 400 µl PI-Apoptose-Lösung C resuspendiert und anschließend für 2 Sekunden gevortext. Nach 5-stündiger Inkubation bei 4°C wurde durchflusszytometrisch die Fluoreszenzintensität der PI-Färbung im FL-2-Kanal gemessen. Dabei wurde die Zellpopulation, welche durch die DNA-Fragmentierung im Rahmen der Apoptose einen Chromosomensatz aufwies, der kleiner als der diploide Chromosomensatz der vitalen G0-Neutrophilen ist, als Anteil der apoptotischen Neutrophilen bestimmt.

#### **4.2.9 Intrazelluläre ROS-Produktion im DHR-Assay**

Neutrophile in HBSS mit einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml wurden für 5 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmt und anschließend für weitere 10 Minuten mit  $1 \mu\text{M}$  DHR bei  $37^\circ\text{C}$  behandelt. Anschließend wurden jeweils  $6 \times 10^6$  Neutrophile/ml in einem Probenvolumen von  $100 \mu\text{l}$  gemeinsam mit IVIG (in PBS/-/  $10 \text{ mg/ml}$ ),  $\text{F}(\text{ab}'_2)$  (in PBS/-/  $7,33 \text{ mg/ml}$ ) oder PMA als Positivkontrolle ( $25 \text{ ng/ml}$ ) für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  in  $1,5\text{ml}$ -Eppendorf-Gefäßen inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt und nach Aufnahme in  $400 \mu\text{l}$   $4^\circ\text{C}$  kaltem Cell Wash in FACS-Röhrchen überführt, und die durchflusszytometrisch bestimmte MFI und als intrazelluläre ROS-Produktion angegeben.

#### **4.2.10 ROS-Produktion im Ferricytochrom-C-Assay**

Nach der Aufreinigung der PMNs wurden je  $7,5 \times 10^5$  Zellen in einem Probenvolumen von  $200 \mu\text{l}$  (entsprechend einer Konzentration von  $3,75 \times 10^6$  Zellen/ml) mit HBSS als Negativkontrolle, IVIG (in PBS -/-  $10 \text{ mg/ml}$ ), der äquimolaren Menge  $\text{F}(\text{ab}'_2)$  (in PBS -/-  $7,33 \text{ mg/ml}$ ) bzw.  $25 \text{ ng/ml}$  PMA als Positivkontrolle in einer 96-Well-Zellkulturtestplatte bei  $37^\circ\text{C}$  im Photometer inkubiert, wobei als Reaktionsedukt Ferricytochrom C in einer Konzentration von  $50 \mu\text{mol/l}$  zugegeben wurde. Zu jedem Versuchsansatz wurde parallel eine zweite Negativkontrolle durchgeführt, welche Superoxiddismutase ( $300 \text{ U/ml}$ ) enthielt, wodurch die freigesetzten Superoxidanionen zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgesetzt wurden und somit keine Reduktion des Ferricytochroms bewirken konnten. Dadurch konnte spezifisch die Freisetzung von Superoxid-Anionen quantifiziert werden. Die Reduktion von Ferricytochrom C durch extrazellulär freigesetzte Superoxid-Anionen führt zu einer Extinktionsverschiebung bei einer Wellenlänge von  $550 \text{ nm}$ , welche alle 5 Minuten für eine Gesamtdauer von  $1 \text{ h}$  bestimmt wurde, wodurch zusätzlich zu den hier dargestellten Gesamtwerten der Radikalproduktion noch eine Kinetik beobachtbar war. Die angegebenen Werte sind willkürliche Einheiten und stellen die relative extrazelluläre ROS-Produktion nach  $60$  Minuten Inkubation dar.

#### **4.2.11 FACS-Analyse der Bindung von IVIG und $\text{F}(\text{ab}'_2)$ -Fragmenten an Neutrophile und HUVECs**

$200 \mu\text{l}$  Neutrophile in HBSS mit einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml bzw.  $200 \mu\text{l}$  HUVECs in HUVEC-Medium mit einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml wurden mit jeweils  $1 \text{ mg/ml}$  IVIG,  $\text{F}(\text{ab}'_2)$  bzw. Humanalbumin für 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit  $5 \mu\text{l}$  FITC-anti-human-IgG- $\text{F}(\text{ab}'_2)$ -Fragmenten aus der Ziege in  $100 \mu\text{l}$  HBSS für weitere 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden  $500 \mu\text{l}$  Cell Wash hinzugegeben, die Zellen  $6$  Minuten bei  $2.700 \text{ rpm}$  zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Zellen zur Messung in  $400 \mu\text{l}$  Cell Wash aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

Die Bindungsstärke wurde als MFI angegeben.

#### **4.2.12 Migration**

Neutrophile wurden nach der Aufreinigung 6 Minuten bei 2.700 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in HBSS, IVIG (10 mg/ml in HBSS), der äquimolaren Menge F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente (7,33 mg/ml in HBSS) oder Humanalbumin (10 mg/ml in HBSS) resuspendiert und für 1 h bei 4°C vorinkubiert.

Transwells mit einem Porendurchmesser von 3.0 µm wurden mit 100 µl Fibronectin (20 µg/ml in HBSS +/-) für 1h beschichtet, zwei Mal mit 150 µl HBSS gewaschen und anschließend wurden jeweils 150 µl Neutrophile mit einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in jedes Transwell pipettiert.

Die Transwells wurden in eine 24-well-Platte umgesetzt, deren Wells jeweils 600 µl HBSS bzw.  $5 \times 10^{-9}$  mol/l fMLP in HBSS als Migrationsstimulus enthielten. Nach jeder Stunde wurden die Transwells in ein neues, mit den gleichen Bedingungen gefülltes Well der 24-Well-Platte umgesetzt und die Gesamtmigrationsdauer betrug drei Stunden. Anschließend wurden die Transwells verworfen und die in das Well migrierten Neutrophilen mit 0,5 % Triton-X 100 für 15 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde die MPO-Aktivität für jedes Well photometrisch ermittelt und mit einem Standard aus mit 0,5% Triton-X 100 lysierten Neutrophilen derselben Aufreinigung verglichen. Hierfür wurden jeweils 100 µl Zelllysat und 100 µl MPO-Substrat für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend die Extinktion bei 405nm bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Anzahl der migrierten Neutrophilen angegeben.

#### **4.2.13 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit Graph Pad Prism durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung (SD) des Mittelwerts angegeben. Statistische Untersuchungen auf Signifikanz erfolgten mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one-way ANOVA) oder mittels Varianzanalyse mit Messwiederholungen (repeated measures ANOVA). Die post-hoc-Mehrfachvergleiche erfolgten nach Bonferroni, das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ .

## 5 Ergebnisse

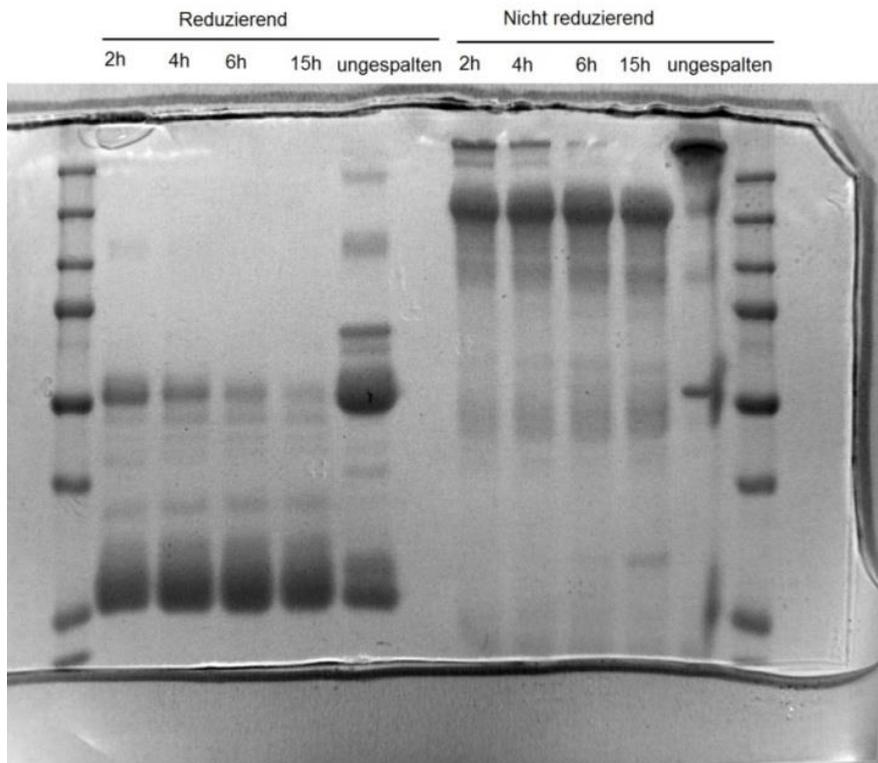
### 5.1 Spaltung von IVIG in F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente und deren Aufreinigung

Zur Untersuchung der Abhängigkeit potentieller IVIG-Effekte von der Fc-Domäne bzw. den Fab-Domänen, etablierten wir zunächst die Spaltung von IVIG in F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente mittels Pepsin.

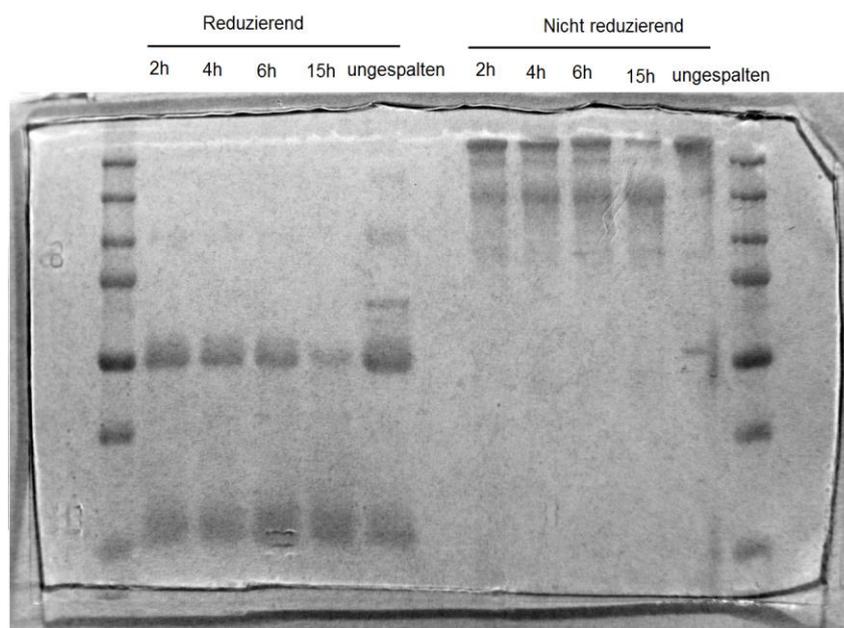
Für einen Kompromiss aus kurzer Spaltungsdauer, hoher Ausbeute und möglichst unbeschädigten Paratopen testeten wir pH-Werte von 4,0 und 4,5 sowie Inkubationszeiten zwischen einer Stunde und 15 Stunden.

Die ungespaltenen Immunglobuline sowie die Spaltprodukte wurden unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei kommt es unter reduzierenden Bedingungen zusätzlich zu einer Spaltung der Disulfidbrücken, wodurch insgesamt kleinere Fragmente entstehen. Entscheidend für die Beurteilung der Spaltungsqualität ist daher die nicht-reduzierende SDS-PAGE. Es zeigte sich eine zunehmende Spaltung der Immunglobuline nach 2, 4 und 6 Stunden, wobei allerdings zu jedem dieser Zeitpunkte noch intakte, ungespaltene Immunglobuline vorhanden waren. Eine vollständige Spaltung fand nach 15 Stunden bei einem pH von 4,0 (*siehe Abbildung 5*), jedoch nicht bei einem pH von 4,5 (*siehe Abbildung 6*) statt.

Für eine hohe Ausbeute wählten wir daher einen pH-Wert von 4,0 und eine Inkubationszeit von 15 h für nachfolgende Fragmentierungen.

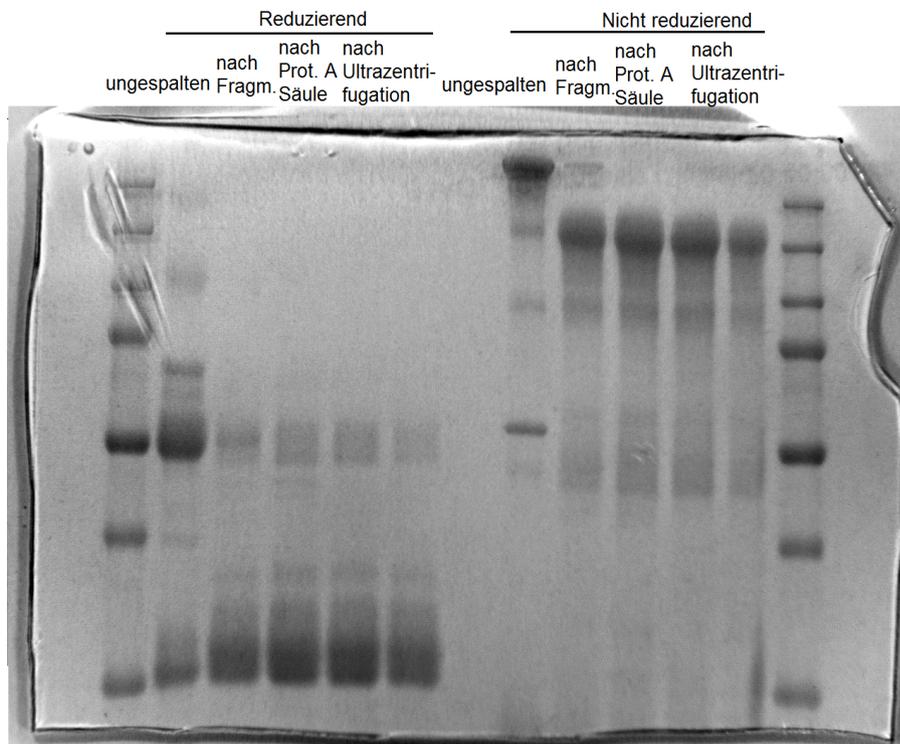


**Abbildung 5: Vollständige Spaltung der Immunglobuline nach 15 h Inkubation mit Pepsin bei pH 4,0.** SDS-PAGE gefärbt mit Imperial Stain - Fragmentierung bei pH 4,0 mit verschiedenen Inkubationszeiten.



**Abbildung 6: Unvollständige Spaltung der Immunglobuline nach 15 h Inkubation mit Pepsin bei pH 4,5.** SDS-PAGE gefärbt mit Imperial Stain - Fragmentierung bei pH 4,5 mit verschiedenen Inkubationszeiten.

Nach der Eliminierung von eventuell vorhandenen intakten Immunglobulinen, kleinen Spaltprodukten mit einem Molekulargewicht <50 kDa und Pepsin durch Protein-A-Affinitätschromatografie und anschließender Ultrafiltration, konnten in der SDS-PAGE keine intakten Immunglobuline mehr nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7).

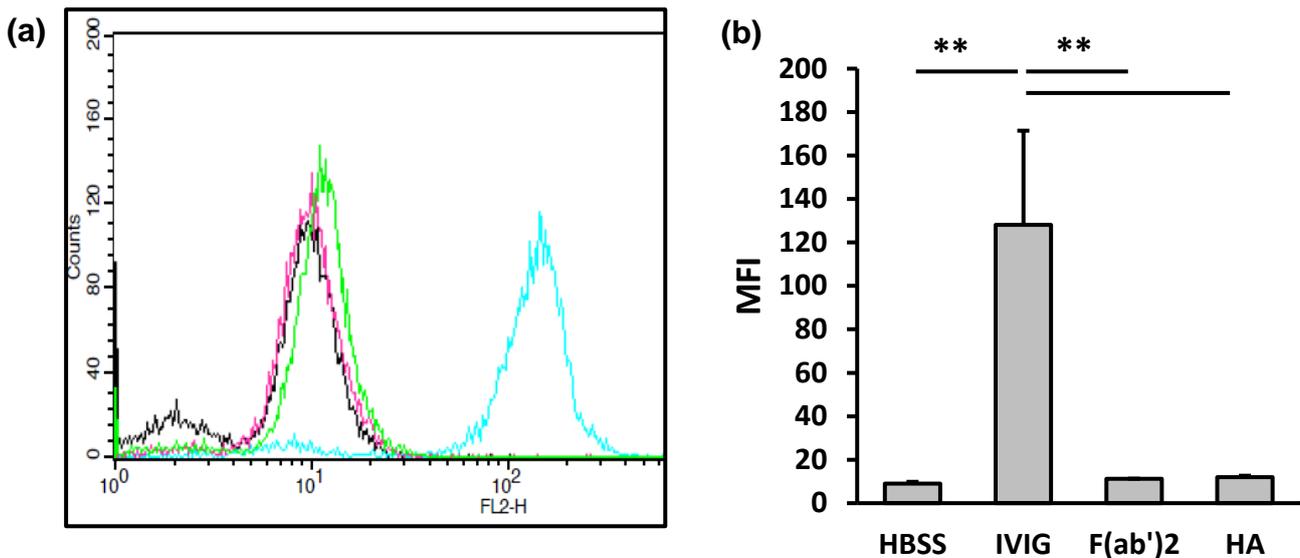


**Abbildung 7:** Aufreinigung der  $F(ab')_2$ -Fragmente durch Affinitätschromatografie an einer Protein-A-Säule und Ultrafiltration mit einem MWCO von 50 kDa. SDS-PAGE gefärbt mit Imperial Stain.

## 5.2 Bindungsfähigkeit von IVIG und $F(ab')_2$ -Fragmenten an Neutrophile und Endothelzellen

Anschließend untersuchten wir durchflusszytometrisch die Bindungsfähigkeit von IVIG, den erzeugten  $F(ab')_2$ -Fragmenten und Humanalbumin an primäre humane Neutrophile, welche Fcγ-R-tragende Zellen darstellen. Dabei zeigten intakte IVIG, nicht aber  $F(ab')_2$ -Fragmente oder Humanalbumin eine signifikant erhöhte Bindung an Neutrophile im Vergleich zur HBSS-Kontrolle (MFI: 128 +/- 43,4 für IVIG vs. 11,2 +/- 0,05 für  $F(ab')_2$  vs. 11,97 +/- 0,65 für Humanalbumin vs. 9,0 +/- 0,83 für die HBSS-Kontrolle – siehe Abbildung 8).

### Bindung von IVIG an Neutrophile

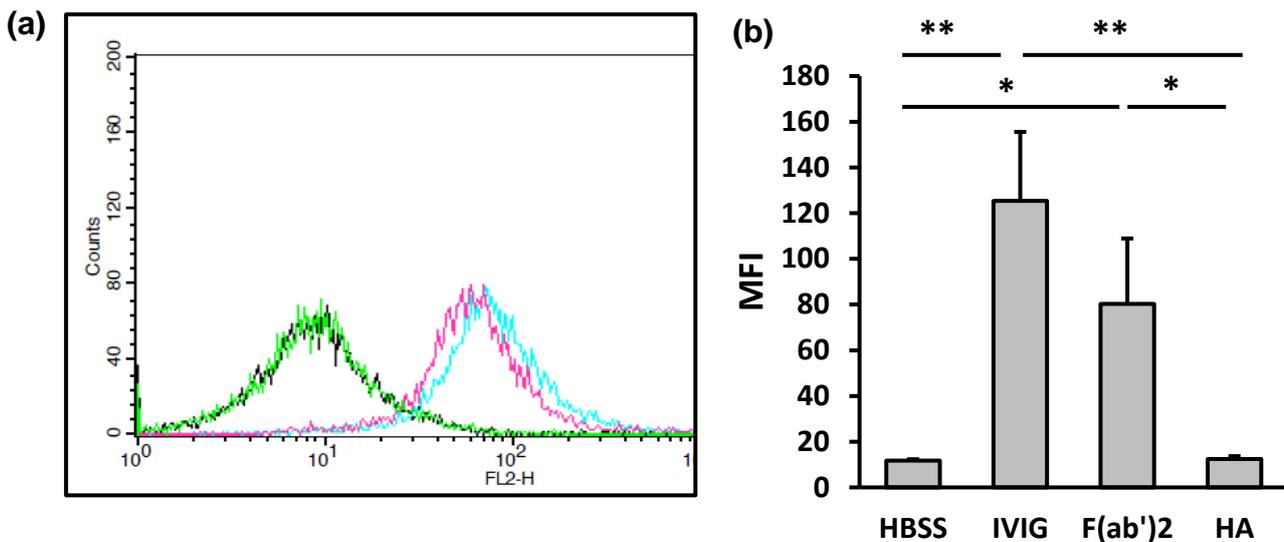


**Abbildung 8: IVIG, aber nicht  $F(ab')_2$  oder Humanalbumin binden an Neutrophile.** Durchflusszytometrische Analyse der Bindungsfähigkeit von IVIG,  $F(ab')_2$  und Humanalbumin (HA) an Neutrophile; (a) Repräsentative Messung (schwarz: Kontrolle - grün: HA - pink:  $F(ab')_2$  - cyan: IVIG) und (b) Quantifizierung der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten von 3 unabhängigen Experimenten. \*\*  $p < 0,01$

Wir untersuchten als nächstes die Bindungsfähigkeit von IVIG, den erzeugten  $F(ab')_2$ -Fragmenten und Humanalbumin an HUVECs, einer primären Endothelzelllinie. Dabei zeigten intakte IVIG und  $F(ab')_2$ -Fragmente, aber nicht Humanalbumin eine signifikant erhöhte Bindung an HUVECs im Vergleich zur HBSS-Kontrolle (MFI:  $125,4 \pm 30,2$  IVIG vs.  $80,3 \pm 28,6$   $F(ab')_2$  vs.  $12,4 \pm 1,25$  Humanalbumin vs.  $11,4 \pm 0,59$  HBSS-Kontrolle – siehe Abbildung 9).

Der Unterschied in der Bindung zwischen Endothelzellen und PMN wäre möglicherweise dadurch erklärt, dass IVIG und  $F(ab')_2$ -Fragmente über die Fab-Domäne der Immunglobuline an Endothelzellen binden, während lediglich ungespaltene IVIG über den Fc $\gamma$ -Rezeptor an neutrophile Granulozyten binden können.

## Bindung von IVIG an HUVECs



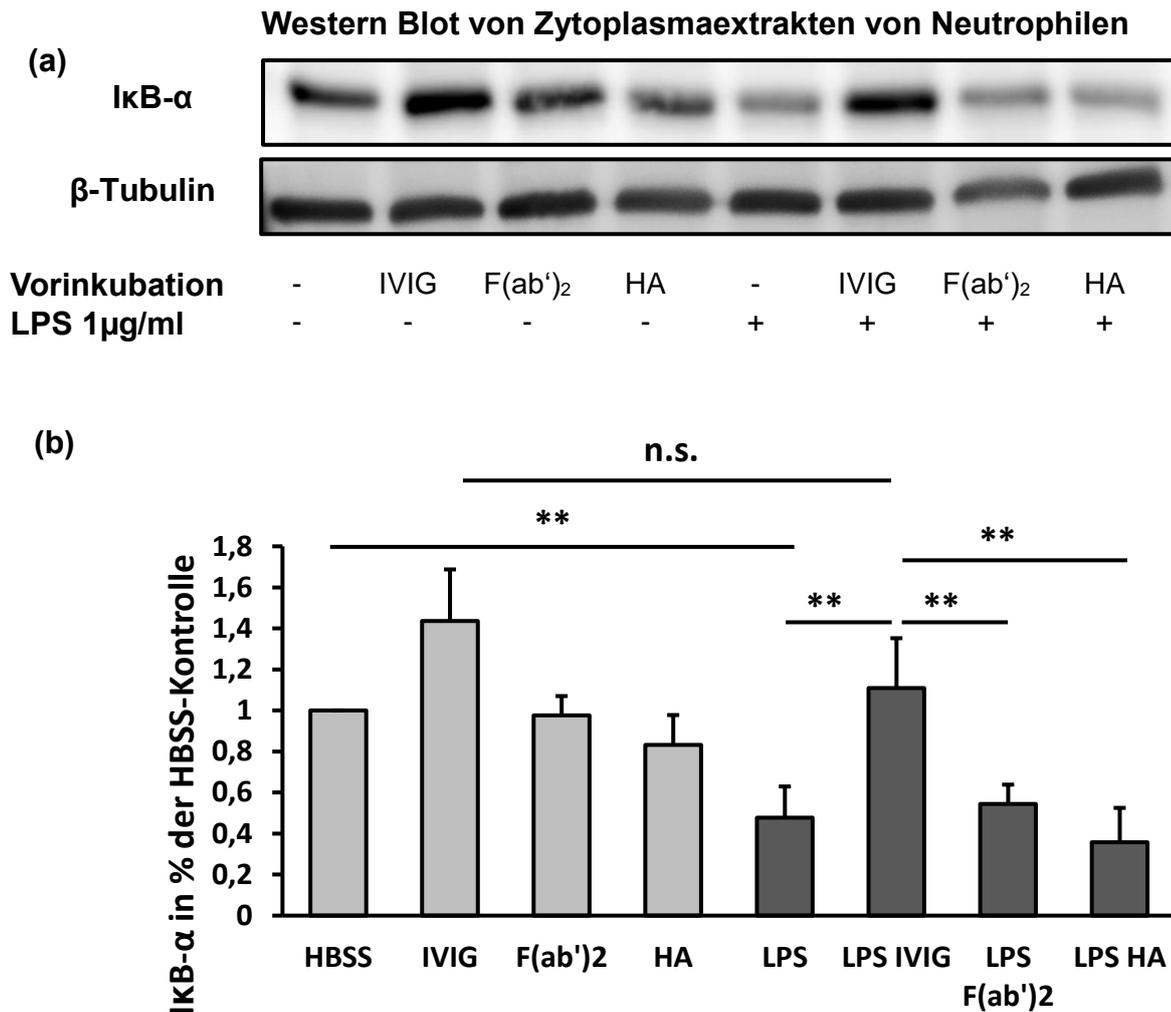
**Abbildung 9: IVIG und F(ab')<sub>2</sub> binden an humane Endothelzellen.** Durchflusszytometrische Analyse der Bindungsfähigkeit von IVIG, F(ab')<sub>2</sub> und HA an HUVECs; (a) Repräsentative Messung (schwarz: Kontrolle - grün: Humanalbumin - pink: F(ab')<sub>2</sub> – cyan: IVIG) und (b) Quantifizierung der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten von 3 unabhängigen Experimenten. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01

### 5.3 IVIG, aber nicht F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente oder Humanalbumin hemmen die LPS-induzierte NF-κB-Induktion in humanen Neutrophilen

NF-κB liegt in ruhenden Neutrophilen im Zytoplasma an seinen Inhibitor IκB gebunden vor, wobei von den verschiedenen NF-κB-Inhibitoren IκB-α die größte Bedeutung zukommt. Durch Stimulation mit LPS, TNF-α oder anderen proinflammatorischen Zytokinen kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung von IκB-Kinasen, welche IκB-α phosphorylieren, und die Dissoziation des IκB-α-NF-κB-Komplexes bewirken. Während NF-κB nun in den Kern translozieren kann, wird phosphoryliertes IκB-α ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut. Folglich korreliert die IκB-α-Degradation mit der NF-κB-Aktivierung und die IκB-α-Konzentration im Zytoplasma korreliert invers mit der NF-κB-Aktivierung.

Wir untersuchten die Wirkung von IVIG, F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten und Humanalbumin auf die NF-κB-Anschaltung von LPS-stimulierten Neutrophilen mittels IκB-α Degradation im Western Blot, wobei die densitometrisch ausgewerteten optischen Dichten der einzelnen Banden jeweils als Verhältnis zur HBSS-Kontrolle (1,0 entsprechend) angegeben wurden. LPS führte nach 1h zu einer signifikanten Degradation von IκB-α im Vergleich zur HBSS-Kontrolle (relative optische Dichte: 0,48 +/- 0,15 LPS vs. 1,0 +/- 0 HBSS-Kontrolle – siehe Abbildung 10). Die Vorbehandlung

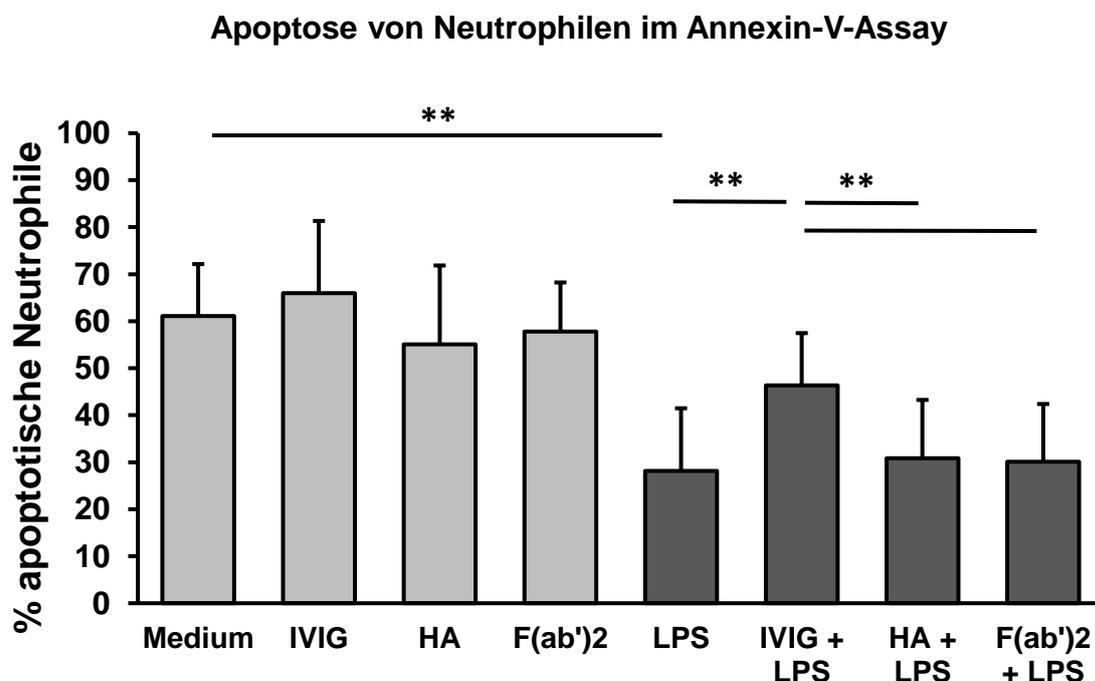
mit IVIG vor der LPS-Gabe führte zu einer signifikanten Hemmung der IκB-α-Degradation nach 1h im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit LPS (*relative optische Dichte: 1,11 +/- 0,24 IVIG/LPS vs. 0,48 +/- 0,15 LPS allein*), *wohingegen die Vorbehandlung mit F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten oder Humanalbumin dagegen keine signifikanten Effekte zeigte (relative optische Dichte: 0,55 +/- 0,09 F(ab')<sub>2</sub>/LPS und 0,36 +/- 0,17 Humanalbumin/LPS vs. 0,48 +/- 0,15 LPS allein)*. IVIG verhindert somit die LPS-induzierte NF-κB-Aktivierung in humanen Neutrophilen



**Abbildung 10: IVIG hemmen die LPS-induzierte Aktivierung von NF-κB.** Western Blot für IκB-α mit β-Tubulin als Ladekontrolle von PMN Zytoplasmaextrakten, welche zunächst 30 Minuten mit HBSS, IVIG, F(ab')<sub>2</sub> oder HA vorinkubiert wurden und anschließend für 60 Minuten unbehandelt blieben oder mit 1µg/ml LPS bei 37°C inkubiert wurden. (a) repräsentativer Western-Blot und (b) densitometrische Auswertung von 5 unabhängigen Experimenten. n.s.= nicht signifikant, \*\* p<0,01

#### 5.4 IVIG, aber nicht F(ab')<sub>2</sub> oder Humanalbumin hemmen die LPS-induzierte Apoptoseverzögerung in humanen Neutrophilen

Es ist bekannt, dass die Apoptose neutrophiler Granulozyten durch die LPS-induzierte NF-κB-Aktivierung verzögert wird. Daher untersuchten wir, ob die Hemmung von NF-κB durch IVIG diesen Effekt verhindern kann, denn dies würde den Eliminationsprozess aktivierter Neutrophiler beschleunigen und in der Folge eine Verminderung der Gewebeschädigung bedeuten. Im Rahmen der Apoptose kommt es zu morphologischen Veränderungen der Neutrophilen, u.a. werden normalerweise intrazelluläre Phosphatidylserine, welche spezielle Phospholipide darstellen, auf der Oberfläche präsentiert. Zur Detektion apoptotischer neutrophiler Granulozyten untersuchten wir durchflusszytometrisch die Bindung von FITC-Annexin-V, welches an Phosphatidylserine bindet, an Neutrophile, die für 20 h kultiviert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Stimulation mit 100 ng/ml LPS zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate der Neutrophilen führte (*Apoptoserate: 28,2 +/- 13 % LPS/Medium vs. 61,1 +/- 11 % Medium-Kontrolle - siehe Abbildung 11*). Durch die zeitgleiche Inkubation mit 10 mg/ml IVIG wurde die LPS-induzierte Verzögerung der Apoptoserate signifikant gehemmt (*Apoptoserate 46,4 +/- 11 % IVIG/LPS vs. 28,2 +/- 13 % LPS allein*). Dieser Effekt konnte mit äquimolaren Mengen von F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten oder mit 10 mg/ml Humanalbumin als Eiweißkontrolle nicht erreicht werden (*Apoptoserate 30,1 +/- 12 % F(ab')<sub>2</sub>/LPS und 30,9 +/- 12 % Humanalbumin/LPS vs. 28,2 +/- 13 % LPS allein*).



**Abbildung 11: IVIG hemmen die LPS-induzierte Verzögerung der Neutrophilenapoptose.** Durchflusszytometrische Messung der Annexin-V-Bindung an Neutrophile, welche zunächst 30

*Minuten mit 10 mg/ml IVIG, der äquimolaren Menge F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente oder 10 mg/ml Humanalbumin vorinkubiert wurden und anschließend 20 h mit oder ohne 100 ng/ml LPS kultiviert wurden. Dargestellt ist der Anteil Annexin-V-positiver Zellen als Apoptoserate aus 4 unabhängigen Experimenten. \*\* p<0,01*

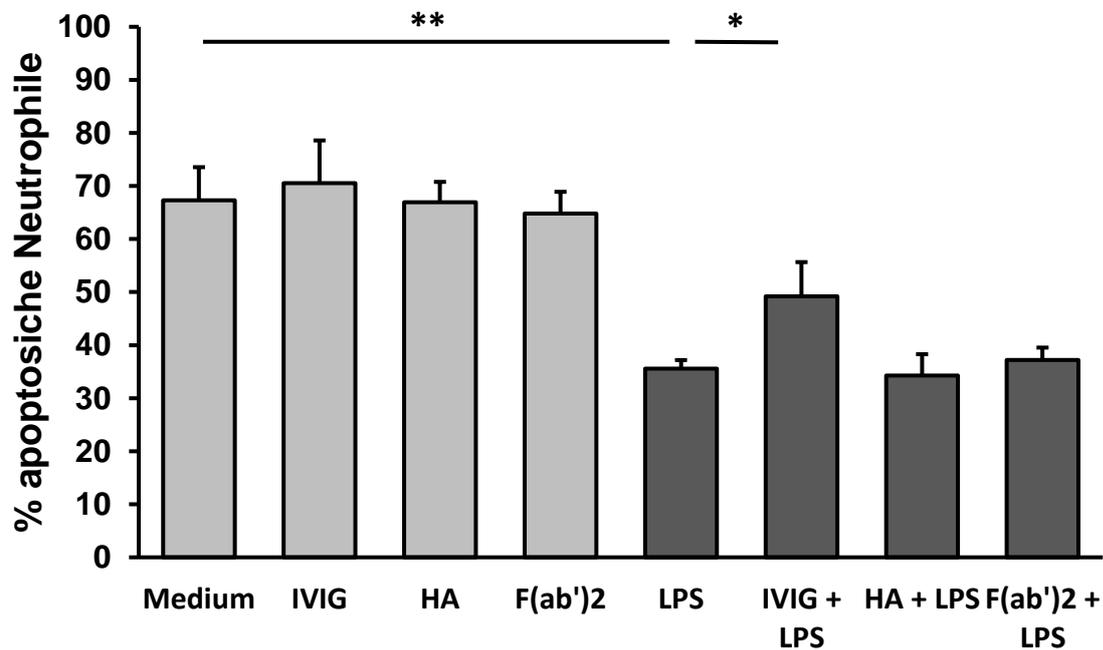
Zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem Annexin-V-Assay untersuchten wir anhand einer Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid den Anteil apoptotischer Zellen. Propidiumiodid ist ein DNA-Interkalator und Fluoreszenzfarbstoff und bindet stöchiometrisch an doppelsträngige DNA. Aus der durchflusszytometrischen Messung der Fluoreszenzintensität nach Propidiumiodidbindung kann der Ploidiegrad von Zellen bestimmt werden und somit auf die Zellzyklusphase geschlossen werden. So ist der Chromosomensatz in der G1 und G0 Phase diploid, in der G2 Phase nach Abschluss der DNA-Replikation „tetraploid“ (genauer diploid mit Zwei-Chromatid-Chromosomen) und während der Replikation in der S-Phase liegt der Ploidiegrad dazwischen.

Da Neutrophile in der G0-Phase arretierte, ausdifferenzierte Zellen sind, findet die beschriebene Analyse des Zellzyklus durch PI-Färbung hier keine Anwendung. Jedoch kommt es in der späten Apoptose durch die Aktivierung der Effektorcaspase 3 zur DNA-Fragmentierung, wodurch ein Teil der Zellen nach PI-Färbung einen Chromosomensatz aufweisen, der kleiner als der diploide Chromosomensatz der G0-Phase ist. Diese Zellen stellen sich bei der Messung der Fluoreszenzintensität als Sub-G0-Population dar und können von den anderen Zellen als apoptotisch abgegrenzt werden. Der Anteil der Sub-G0-Zellen nach Propidiumiodidfärbung entspricht somit dem Anteil apoptotischer Zellen.

Bestätigend konnten wir auch im Propidiumiodid-Assay zeigen, dass die Kultivierung von neutrophilen Granulozyten mit 100 ng/ml LPS zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate führte (*Apoptoserate: 35,6 +/- 2 % LPS/Medium vs. 67,3 +/- 6 % Medium-Kontrolle – siehe Abbildung 12*). Ebenso wie im Annexin-V-Assay zeigte sich, dass die Behandlung mit 10 mg/ml IVIG zu einer signifikanten Reduktion des apoptoseverzögernden Effekts von LPS führte (*Apoptoserate: 49,2 +/- 6 % IVIG/LPS vs. 35,6 +/- 2 % LPS allein*), während eine Behandlung der LPS-stimulierten Neutrophilen mit F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten oder Humanalbumin als Eiweißkontrolle keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate zeigte (*Apoptoserate 37,2 +/- 2 % F(ab')<sub>2</sub> und 34,3 +/- 4 % Humanalbumin/LPS vs. 35,6 +/- 2 % LPS allein*).

Wir konnten hiermit zeigen, dass IVIG, aber nicht F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente oder Humanalbumin die LPS-induzierte Apoptoseverzögerung in humanen Neutrophilen vermindern können.

## Apoptose von Neutrophilen im Propidiumiodid-Assay

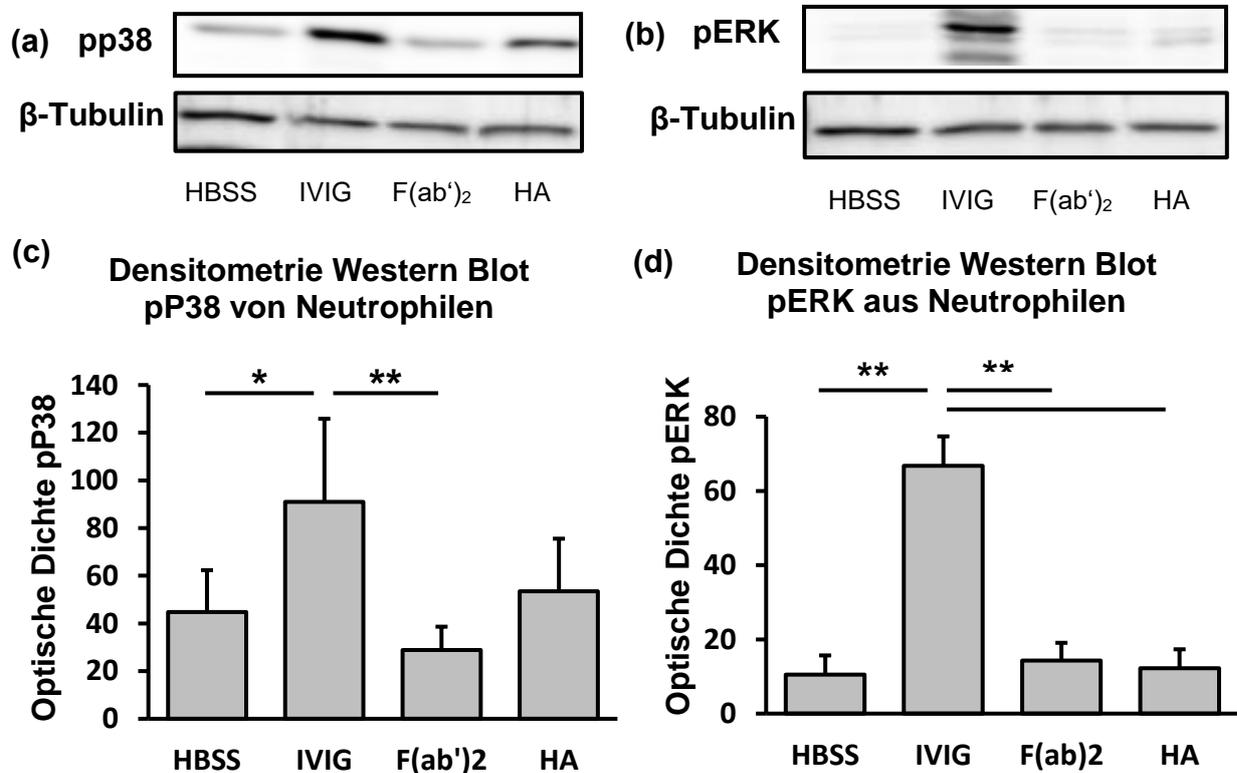


**Abbildung 12: IVIG hemmen die LPS-induzierte Verzögerung der Neutrophilenapoptose.** Durchflusszytometrische Messung der PI-Bindung an Neutrophile, welche zunächst 30 Minuten mit 10 mg/ml IVIG, der äquimolaren Menge F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente oder 10 mg/ml Humanalbumin vorinkubiert wurden und anschließend 20 h mit oder ohne 100 ng/ml LPS kultiviert wurden. Dargestellt ist der Anteil der Sub-G<sub>0</sub>-Zellen an der Gesamtanzahl der Neutrophilen als Apoptoserate aus 3 unabhängigen Experimenten. \* p<0,05, \*\* p<0,01

### 5.5 IVIG induzieren ERK und p38-Phosphorylierung, sowie die Produktion intrazellulärer Sauerstoffradikale

Bei der Aktivierung von Neutrophilenfunktionen sind neben dem NF-κB Signalweg noch zahlreiche weitere Signaltransduktionswege beteiligt. Wir untersuchten daher den Einfluss von IVIG auf MAPK (Mitogen-aktivierter Protein-Kinasen) in Neutrophilen, wobei wir mittels Western-Blot-Analyse für die phosphorylierten Formen von ERK und p38 feststellten, dass IVIG zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung beider MAPK führen. Die densitometrische Auswertung zeigte, dass IVIG, aber nicht F(ab')<sub>2</sub> oder Humanalbumin eine signifikante Induktion der Phosphorylierung von p38 im Vergleich zur HBSS-Kontrolle bewirken. Dabei erreichte jedoch der Unterschied der phospho-p38-Induktion zwischen IVIG und Humanalbumin nicht die Signifikanzgrenze. (optische Dichte - phospho-p38: 91 +/- 35 IVIG vs. 45 +/- 18 HBSS, 29 +/- 10

$F(ab')_2$  und 53  $\pm$  22 Humanalbumin – siehe Abbildung 13). Weiterhin führte die 2-minütige Inkubation Neutrophiler mit IVIG, aber nicht mit  $F(ab')_2$  oder Humanalbumin zu einer signifikanten Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK im Vergleich zur unbehandelten HBSS-Kontrolle (optische Dichte - phospho-ERK: 67  $\pm$  8 IVIG vs. 11  $\pm$  5 HBSS, 14  $\pm$  5  $F(ab')_2$  und 12  $\pm$  5 Humanalbumin – siehe Abbildung 13).



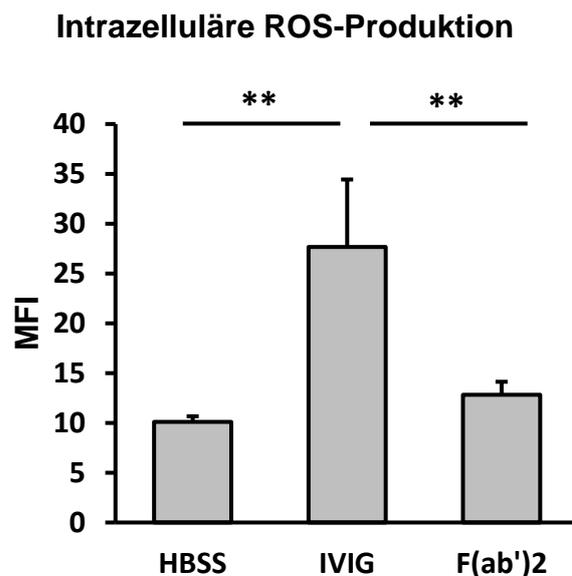
**Abbildung 13: IVIG induzieren die Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38 und ERK in neutrophilen Granulozyten.** Western Blot für phospho-p38 und phospho-ERK mit  $\beta$ -Tubulin als Ladekontrolle von Zytoplasmaextrakten von Neutrophilen, welche 2 Minuten mit HBSS, 10 mg/ml IVIG oder der äquimolaren Menge  $F(ab')_2$  bzw. Humanalbumin bei 37°C stimuliert wurden. (a) und (b) zeigen repräsentative Western Blots, (c) und (d) densitometrische Auswertungen von 4 unabhängigen Experimenten. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

P38 und ERK sind gemeinsam mit zahlreichen anderen Signaltransduktionswegen an der Induktion der Sauerstoffradikalproduktion von Neutrophilen beteiligt. So erfolgt die Rekrutierung der zytosolischen Komponenten der NADPH-Oxidase nach der Phosphorylierung der Proteine p47phox, p67phox und p40phox durch Proteinkinase-C-Isoformen, Kinasen des ERK/p38 MAPK – Signalwegs, cAMP-abhängige Proteinkinasen und Kinasen in Tyrosinkinase-abhängigen Signaltransduktionswegen.

Da IVIG ERK und p38-Signaltransduktion aktivierten und womöglich auch weitere, bisher nicht untersuchte Signalwege in Neutrophilen beeinflussen, untersuchten wir im Rhodamin-123-

Assay und im Ferricytochrom-Assay, wie sich IVIG auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies auswirken.

Die nicht fluoreszierende Substanz Dihydrorhodamin-123 ist zellpermeabel und diffundiert in alle Kompartimente der Zelle einschließlich der Granula, in welche durch die NADPH-Oxidase Sauerstoffradikale produziert werden. Durch die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies wird Dihydrorhodamin-123 zu dem grün-fluoreszierenden Rhodamin-123 oxidiert, dessen intrazelluläre Konzentration somit durchflusszytometrisch bestimmt werden kann. Die Konzentration der fluorogenen Substanz Rhodamin-123 wurde dabei als mittlere Fluoreszenzintensität quantifiziert und korreliert mit der intrazellulären Sauerstoffradikalproduktion. Die Behandlung der Neutrophilen mit IVIG, aber nicht mit F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten führte zu einer signifikant erhöhten Oxidation von Dihydrorhodamin-123 im Vergleich zur HBSS-Kontrolle (MFI: 27,66 +/- 6,77 IVIG und 12,82 +/- 1,3 (Fab')<sub>2</sub> vs. 10,1 +/- 0,56 HBSS-Kontrolle – siehe Abbildung 14). Folglich induzieren IVIG, aber nicht F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente die intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion in Neutrophilen.



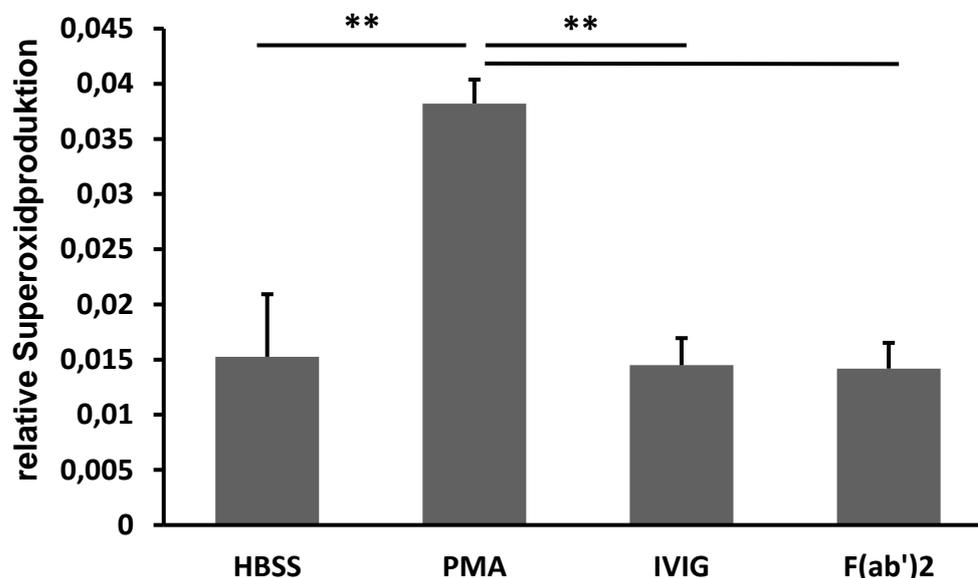
**Abbildung 14: IVIG induzieren die intrazelluläre Produktion von Sauerstoffradikalen in Neutrophilen.** Durchflusszytometrische Messung der Rhodamin-123-Konzentration in Neutrophilen, welche 30 Minuten bei 37°C mit HBSS, 10 mg/ml IVIG oder der äquimolaren Konzentration F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente inkubiert wurden. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten von 5 unabhängigen Experimenten als intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion. \*\* p<0,01

Während 95% des Cytochroms B558 – der Hauptbestandteil der NADPH-Oxidase – an den Membranen der Granula von Neutrophilen lokalisiert ist, befinden sich 5% an der äußeren

Plasmamembran. Folglich können Neutrophile ROS nicht nur intrazellulär in die Phagolysosomen hinein produzieren, sondern diese mikrobiziden Substanzen auch in den Extrazellularraum freisetzen.

Im Ferricytochrom C Assay wird die Reduktion von Cytochrom C durch Superoxid-Anionen photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Durch die vergleichende Messung zu einer mit Superoxiddismutase behandelten Kontrollprobe kann der Anteil der Superoxidanionen an der Reduktion von Cytochrom C bestimmt werden, da die Superoxiddismutase den Abbau der  $O_2^-$  Ionen zu  $H_2O_2$  katalysiert. Dabei werden lediglich die extrazellulär produzierten Superoxidanionen erfasst, weil Ferricytochrom C die Plasmamembran nicht passieren kann. In unseren Experimenten konnten wir nach einer Stunde keine signifikante Steigerung der extrazellulären Freisetzung von Superoxidanionen durch die Behandlung von Neutrophilen mit 10 mg/ml IVIG oder  $F(ab')_2$ -Fragmenten in äquimolarer Konzentration im Vergleich zur HBSS-Kontrolle feststellen (*Arbitrary Units:  $14,5 \cdot 10^{-3} \pm 2,46 \cdot 10^{-3}$  IVIG und  $14,2 \cdot 10^{-3} \pm 2,33 \cdot 10^{-3}$   $F(ab')_2$  vs.  $15,3 \cdot 10^{-3} \pm 5,67 \cdot 10^{-3}$  HBSS-Kontrolle – siehe Abbildung 15*), wobei PMA-behandelte Neutrophile als Positivkontrolle dienten (*AU:  $38,2 \cdot 10^{-3} \pm 2,17 \cdot 10^{-3}$  PMA vs.  $15,3 \cdot 10^{-3} \pm 5,67 \cdot 10^{-3}$  HBSS-Kontrolle*).

### Extrazelluläre Superoxidproduktion



**Abbildung 15: Weder IVIG noch  $F(ab')_2$ -Fragmente induzieren die extrazelluläre Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies in Neutrophilen.** Relative extrazelluläre Produktion von Superoxid-Ionen durch fotometrische Messung der Menge des reduzierten Cytochroms C nach einstündiger Inkubation mit HBSS, 25 nmol/l PMA als Positivkontrolle, 10 mg/ml IVIG oder

der äquimolaren Menge  $F(ab')_2$ -Fragmente. Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten. \*\*  $p < 0,01$

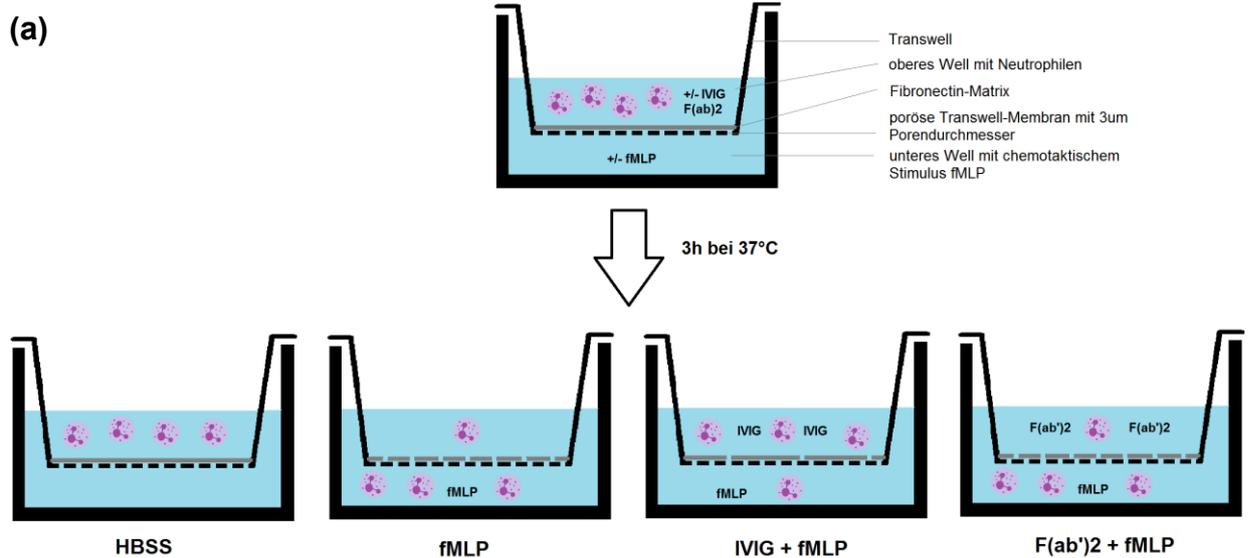
## 5.6 IVIG, aber nicht $F(ab')_2$ -Fragmente hemmen die fMLP-induzierte Migration von primären humanen Neutrophilen

Neben der Sauerstoffradikalproduktion ist ein wichtiger Mechanismus der Neutrophilen zur Pathogenelimination, aber auch für eine potenzielle Gewebeschädigung, ihre chemotaktische Migration durch die Endothelzellschicht und durch subendotheliales Bindegewebe. Wir untersuchten deswegen im Folgenden das Migrationverhalten der PMN unter dem Einfluss von IVIG.

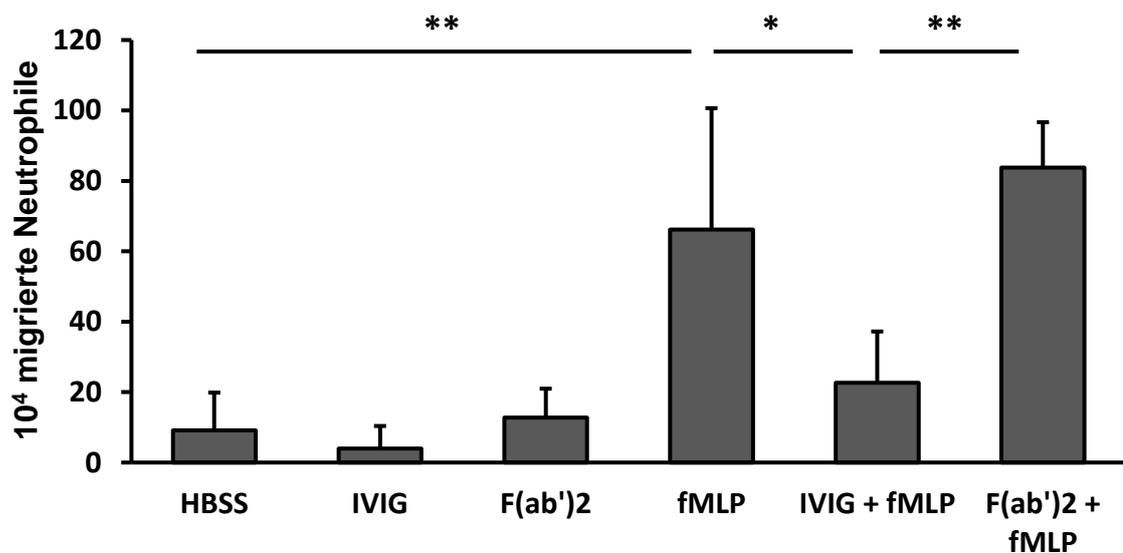
In unserem Transmigrationsassay testen wir, wie viele Neutrophile durch Transwells mit einem Porendurchmesser von  $3,0 \mu\text{m}$ , welche mit einer Fibronectin-Matrix beschichtet wurden, migrieren. Dabei stellen sowohl die Fibronectin-Matrix als artifizielle extrazelluläre Matrix als auch die Poren, deren Durchmesser weniger als die Hälfte des Durchmessers eines durchschnittlichen Neutrophilen beträgt, eine Barriere dar, welche erst durch einen chemotaktischen Stimulus hin von den Neutrophilen durchwandert werden. Dies erfolgte durch Zugabe von fMLP, einem bakteriellen N-formylierten Tripeptid in das Well, welches sich unterhalb des Transwells befindet. fMLP wird auch als chemotaktisches Peptid bezeichnet und sein Rezeptor ist eng mit dem IL-8-Rezeptor verwandt.

Die Anzahl der vom Transwell in das untere Well migrierten Neutrophilen wird durch die MPO-Aktivität der lysierten Neutrophilen im unteren Well quantifiziert.

Die Stimulation mit fMLP führte zu einer signifikanten Steigerung der Migration der Neutrophilen im Vergleich zur HBSS-Kontrolle (*migrierte Neutrophile:  $66,2 \cdot 10^4 \pm 38,9 \cdot 10^4$  fMLP vs.  $9,1 \cdot 10^4 \pm 16,6 \cdot 10^4$  HBSS-Kontrolle*). Die Vorbehandlung mit IVIG, nicht aber mit  $F(ab')_2$ -Fragmenten vor der chemotaktischen Stimulation mit fMLP führte zu einer signifikanten Reduktion der Migration im Vergleich zu den mit fMLP stimulierten Neutrophilen (*migrierte Neutrophile:  $22,6 \cdot 10^4 \pm 16,2 \cdot 10^4$  IVIG/fMLP und  $83,7 \cdot 10^4 \pm 15,6 \cdot 10^4$   $F(ab')_2$ /fMLP vs.  $66,2 \cdot 10^4 \pm 38,9 \cdot 10^4$  fMLP allein – siehe Abbildung 16*).



(b) Migration



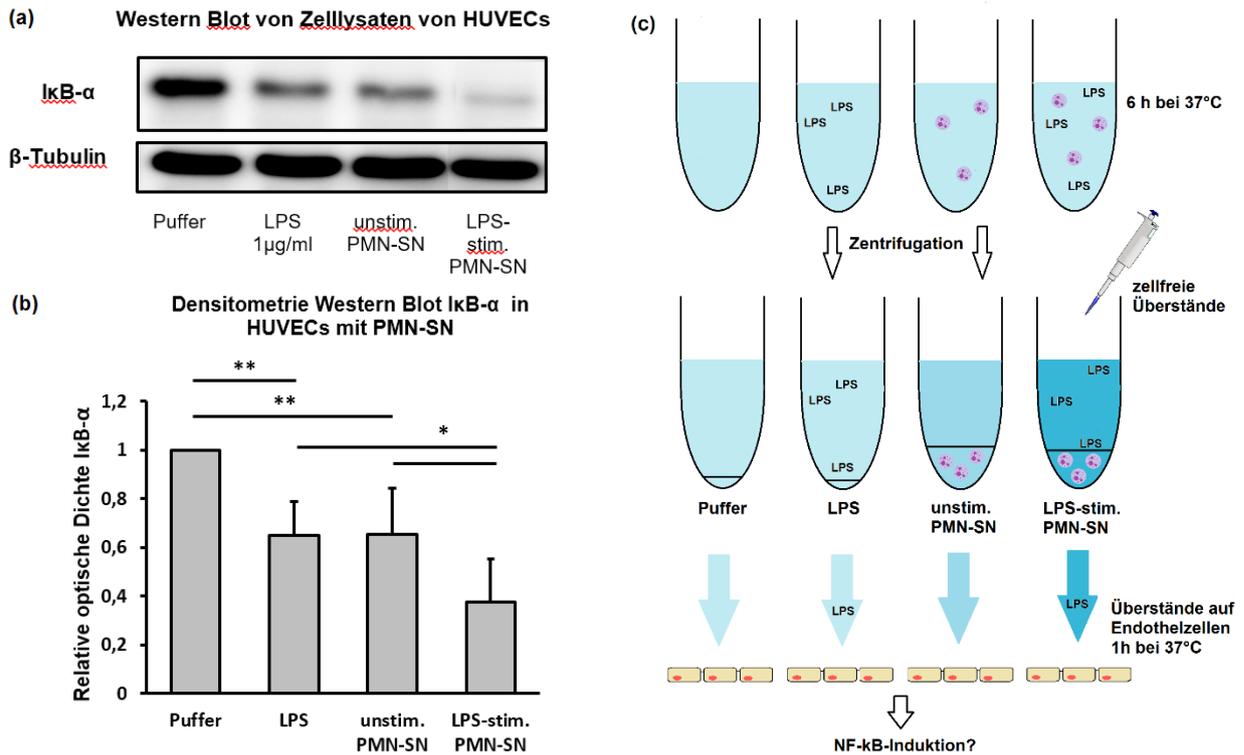
**Abbildung 16: IVIG, aber nicht F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente hemmen die fMLP-induzierte chemotaktische Migration von Neutrophilen.** (a) Schematische Darstellung der Experimentieranordnung. (b) Migration von Neutrophilen durch mit einer Fibronectin-Matrix beschichtete Transwells mit einem Porendurchmesser von 3.0 µm. Dargestellt sind die Anzahl der innerhalb von 3 h in das untere Well migrierten Neutrophilen aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten. \* p<0,05, \*\* p<0,01

## 5.7 Zellfreie Überstände LPS-stimulierter Neutrophiler führen zu einer stärkeren NF-κB Aktivierung in Endothelzellen als die alleinige LPS Stimulation

Die Aktivierung von NF-κB führt zur verstärkten Transkription proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α und IL-1β, die im Rahmen von SIRS und Sepsis zu einer aggravierten Gewebeschädigung beitragen. Stimulierte Neutrophile setzen diese Zytokine in das Medium bzw. das umliegende Gewebe frei und bewirken somit die Stimulation weiterer Zellsysteme, bei Entzündungsprozessen typischerweise in Form einer Gefäßbettschädigung. Wir untersuchen deswegen den Effekt der Zytokinausschüttung auf die Stimulation von Endothelzellen und die Modulierbarkeit dieser durch Gabe von IVIG.

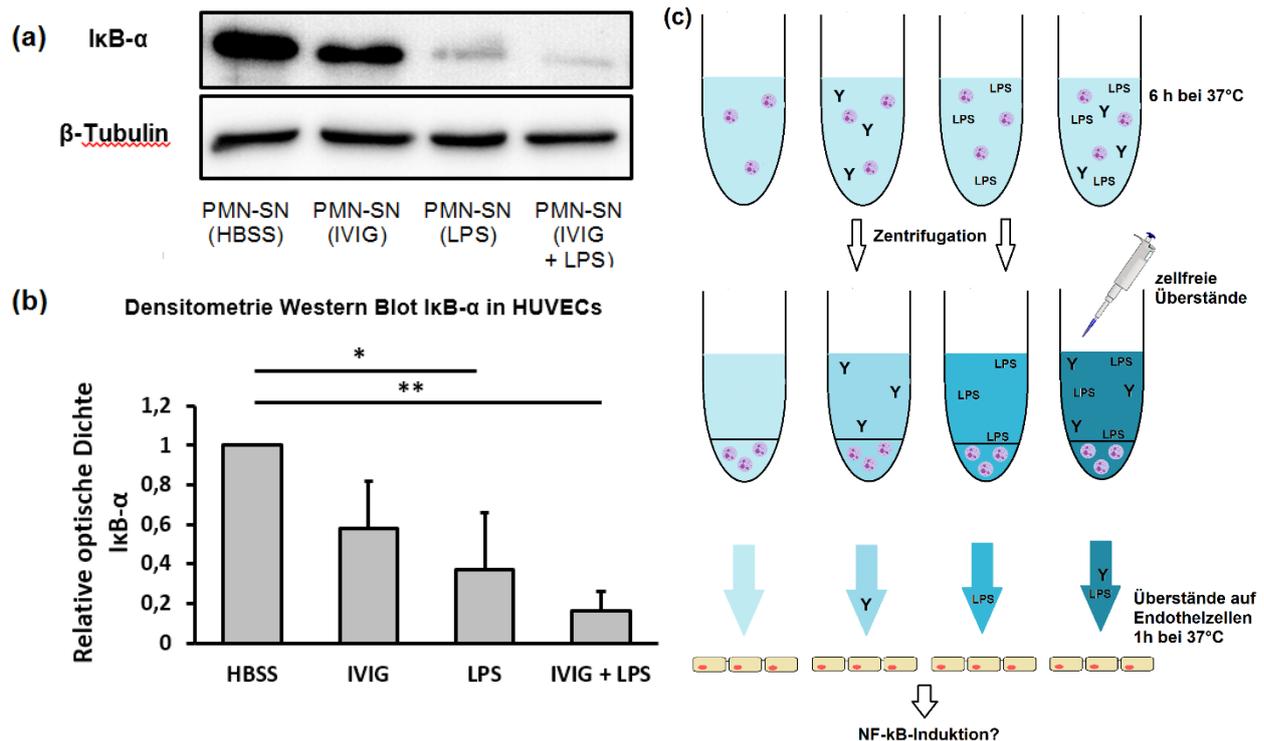
Hierzu stimulierten wir Endothelzellen für 1h mit zellfreien Überständen von Neutrophilen, welche zuvor 6 h mit LPS kultiviert wurden und analysierten anschließend die Aktivierung von NF-κB in Endothelzellen anhand der Degradation von IκB-α im Western-Blot. Mittels densitometrischer Auswertung der IκB-α Banden im Western Blot wurden die optischen Dichten der einzelnen Banden als Änderung zur HBSS Kontrolle, die gleich 1,0 gesetzt wurde, angegeben.

Die Stimulation von Endothelzellen mit 1 µg/ml LPS bewirkte bereits eine Degradation von IκB-α. Die Behandlung mit zellfreien Überständen LPS behandelter Neutrophiler führte jedoch darüber hinaus zu einer weiteren Degradierung, also stärkeren NF-κB Aktivierung (*relative optische Dichte: 0,38 +/- 0,17 LPS-stim. PMN-SN vs. 0,65 +/- 0,14 LPS allein vs. 1,0 +/- 0 HBSS-Kontrolle – siehe Abbildung 17*). Auch der Überstand unbehandelter Neutrophiler aktiviert NF-κB im gleichen Sinne wie die LPS-behandelte Kontrolle (*relative optische Dichte: 0,65 +/- 0,19 unstim. PMN-SN und 0,65 +/- 0,14 LPS allein vs. 1,0 +/- 0 HBSS-Kontrolle*), was dafür spricht, dass neutrophile Granulozyten, die 6h bei 37°C verweilen, bereits aktiviert werden und Zytokine freisetzen. Zusammenfassend beobachteten wir eine Anschaltung von endotheliale NF-κB durch Überstände LPS-stimulierter Neutrophiler, welche über die alleiniger LPS-Stimulation hinausging, was wir der Produktion proinflammatorischer Zytokine zuschrieben.



**Abbildung 17: Die Behandlung von Endothelzellen mit Überständen LPS-stimulierter Neutrophiler führt zu einer zusätzlichen NF-κB-Aktivierung im Vergleich zur Behandlung mit LPS allein.** Western Blot für IκB-α und β-Tubulin als Ladekontrolle von Gesamtzelllysaten von HUVECs, welche für 60 Minuten entweder mit HBSS, 1 µg/ml LPS (mit 1% FCS) oder mit zellfreien Überständen von Neutrophilen (PMN-SN) bei 37°C inkubiert wurden. Diese Überstände wurden durch 6-stündige Inkubation bei 37°C in Puffer (unstim. PMN-SN) oder mit 1µg/ml LPS in Puffer (LPS-stim. PMN-SN) generiert. (a) repräsentativer Western Blot und (b) densitometrische Auswertung von 7 unabhängigen Experimenten. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . (c) Schematische Darstellung der Experimentieranordnung.

Die Aktivierung von NF-κB in Endothelzellen führt zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, sowie zur Veränderung von Glykokalyx-Komponenten, was die Adhäsion und Migration von Neutrophilen und anderen Immunzellen in das subendotheliale Kompartiment ermöglicht. Wir testeten deshalb im nächsten Schritt den Einfluss von IVIG auf die LPS-stimulierte Sekretion neutrophiler Mediatoren, indem wir die PMN vor der 6 stündigen LPS Stimulation zusätzlich mit IVIG vorinkubierten. Dies verhinderte jedoch nicht die Aktivierung von endotheliale NF-κB durch die zellfreien Überstände (PMN-SN) (relative optische Dichte:  $0,37 \pm 0,28$  LPS-stim. PMN-SN vs.  $0,16 \pm 0,10$  IVIG/LPS-stim. PMN-SN – siehe Abbildung 18).

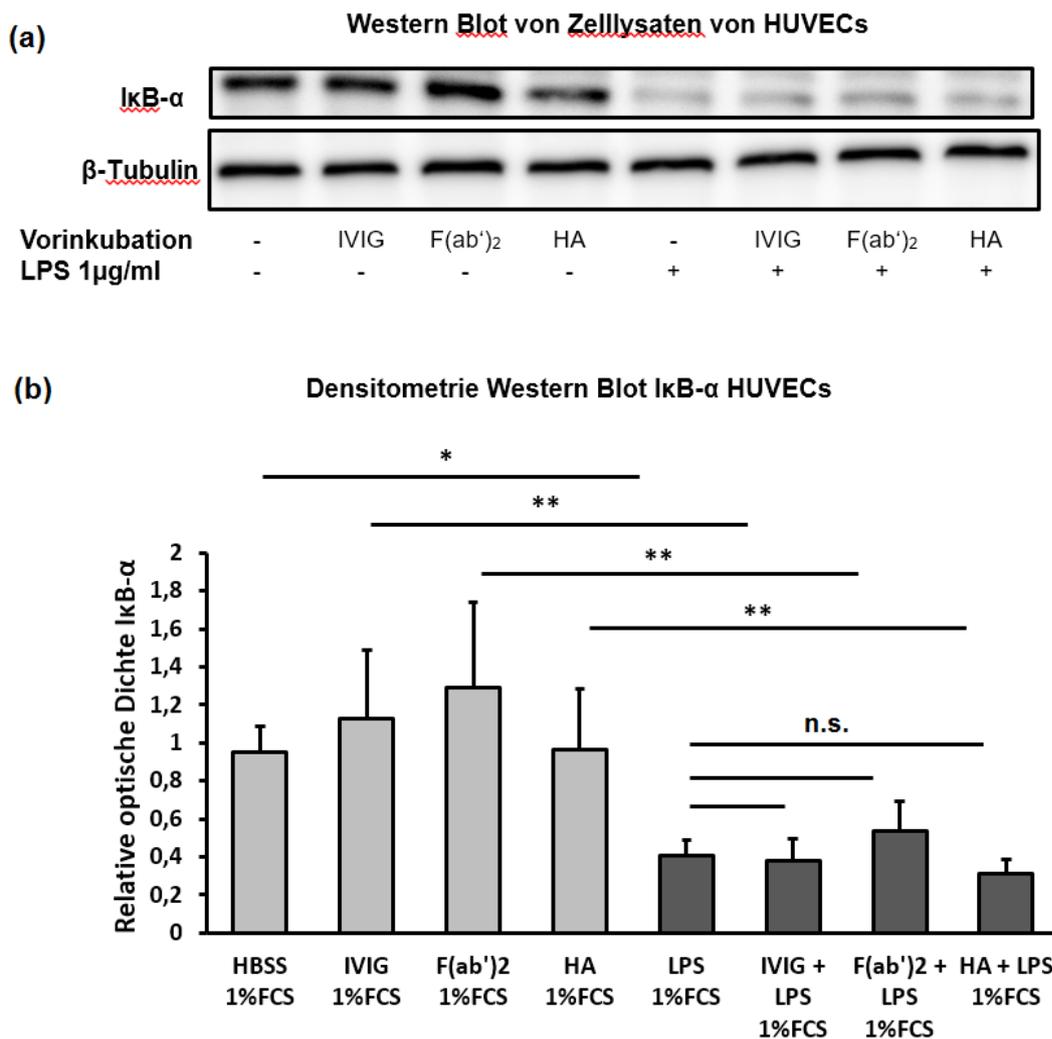


**Abbildung 18: Die Behandlung von Endothelzellen mit Überständen LPS-stimulierter Neutrophiler führt zu einer NF-κB-Aktivierung in den Endothelzellen, die durch Vorbehandlung der Neutrophilen mit IVIG vor LPS-Stimulation nicht gehemmt wird.** Western Blot für IκB-α mit β-Tubulin als Ladekontrolle von Gesamtzelllysaten von HUVECs, welche für 60 Minuten mit zellfreien Überständen von Neutrophilen bei 37°C inkubiert wurden. Diese Überstände wurden durch 6-stündige Inkubation bei 37°C mit den angegebenen Substanzen generiert. (a) repräsentativer Western Blot und (b) densitometrische Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . (c) Schematische Darstellung der Experimentieranordnung.

### 5.8 Weder IVIG, F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente noch Humanalbumin hemmen die LPS-induzierte NF-κB-Anschaltung in HUVECs

Da wir keine inhibitorischen Effekte von IVIG auf die neutrophilenvermittelte NF-κB-Aktivierung von Endothelzellen beobachten konnten, überprüften wir, ob IVIG, F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente oder Humanalbumin die LPS-induzierte NF-κB-Anschaltung in HUVECs direkt verhindern könnten. Hierzu analysierten wir mittels Western Blot das Ausmaß der IκB-α-Degradation in HUVEC-Zelllysaten. Mittels densitometrischer Auswertung der Western Blots wurden die IκB-α-Konzentrationen jeweils im Verhältnis zur HBSS/FCS-Kontrolle quantifiziert (1,0 entsprechend). Wir beobachteten dabei, dass die Stimulation von HUVECs mit 1 µg/ml LPS nach einer Stunde

zu einer signifikanten Degradation von I $\kappa$ B- $\alpha$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte (relative optische Dichte: 0,41  $\pm$  0,08 LPS vs. 1,0  $\pm$  0 Kontrolle – siehe Abbildung 19). Durch Vorbehandlung der HUVECs mit 10 mg/ml IVIG, der äquimolaren Menge F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente oder Humanalbumin vor LPS-Stimulation konnte keine signifikante Hemmung der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Degradation im Vergleich zur LPS-Behandlung allein beobachtet werden (relative optische Dichte: 0,38  $\pm$  0,12 IVIG/LPS, 0,53  $\pm$  0,16 F(ab')<sub>2</sub>/LPS und 0,31  $\pm$  0,08 Humanalbumin/LPS vs. 0,41  $\pm$  0,08 LPS allein). Folglich konnten IVIG in unseren Experimenten die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in HUVECs nicht aufheben.



**Abbildung 19: Die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Endothelzellen kann nicht durch Vorbehandlung mit IVIG, F(ab')<sub>2</sub> oder Humanalbumin gehemmt werden.** Western Blot für I $\kappa$ B- $\alpha$  mit  $\beta$ -Tubulin als Ladekontrolle aus Gesamtzelllysaten von HUVECs, welche zunächst 30 Minuten mit Puffer, IVIG, F(ab')<sub>2</sub> oder HA vorinkubiert wurden und anschließend für 60 Minuten unbehandelt oder mit 1  $\mu$ g/ml LPS bei 37°C inkubiert wurden. (a) repräsentativer Western-Blot und (b) densitometrische Auswertung von 4 unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Effekte von IVIG auf humane neutrophile Granulozyten und Endothelzellen im Kontext der oben beschriebenen akuten LPS-induzierten albuminurischen Nierenschädigung. Wir zeigen *in vitro*, dass IVIG in therapeutischer Dosis die LPS-induzierte Immunantwort von Neutrophilen modulieren können, indem sie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B hemmen, die LPS-induzierte Apoptoseverzögerung aufheben und zur verminderten Migration von Neutrophilen führen.

### 6.1 Wirkung intravenöser Immunglobuline auf Neutrophilenfunktionen

Sowohl präliminäre *in vivo* Daten als auch die hier präsentierten *in vitro* Daten zeigen, dass IVIG einen hemmenden Effekt auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B haben und die Tatsache, dass IVIG, nicht aber F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Anschaltung in Neutrophilen inhibieren, impliziert, dass die Bindung von IVIG an Fc $\gamma$ -Rezeptoren für den inhibitorischen Effekt verantwortlich ist. Ichiyama et al. demonstrierten bereits 2004, dass IVIG die TNF- $\alpha$  induzierte NF- $\kappa$ B-Anschaltung in der monozytischen Zelllinie U-937 hemmen.<sup>68</sup> Wir schlagen hier mit der Inhibition der LPS-induzierten NF- $\kappa$ B-Anschaltung in Neutrophilen einen neuen potenziellen Wirkmechanismus von IVIG vor.

Eine Ursache für einen anhaltenden inflammatorischen Prozess bei der Sepsis liegt in der Verzögerung der Apoptose der neutrophilen Granulozyten. Die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt bekanntermaßen zu einer Verzögerung der Apoptose von Neutrophilen *in vivo* und *in vitro*.<sup>91-</sup><sup>94</sup> Wir analysierten die Effekte von IVIG auf die Neutrophilenapoptose und konnten zeigen, dass IVIG, nicht aber F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente die apoptoseverzögernde Wirkung von LPS aufheben. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass IVIG den Effekt auf die LPS-induzierte Apoptoseverzögerung über eine Hemmung von NF- $\kappa$ B vermittelt. Der Einfluss von IVIG auf die Apoptose wurde auch von anderen Gruppen untersucht. Casulli et al. zeigten einen dosisabhängigen Effekt von IVIG auf die Neutrophilenapoptose, wobei hohe Dosen IVIG (10 mg/ml – 25 mg/ml), wie auch von uns verwendet, die LPS-induzierte Apoptoseverzögerung aufhoben, was mit unseren Beobachtungen übereinstimmt.<sup>84</sup> Diese Immunglobulinkonzentrationen entsprechen auch der *in vivo* Situation, da bei Hochdosis-IVIG-Therapien mit 1-2 g/kg Körpergewicht ähnliche Konzentrationen im Serum erreicht werden.<sup>63</sup> Als zugrundeliegende Mechanismen diskutieren Casulli et al. natürlich vorkommende anti-Fas-Antikörper sowie anti-Siglec-9-Antikörper. So enthalten IVIG sowohl agonistische als auch antagonistische anti-Fas-Antikörper, welche dosisabhängig unterschiedliche Effekte auf Neutrophilenapoptose haben. Bei niedrigdosierter IVIG-Anwendung werden hauptsächlich die antagonistischen anti-Fas-Antikörper antiapoptotisch wirksam, wohingegen bei höheren Dosierungen die agonistischen anti-Fas-Antikörper einen dosisabhängigen proapoptotischen

Effekt zeigen.<sup>73</sup> Zudem enthalten IVIG-Präparationen Anti-Siglec-9-Antikörper, welche über Caspase-abhängige und -unabhängige Mechanismen proapoptotisch auf Neutrophile wirken.<sup>85,95</sup> Da Neutrophile durch ihre unspezifischen Abwehrmechanismen zur Gewebeschädigung beitragen können<sup>25,29-31</sup>, ist eine beschleunigte Elimination proinflammatorisch aktivierter Neutrophiler durch eine Begrenzung ihrer Überlebensdauer ein potenziell gewebeprotectiver Effekt von IVIG, der in ähnlichen Experimenten bereits 2005 von Takeshita et al. und 2014 von Aoyama-Ishikawa beschrieben wurde.<sup>83,84,96</sup>

Neutrophile sind Stimulus abhängig in der Lage, verschiedene antimikrobielle Mechanismen zu aktivieren, darunter Phagozytose, Degranulation, die Produktion und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies sowie die Ausbildung von NETs (englisch: neutrophil extracellular traps). Letztere entstehen im Rahmen einer zu Apoptose und Nekrose alternativen Form des Zelltods - der NETose, wobei Chromatinfäden, assoziiert mit Histonen, granulären Neutrophilenproteinen und Proteasen von den Neutrophilen ausgeworfen werden und antimikrobiell gegen Bakterien und Pilze wirksam werden können.<sup>97,98</sup> Dieser differentiellen Aktivierung antimikrobieller Abwehrmechanismen liegt die Anschaltung verschiedener Signalwege zugrunde, zu denen auch NF- $\kappa$ B gehört. Weitere gut untersuchte Signalwege, die neben dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B an der Regulation der Neutrophilenfunktionen beteiligt sind, sind die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen wie MEK/ERK und p38-MAPK.<sup>99,100</sup> Die MAPK-Aktivierung wurde mit Sauerstoffradikalproduktion, Priming von Neutrophilen, Degranulation, Adhäsion, Migration und Apoptose in Zusammenhang gebracht.<sup>101-103</sup> LPS ist ein bekannter Aktivator dieser MAPK und in monozytischen Zelllinien wurde die inhibitorische Wirkung von IVIG auf diese Signalwege gezeigt.<sup>104,105</sup> Wir untersuchten zunächst den generellen Einfluss von IVIG in Neutrophilen hinsichtlich dieser Signalwege und beobachteten hierbei, dass IVIG in Neutrophilen eine signifikante Phosphorylierung von p38-MAPK und ERK induzieren, was im Gegensatz zu den Beobachtungen anderer Gruppen in Monozyten steht.

Die Stimulation von Neutrophilen führt über zahlreiche Signalwege (darunter MAPK und NF- $\kappa$ B) unter anderem zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase und zur vermehrten Sauerstoffradikalproduktion, welche mit einer erhöhten Gewebeschädigung assoziiert wird. Andererseits gibt es auch Daten zu protektiven Effekten des NADPH-Systems. So konnten Schreiber et al. erst vor kurzem in einem murinen Modell von anti-MPO rapid-progressiver Glomerulonephritis nachweisen, dass Tiere mit Defekten der NADPH-Oxidase einen aggravierten Krankheitsverlauf mit schwererer Nierenschädigung zeigten, was durch Herunterregulation von Caspase-1 und IL-1 $\beta$  erklärt wurde.<sup>106</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Quantifizierung der intrazellulären Sauerstoffradikalproduktion der Dihydrorhodamin-123-Assay und für die extrazelluläre Freisetzung der Ferricytochrom-C-Assay verwendet, da mit letzterem spezifisch die extrazelluläre

Freisetzung von Superoxidanionen quantifiziert werden kann. Eine solche extrazelluläre Radikalfreisetzung ins Gewebe durch ausgewanderte Neutrophile stellt eine potenzielle Ursache für Gewebeschädigung im Rahmen inflammatorischer Erkrankungen dar. Unsere Experimente zeigen, dass IVIG in Neutrophilen zwar eine erhöhte intrazelluläre Radikalproduktion induzieren, dies aber nicht mit einer messbaren extrazellulären Freisetzung von Superoxidradikalen einherging. In der Literatur finden sich zwar keine distinkten Angaben zu intra- versus extrazellulärer Produktion von Sauerstoffradikalen, aber die IVIG vermittelte erhöhte Produktion wurde bereits in mehreren Studien beobachtet, teilweise aber erst nach Hinzunahme eines Priming.<sup>83,84,107,108</sup>

Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ist über die antimikrobielle Wirkung hinaus ein entscheidender Regulator der Neutrophilenapoptose. Rollet-Labelle et al. zeigten, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nicht aber Superoxidanionen zur Apoptose von Neutrophilen führen.<sup>109</sup> Die IVIG-getriggerte intrazelluläre Radikalproduktion ist demnach ein weiterer potenzieller Mechanismus für die nachgewiesenen proapoptotischen Effekte von IVIG auf Neutrophile. Takeshita et al. zeigen in ihrer Untersuchung, dass IVIG die LPS-induzierte Apoptoseverzögerung von Neutrophilen aufheben können und führen dies auf eine vermehrte Sauerstoffradikalproduktion durch die Behandlung mit IVIG zurück. Die gleichzeitige Behandlung von Neutrophilen mit IVIG und LPS führte einerseits zu erhöhter Sauerstoffradikalproduktion und die zusätzliche Behandlung der Neutrophilen mit unterschiedlichen Antioxidantien hatte andererseits die Aufhebung der proapoptotischen Effekte von IVIG zur Folge.<sup>83</sup> Eine Hemmung der proapoptotischen IVIG-Effekte in ROS-defizienten (z.B. von Patienten mit septischer Granulomatose) oder antioxidativ behandelten Neutrophilen könnte in weiteren Experimenten Aufschlüsse darüber geben, ob die IVIG-induzierte ROS Bildung für die proapoptotischen Effekte von IVIG auf Neutrophile notwendig ist.

Wir zeigen, dass IVIG die MAPK ERK und p38 aktivieren und zur intrazellulären ROS Produktion in Neutrophilen führen. Die Steigerung der MAPK Signaltransduktion führt u.a. zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und Studien anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass die Aufhebung der LPS-induzierten Apoptoseverzögerung durch IVIG von der Produktion von Sauerstoffradikalen abhängig ist. Wir schlagen daher neben der Hemmung von NF-κB einen weiteren Mechanismus der proapoptotischen Wirkung von IVIG auf Neutrophile vor, welcher weiterer experimenteller Überprüfung bedarf: IVIG bewirken durch die Aktivierung von MAPK eine Steigerung der intrazellulären ROS Produktion, welche deren proapoptotische Effekte bedingen.

Damit die unspezifischen antimikrobiellen Abwehrmechanismen der Neutrophilen zur Gewebeschädigung wie einer akuten Nierenschädigung führen können, müssen Neutrophile zunächst das Gefäßbett verlassen und im Rahmen der transendothelialen Migration durch die endotheliale Barriere in das subendotheliale Bindegewebe migrieren.

Wir untersuchten, ob IVIG die transendotheliale Migration von Neutrophilen aus dem Gefäßbett ins Gewebe beeinflussen und analysierten dafür die Migration von Neutrophilen durch eine Fibronectin-Matrix auf chemotaktische Stimulation. Die Vorbehandlung mit IVIG führte zu einer signifikanten Reduktion der Migrationsrate der Neutrophilen auf chemotaktische Stimulation mit fMLP, welche nicht durch F(ab')<sub>2</sub> oder Humanalbumin erreicht wurde. Dies bestätigt, dass intakte Immunglobuline notwendig sind und Humanalbumin als „Eiweißkontrolle“ keinen Effekt hat. Wir schlussfolgern, dass IVIG zusätzlich zu den bisher dargelegten Wirkmechanismen eine neutrophilenvermittelte Gewebeschädigung durch die Hemmung der Migration dieser Zellen vermindern.

Issekutz et al. beschrieben in einem Modell von transendothelialer Neutrophilenmigration inhibitorische Effekte von IVIG auf die Migrationsfähigkeit von Neutrophilen durch mit IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  vorstimulierte Endothelzellmonolayer, jedoch nicht durch unstimulierte Endothelzelllayer. Ferner zeigten sie, dass IVIG keine Reduktion der Adhäsion der Neutrophilen bewirken, sondern erst in späteren Stadien der transendothelialen Migration inhibitorisch wirken.<sup>110</sup>

Die beobachtete Wirkung von IVIG auf die Neutrophilenmigration ist durch die Modulation chemotaktisch-induzierter Signalwege in Neutrophilen erklärbar. Bei IL-8 und GM-CSF induzierter Migration kommt es neben der Induktion von Signalwegen wie PI3K/Akt und ERK auch zu einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Neutrophilen.<sup>88</sup> Ein weiteres wichtiges Signalmolekül mit chemotaktischen Eigenschaften, welches vermehrt bei Sepsis ausgeschüttet wird und dem aufgrund seiner proinflammatorischen Effekte eine wesentliche Bedeutung in deren Pathogenese und wachsendes Forschungsinteresse zukommen, ist high mobility group box 1 (HMGB1). HMGB1 ist ein nukleäres Nicht-Histon-Protein, welches von Säugerzellen exprimiert und bei Gewebeschädigung passiv aus nekrotischen Geweben freigesetzt wird. Im Rahmen von Sepsis und SIRS kann es jedoch auch aktiv von Zellen des angeborenen Immunsystems durch Stimulation mit LPS oder TNF- $\alpha$  sezerniert werden und wirkt wiederum proinflammatorisch auf Monozyten, Neutrophile und Endothelzellen sowie chemotaktisch auf Monozyten und Neutrophile.<sup>111-113</sup> Penzo et al. zeigten sowohl in vivo als auch in vitro, dass die HMGB1-induzierte chemotaktische Migration von Neutrophilen NF- $\kappa$ B-abhängig ist.<sup>114</sup> Zukünftige Experimente sollten daher zunächst den inhibitorischen Einfluss von IVIG auf Neutrophilenmigration durch weitere chemotaktische Stimuli wie IL-8 bzw. chemotaktisch wirkende Signalmoleküle wie GM-CSF und insbesondere HMGB-1 bestätigen. Da IVIG die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Neutrophilen inhibieren, die MAPK Kinasen jedoch aktivieren, bleibt die Frage offen, inwiefern die Hemmung der Migration über die NF- $\kappa$ B Inhibition zu erklären ist. Durch die vorhergehende Inkubation mit spezifischen NF- $\kappa$ B-Inhibitoren sollte in weiteren Experimenten überprüft werden, ob dies gleichsam zu einer Hemmung der Neutrophilenmigration führt. Womöglich spielt jedoch auch die

Beladung der Neutrophilen mit Immunglobulinen oder Immunglobulinkomplexen eine Rolle. Diese könnte durch Bindung an Komponenten der Fibronectin-Matrix oder über eine verminderte Verformbarkeit der Neutrophilen für eine Hemmung der Migration sorgen.

Der Pathogenese des Multiorganversagens im Rahmen der schweren Sepsis liegt zum Teil der sogenannte Zytokinsturm zu Grunde – die stark erhöhte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in kurzer Zeit durch die Anwesenheit hoher Konzentrationen intakter Pathogene oder PAMPs wie LPS im Blutkreislauf.<sup>115,116</sup> Neben Monozyten und Makrophagen, welche als Immunzellen des angeborenen Immunsystems proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 produzieren, sind Neutrophile ebenfalls wesentlich an der Generierung von Zytokinen und Chemokinen beteiligt, was durch die unterschiedlichsten Stimuli, darunter auch LPS, ausgelöst wird.<sup>99</sup> Da NF- $\kappa$ B ein zentraler Transkriptionsfaktor für die Transkription proinflammatorischer Zytokine ist, untersuchten wir, ob die NF- $\kappa$ B Hemmung durch IVIG die LPS-induzierte Zytokinproduktion in Neutrophilen beeinflusst.<sup>99</sup> Dazu analysierten wir vorab die Wirkung zellfreier Überstände aus Neutrophilen, welche mit LPS stimuliert wurden, auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierbarkeit in Endothelzellen. Für sechs Stunden mit LPS stimulierte Neutrophile produzierten hierbei Faktoren in den Überstand, welche zu einer verstärkten NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Endothelzellen führten, die signifikant stärker als die alleinige LPS Stimulation der Endothelzelle war. Als Vermittler kommen unter anderem proinflammatorische Zytokine oder Degranulationsprodukte in Frage. Eine Vorbehandlung der Neutrophilen mit IVIG führte jedoch nicht zu einer Reduktion der endothelialen NF- $\kappa$ B-Anschaltung durch die neutrophilengenerierten Überstände. Da IVIG zur Aktivierung von MAPK Signalwegen führen und diese ebenfalls an der Zytokinproduktion in Neutrophilen beteiligt sind, schlussfolgerten wir, dass die nachgewiesene Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch IVIG nicht ausreicht, um die endotheliale NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Neutrophilenüberstände zu verhindern. Daher wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, die Effekte von IVIG hinsichtlich der Konzentrationen neutrophilenproduzierter Zytokine direkt mittels ELISA zu quantifizieren, den Einfluss von Degranulation zu testen und die Hochregulation NF- $\kappa$ B abhängiger Gene zu analysieren.

## **6.2 Wirkung Intravenöser Immunglobuline auf Endothelzellen**

LPS führt in vivo zu Albuminurie und reduzierter GFR, wobei es zu Veränderungen der Endothelzellschicht mit einer Abnahme der Anzahl der Fenestrierungen bei gleichzeitiger Zunahme des Fenestraedurchmessers kommt.<sup>117</sup>

Endothelzellschädigung und endotheliale Dysfunktion sind entscheidende pathogenetische Faktoren im Rahmen der Sepsis und werden unter anderem durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in Endothelzellen vermittelt.<sup>118-121</sup> LPS führt über die Anschaltung von NF- $\kappa$ B in Endothelzellen zudem zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-

1, das als Bindungspartner von Integrinen auf der Neutrophilenmembran dient und so die Adhäsion von Neutrophilen an die Endothelschicht fördert.<sup>122</sup> Ferner führt die NF- $\kappa$ B-Anschaltung zur vermehrten Expression von Zytokinen und Chemokinen wie IL-8, welches transendotheliale Migration vermittelt.<sup>123</sup>

Da wir durchflusszytometrisch zeigen konnten, dass IVIG an Endothelzellen binden und somit potenziell auch Signaltransduktion modulieren können, untersuchten wir die Beeinflussbarkeit von NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion durch IVIG in Endothelzellen. Dabei beobachteten wir jedoch keinen inhibitorischen Effekt von IVIG auf die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung von Endothelzellen.

Ichiyama et al. beschrieben, dass IVIG die TNF- $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in humanen Koronarendothelzellen inhibieren konnten, schlugen jedoch keinen Wirkmechanismus vor.<sup>67</sup> Matsuda et al. konnten in ähnlichen Versuchen die beschriebenen Effekte hingegen nicht reproduzieren, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt.<sup>87</sup> Es bleibt also kontrovers, ob IVIG die NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion in Endothelzellen beeinflussen können oder nicht.

### **6.3 Schluss**

In der vorliegenden Untersuchung demonstrieren wir *in vitro* mit der Hemmung der chemotaktisch getriggerten Neutrophilenmigration und der Beschleunigung der durch LPS verzögerten Neutrophilenapoptose zwei Mechanismen, über welche IVIG die gewebeschädigenden Effekte von Neutrophilen auf die glomeruläre Barriere verhindern und somit vor LPS-induzierter Nierenschädigung und Albuminurie schützen. Wir schlagen vor, dass diese Effekte wesentlich über eine Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs vermittelt werden, da wir in unseren Experimenten zeigen konnten, dass IVIG die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Neutrophilen hemmen. Zudem aktivieren IVIG die MAPK ERK und p38 in Neutrophilen und führen zur Steigerung der intrazellulären ROS Produktion, die von anderen Arbeitsgruppen mit erhöhter Neutrophilenapoptose in Zusammenhang gebracht wurde, was eine alternative Erklärung für die proapoptischen Effekte von IVIG auf Neutrophile darstellt.

IVIG waren *in vivo* bei therapeutischer Applikation 2 h nach LPS-Gabe wirksam. Die Migration von Neutrophilen durch das Endothel bedarf einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen, welche das feste Anhaften der Neutrophilen erst möglich machen. Die Migration in das subendotheliale Bindegewebe kann folglich erst mehrere Stunden nach LPS-Gabe erfolgen, während die Anschaltung von Signaltransduktionswegen, die Freisetzung von Sauerstoffradikalen oder die Degranulation von Neutrophilenproteasen bereits kurz nach LPS-Gabe erfolgen. Die Apoptose von Neutrophilen ist ebenfalls ein mehrere Stunden andauernder Prozess und einem therapeutischen Eingriff daher gut zugänglich.

Da Endotoxämie entscheidend zur Pathogenese von SIRS und Sepsis beiträgt und die LPS-bedingte Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems, einschließlich der Neutrophilen, außer mit der akuten Nierenschädigung auch mit einer akuten Lungenschädigung assoziiert ist, könnten IVIG somit auch vor anderen Organdysfunktionen im Rahmen von SIRS und Sepsis schützen.

In vivo zeigten präliminäre Daten, dass Neutrophile kausal in der Entstehung der LPS-induzierten akuten Nierenschädigung involviert sind, dass IVIG vor LPS-induzierter akuter Nierenschädigung schützen, indem sie eine Reduktion des Neutrophileninflux in die Glomeruli und eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung bewirken. Diese Befunde deuten gemeinsam mit den hier vorgestellten Daten darauf hin, dass IVIG über eine Hemmung von NF- $\kappa$ B vor neutrophilenvermittelter Nierenschädigung schützen, indem sie die Lebensdauer der Neutrophilen verringern und zudem die Extravasation der Neutrophilen in die Glomeruli verhindern. Da ein akutes Nierenversagen die Prognose septischer Patienten extrem verschlechtert, ist es von dringendem Forschungsinteresse, wirksame therapeutische Maßnahmen zu etablieren, welche diese Nierenschädigung verhindern. IVIG sind eine nebenwirkungsarme Präparation von gepoolten IgG-Immunglobulinen und stellen eine Option für die Therapie des akuten Nierenversagens im Rahmen der Sepsis dar.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, Schorr C, Artigas A, Ramsay G, Beale R, Parker MM, Gerlach H, Reinhart K, Silva E, Harvey M, Regan S, Angus DC, Surviving Sepsis C. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Crit Care Med* 2010;38:367-74.
2. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med* 2013;41:1167-74.
3. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801-10.
4. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive care medicine* 1996;22:707-10.
5. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, International Sepsis Definitions C. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive care medicine* 2003;29:530-8.
6. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, Angus DC, Rubenfeld GD, Singer M, Sepsis Definitions Task F. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:775-87.
7. Jeukendrup AE, Vet-Joop K, Sturk A, Stegen JH, Senden J, Saris WH, Wagenmakers AJ. Relationship between gastro-intestinal complaints and endotoxaemia, cytokine release and the acute-phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men. *Clinical science* 2000;98:47-55.
8. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *The American journal of clinical nutrition* 2007;86:1286-92.
9. Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, Schratzberger P, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study. *Journal of the American College of Cardiology* 1999;34:1975-81.
10. Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med* 2004;351:159-69.

11. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K, Investigators EIGo. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama* 2009;302:2323-9.
12. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-54.
13. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 2010;11:373-84.
14. van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *The Lancet Infectious diseases* 2008;8:32-43.
15. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, Horwood N, Nanchahal J. Alarmins: awaiting a clinical response. *The Journal of clinical investigation* 2012;122:2711-9.
16. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010;10:826-37.
17. von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku CL, Chrabieh M, Mustapha IB, Ghandil P, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Sirvent N, Guedes M, Vitor AB, Herrero-Mata MJ, Arostegui JI, Rodrigo C, Alsina L, Ruiz-Ortiz E, Juan M, Fortuny C, Yague J, Anton J, Pascal M, Chang HH, Janniere L, Rose Y, Garty BZ, Chapel H, Issekutz A, Marodi L, Rodriguez-Gallego C, Banchereau J, Abel L, Li X, Chaussabel D, Puel A, Casanova JL. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 2008;321:691-6.
18. Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, Chrabieh M, Issekutz AC, Cunningham CK, Gallin J, Holland SM, Roifman C, Ehl S, Smart J, Tang M, Barrat FJ, Levy O, McDonald D, Day-Good NK, Miller R, Takada H, Hara T, Al-Hajjar S, Al-Ghoniaim A, Speert D, Sanlaville D, Li X, Geissmann F, Vivier E, Marodi L, Garty BZ, Chapel H, Rodriguez-Gallego C, Bossuyt X, Abel L, Puel A, Casanova JL. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *The Journal of experimental medicine* 2007;204:2407-22.
19. Lamkanfi M. Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat Rev Immunol* 2011;11:213-20.
20. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nature medicine* 2007;13:1042-9.
21. Meziani F, Delabranche X, Asfar P, Toti F. Bench-to-bedside review: circulating microparticles--a new player in sepsis? *Critical care* 2010;14:236.
22. Hager M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *Journal of internal medicine* 2010;268:25-34.

23. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992;80:2012-20.
24. Kim MH, Granick JL, Kwok C, Walker NJ, Borjesson DL, Curry FR, Miller LS, Simon SI. Neutrophil survival and c-kit(+)-progenitor proliferation in *Staphylococcus aureus*-infected skin wounds promote resolution. *Blood* 2011;117:3343-52.
25. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31:S195-9.
26. Nathens AB, Bitar R, Davreux C, Bujard M, Marshall JC, Dackiw AP, Watson RW, Rotstein OD. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1997;17:608-16.
27. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1334-49.
28. Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, Maunder RJ, Cockrill BA, Hudson LD. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994;150:113-22.
29. Ho JS, Buchweitz JP, Roth RA, Ganey PE. Identification of factors from rat neutrophils responsible for cytotoxicity to isolated hepatocytes. *J Leukoc Biol* 1996;59:716-24.
30. Heinzelmann M, Mercer-Jones MA, Passmore JC. Neutrophils and renal failure. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 1999;34:384-99.
31. Kubes P, Hunter J, Granger DN. Ischemia/reperfusion-induced feline intestinal dysfunction: importance of granulocyte recruitment. *Gastroenterology* 1992;103:807-12.
32. Wartiovaara J, Ofverstedt LG, Khoshnoodi J, Zhang J, Makela E, Sandin S, Ruotsalainen V, Cheng RH, Jalanko H, Skoglund U, Tryggvason K. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *The Journal of clinical investigation* 2004;114:1475-83.
33. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular cell* 1998;1:575-82.
34. Kalluri R. Proteinuria with and without renal glomerular podocyte effacement. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2006;17:2383-9.
35. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley KV. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013;304:F333-47.
36. Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiological reviews* 2008;88:451-87.

37. Daehn I, Casalena G, Zhang T, Shi S, Fenninger F, Barasch N, Yu L, D'Agati V, Schlondorff D, Kriz W, Haraldsson B, Bottinger EP. Endothelial mitochondrial oxidative stress determines podocyte depletion in segmental glomerulosclerosis. *The Journal of clinical investigation* 2014;124:1608-21.
38. Daniels BS, Hauser EB, Deen WM, Hostetter TH. Glomerular basement membrane: in vitro studies of water and protein permeability. *The American journal of physiology* 1992;262:F919-26.
39. Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD. Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F579-96.
40. Rostgaard J, Qvortrup K. Sieve plugs in fenestrae of glomerular capillaries--site of the filtration barrier? *Cells, tissues, organs* 2002;170:132-8.
41. Ciarimboli G, Hjalmarsson C, Bokenkamp A, Schurek HJ, Haraldsson B. Dynamic alterations of glomerular charge density in fixed rat kidneys suggest involvement of endothelial cell coat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F722-30.
42. Jeansson M, Haraldsson B. Glomerular size and charge selectivity in the mouse after exposure to glucosaminoglycan-degrading enzymes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2003;14:1756-65.
43. Jeansson M, Haraldsson B. Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F1111-6.
44. Lijnen HR, Collen D. Endothelium in hemostasis and thrombosis. *Progress in cardiovascular diseases* 1997;39:343-50.
45. Gitay-Goren H, Soker S, Vlodaysky I, Neufeld G. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *The Journal of biological chemistry* 1992;267:6093-8.
46. Damiano ER. The effect of the endothelial-cell glycocalyx on the motion of red blood cells through capillaries. *Microvascular research* 1998;55:77-91.
47. Julian BA, Novak J. IgA nephropathy: an update. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2004;13:171-9.
48. Jeansson M, Granqvist AB, Nystrom JS, Haraldsson B. Functional and molecular alterations of the glomerular barrier in long-term diabetes in mice. *Diabetologia* 2006;49:2200-9.
49. Grams ME, Astor BC, Bash LD, Matsushita K, Wang Y, Coresh J. Albuminuria and estimated glomerular filtration rate independently associate with acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2010;21:1757-64.
50. Cullen MR, Jhanji S, Pearse RM, Fitzgibbon MC. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and albuminuria as predictors of acute kidney injury in patients treated with goal-

- directed haemodynamic therapy after major abdominal surgery. *Annals of clinical biochemistry* 2014;51:392-9.
51. Koyner JL, Garg AX, Coca SG, Sint K, Thiessen-Philbrook H, Patel UD, Shlipak MG, Parikh CR, Consortium T-A. Biomarkers predict progression of acute kidney injury after cardiac surgery. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012;23:905-14.
  52. Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat Rev Immunol* 2013;13:176-89.
  53. Ballou M. Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2002;109:581-91.
  54. Cines DB, Bussel JB. How I treat idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Blood* 2005;106:2244-51.
  55. Imbach P, Barandun S, d'Apuzzo V, Baumgartner C, Hirt A, Morell A, Rossi E, Schoni M, Vest M, Wagner HP. High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet* 1981;1:1228-31.
  56. Oates-Whitehead RM, Baumer JH, Haines L, Love S, Maconochie IK, Gupta A, Roman K, Dua JS, Flynn I. Intravenous immunoglobulin for the treatment of Kawasaki disease in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2003:CD004000.
  57. Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H. Intravenous immunoglobulin therapy for autoimmune diseases. *Autoimmunity* 2009;42:553-60.
  58. Kivity S, Katz U, Daniel N, Nussinovitch U, Papageorgiou N, Shoenfeld Y. Evidence for the use of intravenous immunoglobulins--a review of the literature. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2010;38:201-69.
  59. Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2001;345:747-55.
  60. Alejandria MM, Lansang MA, Dans LF, Mantaring JB. Intravenous immunoglobulin for treating sepsis, severe sepsis and septic shock. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;9:CD001090.
  61. Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Grundling M, John S, Kern W, Kreymann G, Kruger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stuber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T, German Sepsis S, German Interdisciplinary Association of Intensive C, Emergency M. Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). *Ger Med Sci* 2010;8:Doc14.

62. Fachinformation Gammagard S/D Zulassungsnummer 186a/92. Baxter Deutschland GmbH 2013.
63. Kuitwaard K, de Gelder J, Tio-Gillen AP, Hop WC, van Gelder T, van Toorenenbergen AW, van Doorn PA, Jacobs BC. Pharmacokinetics of intravenous immunoglobulin and outcome in Guillain-Barre syndrome. *Annals of neurology* 2009;66:597-603.
64. Debre M, Bonnet MC, Fridman WH, Carosella E, Philippe N, Reinert P, Vilmer E, Kaplan C, Teillaud JL, Griscelli C. Infusion of Fc gamma fragments for treatment of children with acute immune thrombocytopenic purpura. *Lancet* 1993;342:945-9.
65. Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* 2001;291:484-6.
66. Sapis T, Shoenfeld Y. Facing the enigma of immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulin. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2005;29:185-99.
67. Ichiyama T, Ueno Y, Isumi H, Niimi A, Matsubara T, Furukawa S. An immunoglobulin agent (IVIG) inhibits NF-kappaB activation in cultured endothelial cells of coronary arteries in vitro. *Inflamm Res* 2004;53:253-6.
68. Ichiyama T, Ueno Y, Hasegawa M, Niimi A, Matsubara T, Furukawa S. Intravenous immunoglobulin inhibits NF-kappaB activation and affects Fc gamma receptor expression in monocytes/macrophages. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;369:428-33.
69. Rossi F, Kazatchkine MD. Antiidiotypes against Autoantibodies in Pooled Normal Human Polyspecific Ig. *Journal of Immunology* 1989;143:4104-9.
70. Krause I, Blank M, Kopolovic J, Afek A, Goldberg I, Tomer Y, Shoenfeld Y. Abrogation of Experimental Systemic Lupus-Erythematosus and Primary Antiphospholipid Syndrome with Intravenous Gamma-Globulin. *J Rheumatol* 1995;22:1068-74.
71. Caccavo D, Vaccaro F, Ferri GM, Amoroso A, Bonomo L. Antiidiotypes against Antiphospholipid Antibodies Are Present in Normal Polyspecific Immunoglobulins for Therapeutic Use. *Journal of autoimmunity* 1994;7:537-48.
72. Rossi F, Jayne DR, Lockwood CM, Kazatchkine MD. Anti-idiotypes against anti-neutrophil cytoplasmic antigen autoantibodies in normal human polyspecific IgG for therapeutic use and in the remission sera of patients with systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1991;83:298-303.
73. Altnauer F, von Gunten S, Spath P, Simon HU. Concurrent presence of agonistic and antagonistic anti-CD95 autoantibodies in intravenous Ig preparations. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2003;112:1185-90.
74. Prasad NK, Papoff G, Zeuner A, Bonnin E, Kazatchkine MD, Ruberti G, Kaveri SV. Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway. *J Immunol* 1998;161:3781-90.

75. Viard I, Wehrli P, Bullani R, Schneider P, Holler N, Salomon D, Hunziker T, Saurat JH, Tschopp J, French LE. Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science* 1998;282:490-3.
76. Barron SJ, Del Vecchio MT, Aronoff SC. Intravenous immunoglobulin in the treatment of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: a meta-analysis with meta-regression of observational studies. *International journal of dermatology* 2014.
77. Lapointe BM, Herx LM, Gill V, Metz LM, Kubes P. IVIg therapy in brain inflammation: etiology-dependent differential effects on leucocyte recruitment. *Brain : a journal of neurology* 2004;127:2649-56.
78. Wadhwa M, Meager A, Dilger P, Bird C, Dolman C, Das RG, Thorpe R. Neutralizing antibodies to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-1alpha and interferon-alpha but not other cytokines in human immunoglobulin preparations. *Immunology* 2000;99:113-23.
79. Toungouz M, Denys C, Dupont E. Blockade of proliferation and tumor necrosis factor-alpha production occurring during mixed lymphocyte reaction by interferon-gamma-specific natural antibodies contained in intravenous immunoglobulins. *Transplantation* 1996;62:1292-6.
80. Sherer Y, Wu R, Krause I, Gorstein A, Levy Y, Peter JB, Shoenfeld Y. Cytokine levels in various intravenous immunoglobulin (IVIg) preparations. *Human antibodies* 2001;10:51-3.
81. Teeling JL, De Groot ER, Eerenberg AJ, Bleeker WK, Van Mierlo G, Aarden LA, Hack CE. Human intravenous immunoglobulin (IVIg) preparations degranulate human neutrophils in vitro. *Clin Exp Immunol* 1998;114:264-70.
82. Jarius S, Eichhorn P, Albert MH, Wagenpfeil S, Wick M, Belohradsky BH, Hohlfeld R, Jenne DE, Voltz R. Intravenous immunoglobulins contain naturally occurring antibodies that mimic antineutrophil cytoplasmic antibodies and activate neutrophils in a TNFalpha-dependent and Fc-receptor-independent way. *Blood* 2007;109:4376-82.
83. Takeshita S, Tsujimoto H, Nakatani K. Intravenous immunoglobulin preparations promote apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils via an oxygen-dependent pathway in vitro. *APMIS* 2005;113:269-77.
84. Casulli S, Topçu S, Fattoum L, von Gunten S, Simon HU, Teillaud JL, Bayry J, Kaveri SV, Elbim C. A differential concentration-dependent effect of IVIg on neutrophil functions: relevance for anti-microbial and anti-inflammatory mechanisms. *PLoS One* 2011;6:e26469.
85. von Gunten S, Schaub A, Vogel M, Stadler BM, Miescher S, Simon HU. Immunologic and functional evidence for anti-Siglec-9 autoantibodies in intravenous immunoglobulin preparations. *Blood* 2006;108:4255-9.
86. Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magrenat L, Suter T, Becher B. RORgammaT drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature immunology* 2011;12:560-7.

87. Matsuda A, Morita H, Unno H, Saito H, Matsumoto K, Hirao Y, Munechika K, Abe J. Anti-inflammatory effects of high-dose IgG on TNF- $\alpha$ -activated human coronary artery endothelial cells. *Eur J Immunol* 2012;42:2121-31.
88. Choi M, Salanova B, Rolle S, Wellner M, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. Short-term heat exposure inhibits inflammation by abrogating recruitment of and nuclear factor- $\kappa$ B activation in neutrophils exposed to chemotactic cytokines. *The American journal of pathology* 2008;172:367-777.
89. Choi M, Rolle S, Wellner M, Cardoso MC, Scheidereit C, Luft FC, Kettritz R. Inhibition of NF- $\kappa$ B by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood* 2003;102:2259-67.
90. van Meurs M, Kurniati NF, Wulfert FM, Asgeirsdottir SA, de Graaf IA, Satchell SC, Mathieson PW, Jongman RM, Kumpers P, Zijlstra JG, Heeringa P, Molema G. Shock-induced stress induces loss of microvascular endothelial Tie2 in the kidney which is not associated with reduced glomerular barrier function. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297:F272-81.
91. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS letters* 2001;487:318-22.
92. Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, Pryde JG, Fujihara S, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG. NF- $\kappa$ B activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:4309-18.
93. Francois S, El Benna J, Dang PM, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidal MA, Elbim C. Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF- $\kappa$ B signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol* 2005;174:3633-42.
94. Parsey MV, Kaneko D, Shenkar R, Abraham E. Neutrophil apoptosis in the lung after hemorrhage or endotoxemia: apoptosis and migration are independent of interleukin-1 $\beta$ . *Chest* 1999;116:67S-8S.
95. von Gunten S, Simon HU. Cell death modulation by intravenous immunoglobulin. *Journal of clinical immunology* 2010;30 Suppl 1:S24-30.
96. Aoyama-Ishikawa M, Seishu A, Kawakami S, Maeshige N, Miyoshi M, Ueda T, Usami M, Nakao A, Kotani J. Intravenous immunoglobulin-induced neutrophil apoptosis in the lung during murine endotoxemia. *Surg Infect (Larchmt)* 2014;15:36-42.
97. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532-5.
98. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, Papayannopoulos V. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature immunology* 2014;15:1017-25.

99. Cloutier A, Ear T, Blais-Charron E, Dubois CM, McDonald PP. Differential involvement of NF-kappaB and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2007;81:567-77.
100. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:320-44.
101. McLeish KR, Knall C, Ward RA, Gerwins P, Coxon PY, Klein JB, Johnson GL. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF. *J Leukoc Biol* 1998;64:537-45.
102. Tandon R, Sha'afi RI, Thrall RS. Neutrophil beta2-integrin upregulation is blocked by a p38 MAP kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:858-62.
103. Ward RA, Nakamura M, McLeish KR. Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 mitogen-activated protein kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome b558-containing granules. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:36713-9.
104. Murakami K, Suzuki C, Kobayashi F, Nakano A, Fujii A, Sakai K, Imada T. Intravenous immunoglobulin preparation attenuates LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines in human monocytic cells by modulating TLR4-mediated signaling pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2012;385:891-8.
105. Zhou C, Huang M, Xie L, Shen J, Xiao T, Wang R. IVIG inhibits TNF-alpha-induced MMP9 expression and activity in monocytes by suppressing NF-kappaB and P38 MAPK activation. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:15879-86.
106. Schreiber A, Luft FC, Kettritz R. Phagocyte NADPH oxidase restrains the inflammasome in ANCA-induced GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2015;26:411-24.
107. Lawton JW, Robinson JP, Till GO. The effect of intravenous immunoglobulin on the in vitro function of human neutrophils. *Immunopharmacology* 1989;18:97-105.
108. Higurashi S, Machino Y, Suzuki E, Suzuki M, Kohroki J, Masuho Y. Both the Fab and Fc domains of IgG are essential for ROS emission from TNF-alpha-primed neutrophils by IVIG. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;417:794-9.
109. Rollet-Labelle E, Grange MJ, Elbim C, Marquetty C, Gougerot-Pocidalo MA, Pasquier C. Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis. *Free Radic Biol Med* 1998;24:563-72.
110. Issekutz AC, Rowter D, Macmillan HF. Intravenous immunoglobulin G (IVIG) inhibits IL-1- and TNF-alpha-dependent, but not chemotactic-factor-stimulated, neutrophil transendothelial migration. *Clin Immunol* 2011;141:187-96.
111. Diener KR, Al-Dasooqi N, Lousberg EL, Hayball JD. The multifunctional alarmin HMGB1 with roles in the pathophysiology of sepsis and cancer. *Immunol Cell Biol* 2013;91:443-50.

112. Berthelot F, Fattoum L, Casulli S, Gozlan J, Marechal V, Elbim C. The effect of HMGB1, a damage-associated molecular pattern molecule, on polymorphonuclear neutrophil migration depends on its concentration. *J Innate Immun* 2012;4:41-58.
113. Huang W, Tang Y, Li L. HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis. *Cytokine* 2010;51:119-26.
114. Penzo M, Molteni R, Suda T, Samaniego S, Raucci A, Habel DM, Miller F, Jiang HP, Li J, Pardi R, Palumbo R, Olivetto E, Kew RR, Bianchi ME, Marcu KB. Inhibitor of NF-kappa B kinases alpha and beta are both essential for high mobility group box 1-mediated chemotaxis [corrected]. *J Immunol* 2010;184:4497-509.
115. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol* 2011;6:19-48.
116. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002;420:885-91.
117. Xu C, Chang A, Hack BK, Eadon MT, Alper SL, Cunningham PN. TNF-mediated damage to glomerular endothelium is an important determinant of acute kidney injury in sepsis. *Kidney Int* 2014;85:72-81.
118. Liang Y, Li X, Zhang X, Li Z, Wang L, Sun Y, Liu Z, Ma X. Elevated levels of plasma TNF-alpha are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Shock* 2014;41:275-81.
119. Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med* 2001;29:S21-7.
120. Mutunga M, Fulton B, Bullock R, Batchelor A, Gascoigne A, Gillespie JI, Baudouin SV. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;163:195-200.
121. Jersmann HP, Hii CS, Ferrante JV, Ferrante A. Bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha synergistically increase expression of human endothelial adhesion molecules through activation of NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Infection and immunity* 2001;69:1273-9.
122. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1995;9:899-909.
123. Zhao B, Bowden RA, Stavchansky SA, Bowman PD. Human endothelial cell response to gram-negative lipopolysaccharide assessed with cDNA microarrays. *American journal of physiology Cell physiology* 2001;281:C1587-95.

## Anhang

Ergänzungen zu 4. Materialien und Methoden – Lösungen und Puffer:

### Natriumacetat-Essigsäurepuffer pH 4,0 - 0,1M

Natriumacetat-Anhydrat (Sigma)	1,24 g
Essigsäure (Carl Roth)	4,86 ml
Aqua dest	ad 1000 ml

### 2 M Tris-Base

Tris (Carl Roth)	6,06g
Aqua dest	Ad 25ml

### Puffer A

HEPES 1M pH 7,5	100 µl
EDTA 0,5M pH 8	2 µl
EGTA 0,2M	5 µl
KCl 3M	33,3 µl
Aqua dest	9,87 ml

### Bäuerle-Puffer

20mM HEPES pH 7.9	4 ml
350mM NaCl	14 ml
20% Glycerol	40 ml
1mM MgCl <sub>2</sub>	200 µl
0.5mM EDTA	200 µl
0.1 mM EGTA	200 µl
1% NP-40	2 ml
Aqua dest	Ad 200 ml

### Protease Inhibitor Mix

Quercetin 0,05M in 1M NaOH	40 µl
Leupeptin 4°C 5mg/ml in Aqua dest	40 µl
Aprotinin 4°C 5mg/ml in Aqua dest	40 µl

Iodoacetamid 4°C 0,5M in Aqua dest	200 µl
Aqua dest.	80 µl

### Stammlösungen für die Lysepuffer

- Pepstatin A 1mg/ml in 96% Ethanol
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 200mM = 34,84mg/ml in Isopropanol
- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100mM in Aqua dest
- NaF 50mg/ml = 1,2M in Aqua dest
- Benzamidine 200mM = 31,3mg/ml in Aqua dest
- AEBSF 100mM = 23,97mg/ml in Aqua dest
- Dithiothreitol (DTT) 100mM = 15,42 mg/ml in Aqua dest
- Diisopropylfluorophosphat (DFP) 250mM in Isopropanol

### 2x Lysepuffer

2M Tris/HCL pH 8,8	1 ml
5M NaCl	2,76 ml
50% Glycerol	20 ml
0,5M EDTA	0,4 ml
Triton-X-100	1 ml
Aqua dest	Ad 50 ml

### Lysepuffer-PMN-IKB

Puffer A	480,3 µl
AEBSF	5 µl
Protease Inhibitor Mix (s.o.)	1 µl
Pepstatin A	1 µl
Benzamidine	1,25 µl
Dithiothreitol (DTT)	5 µl
Diisopropylfluorophosphat (DFP)	4 µl
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	2,5 µl

### Lysepuffer-PMN-pERK/p38

2 x Lysepuffer	250 µl
Protease Inhibitor Mix (s.o.)	10 µl
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1,5 µl

NaF	8,4 µl
Phenylmethanolsulfonylfluorid (PMSF)	5 µl
NP40 10%	50 µl
AEBSF	1,25 µl
Pepstatin A	1 µl
Dithiothreitol (DTT)	5 µl
Diisopropylfluorophosphat (DFP)	4 µl
Benzamidine	1,25 µl
Aqua dest.	162,6 µl

Endothelzell-Lysepuffer

Bäuerle-Puffer	950 µl
25 x cOmplete™ Lysis-M (Sigma Aldrich)	40 µl
DTT	10 µl

Trenngel 10%-SDS-Polyacrylamidgel

30 % Acrylamid (BioRad)	5 ml
1,5M Tris-HCl pH 8,8 (siehe 2.1.10)	3,8 ml
10% SDS (siehe 2.1.10)	150 µl
10% AMPS (siehe 2.1.10)	150 µl
TEMED (Biorad)	15 µl
Aqua dest	5,9 ml

Sammelgel 10%-SDS-Polyacrylamidgel

30 % Acrylamid (BioRad)	0,85 ml
1,5M Tris-HCl pH 8,8 (siehe 2.1.10)	0,3125 ml
10% SDS (siehe 2.1.10)	50 µl
10% AMPS (siehe 2.1.10)	50 µl
TEMED (Biorad)	5 µl
Aqua dest	3,4 ml

6x Ladepuffer für Western Blotting - nicht-reduzierend

1M Tris HCl pH 6,8	3,5 ml
SDS	1 g
Glycerol	3,6 ml
1% Bromphenolblau	200 µl
Aqua dest	9,5 ml

6x Ladepuffer + 10% beta-Mercaptoethanol für Western Blotting - reduzierend

6 x Ladepuffer	900 µl
b-Mercaptoethanol	100 µl

Annexin-V-Bindungspuffer

10 x Annexin-V-Binding-Buffer (BD Biosciences)	1ml
Aqua dest.	9ml

RPMI-Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin

RPMI (Biochrom)	445ml
FCS (Biochrom)	50ml
Penicillin Streptomycin (Biochrom)	5ml

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Bilgin Osmanodja, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die immunmodulatorischen Effekte intravenöser Immunglobuline auf Neutrophile und Endothelzellen im LPS-induzierten Nierenversagen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum 23.07.2018

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

PD Dr. med. Mira Choi gilt mein allergrößter Dank für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, für die ständige Bereitschaft, Fragen oder Probleme zu klären, sowie für die tatkräftige Unterstützung bei den Experimenten und der Erstellung der Dissertation. Darüber hinaus danke ich insbesondere für ihren langen Atem bei der Korrektur der Arbeit.

Prof. Dr. Ralph Kettritz danke ich für die ausführliche Beratung bei der Themenfindung, für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können und für die stetige Begleitung meiner Forschungsbemühungen.

Mein besonderer Dank gilt Susanne Rolle für die geduldigen Hilfestellungen in jeder Phase meiner Doktorarbeit und für die Mithilfe bei Experimenten und Auswertungen. Insbesondere danke ich ihr für die Präparation und Kultivierung der HUVECs.

Hanna Schmidt danke ich für die kontinuierliche Einarbeitung in den ersten Monaten und für das geduldige und verständliche Erklären der wichtigsten Laborarbeiten. Auch ihr danke ich für die Durchführung der Zellkultur.

Sylvia Krüger, Dr. Claudia Eulenberg, Dr. Uwe Jerke und PD Dr. med. Adrian Schreiber danke ich für zahlreiche Hilfestellungen und Erklärungen sowie die freundliche, familiäre Arbeitsatmosphäre.

Ich danke allen Blutspenderinnen und Blutspendern.