

**Einfluss der Isolierung und Lagerung der neutrophilen
Granulozyten auf ihre Funktion**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu
Tübingen**

vorgelegt von

Beck, Volker Bernd

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Bruchelt

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Fierlbeck

Für meine Familie und meine Freundin Chiara.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Abkürzungsverzeichnis..... | vii |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Der neutrophile Granulozyt..... | 2 |
| 1.1.1 Reifung und Freisetzung aus dem Knochenmark | 7 |
| 1.1.2 Der Weg zum Entzündungsort – die Leukodiapedese | 10 |
| 1.1.2.1 „Leukocyte rolling“ und Adhäsion..... | 11 |
| 1.1.2.2 Die transendotheliale Migration | 14 |
| 1.1.2.3 Die parazelluläre Zellmigration | 15 |
| 1.1.2.4 Die transzelluläre Zellmigration..... | 15 |
| 1.1.3 Chemotaxis | 16 |
| 1.1.4 Phagozytose und „killing“ der Mikroorganismen | 18 |
| 1.1.4.1 „Killing“ und „oxidativer burst“ | 19 |
| 1.1.4.2 „Killing-Modell“ nach Reeves | 26 |
| 1.1.5 „Neutrophil Extrazellular Traps“ (NETs) | 28 |
| 1.1.6 Aspekte im Rahmen der Apoptose neutrophiler Granulozyten | 35 |
| 1.1.6.1 Apoptose – Allgemein | 35 |
| 1.1.6.2 Aspekte der Neutrophilen-Apoptose | 38 |
| 1.1.6.3 Das anti-inflammatorische Potenzial apoptotischer neutrophiler Granulozyten | 42 |
| 1.1.7 Variable Immunrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten | 43 |
| 1.1.8 Myeloide Suppressorzellen und Tumor-induzierte Immunsuppression | 44 |
| 2 Material und Methoden | 47 |
| 2.1 Material..... | 47 |
| 2.1.1 Chemikalien..... | 47 |
| 2.1.2 Enzyme | 48 |
| 2.1.3 Geräte | 48 |
| 2.1.4 Verbrauchsmaterialien | 49 |
| 2.1.5 Zelllinien | 50 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.1.6 | Antikörper | 50 |
| 2.1.7 | Zellkulturmedien und Zusätze | 51 |
| 2.2 | Methoden..... | 53 |
| 2.2.1 | Blutentnahme | 53 |
| 2.2.2 | Gewinnung und Isolierung der Granulozyten aus Vollblut | 53 |
| 2.2.3 | Analyse des Differentialblutbildes und der isolierten neutrophilen Granulozyten mit Hilfe des ADVIA 120 der Fa. Siemens | 55 |
| 2.2.3.1 | Der Peroxidase-Kanal..... | 55 |
| 2.2.3.2 | Der Baso-Kanal..... | 58 |
| 2.2.3.3 | Degranulation..... | 59 |
| 2.2.4 | Glykogenbestimmung neutrophiler Granulozyten | 61 |
| 2.2.5 | Bestimmung des Glukose- und Laktat-Gehalts mittels Photometrie | 65 |
| 2.2.5.1 | Laktatbestimmung..... | 65 |
| 2.2.5.2 | Glukosebestimmung | 67 |
| 2.2.6 | Bestimmung des ATP-Gehalts von neutrophilen Granulozyten mittels Biolumineszenz | 68 |
| 2.2.7 | Messung des "oxidativen bursts" mit Hilfe der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz | 71 |
| 2.2.8 | Rolle von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) bei neutrophilen Granulozyten bei der „antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity“ (ADCC) gegenüber Neuroblastomzellen | 77 |
| 2.2.8.1 | Allgemeines zum Arbeiten mit Zellkulturen..... | 77 |
| 2.2.8.1.1 | Kultivierung von Zellen | 78 |
| 2.2.8.1.2 | Subkultivierung der Zellen..... | 78 |
| 2.2.8.1.3 | Bestimmung der Zellzahl..... | 78 |
| 2.2.8.1.4 | Einfrieren der Zellen | 79 |
| 2.2.8.2 | Messung des "oxidativen bursts" mit Hilfe der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz in Assoziation mit der ADCC-Reaktion neutrophiler Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen | 80 |
| 2.2.8.3 | ADCC..... | 82 |
| 2.2.8.3.1 | BATDA-Release-Assay („Europium-Assay“) im Rahmen der ADCC-Reaktion neutrophiler Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen | 82 |
| 2.2.8.3.2 | Einfluss einer Granulozyten-Vorinkubation mit Biobran® auf den BATDA-Release-Assay („Europium-Assay“) im Rahmen | |

| | |
|--|-----------|
| der ADCC-Reaktion neutrophiler Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen | 89 |
| 3 Ergebnisse..... | 91 |
| 3.1 Charakterisierung der isolierten Granulozyten | 91 |
| 3.1.1 Analyse des Differentialblutbildes im Vollblut und nach Histopaque-Isolierung der Granulozyten mit Hilfe des ADVIA 120 der Fa. Siemens | 91 |
| 3.1.2 Charakterisierung der isolierten, nicht aktivierten Granulozyten während 0 bis 24-stündiger Lagerung..... | 93 |
| 3.1.2.1 Verlauf der Degranulation | 93 |
| 3.1.2.2 Veränderungen des Glykogengehaltes in neutrophilen Granulozyten nach verschieden langen Lagerungszeiten..... | 96 |
| 3.1.2.3 Glukoseverbrauch und Laktatproduktion während der Lagerung | 98 |
| 3.1.2.4 Veränderung des ATP-Gehaltes isolierter Granulozyten unter verschiedenen Inkubationsbedingungen..... | 101 |
| 3.1.2.4.1 Die zeitabhängige Änderung der ATP-Konzentration in unstimulierten Granulozyten | 102 |
| 3.1.2.4.2 Die zeitabhängige Änderung der ATP-Konzentration isolierter Granulozyten nach Phagozytose von opsonisiertem Zymosan | 103 |
| 3.1.2.5 Die lagerungsabhängige Bildung von ROS in isolierten Granulozyten nach Phagozytose von opsonisiertem Zymosan..... | 105 |
| 3.1.2.5.1 Einfluss der Lagerung isolierter Granulozyten in glukosehaltigem PBS ⁺⁺ auf die Bildung von ROS..... | 106 |
| 3.1.2.6 Einfluss von G-CSF und GM-CSF auf verschiedene Parameter isolierter Granulozyten während der Lagerung | 108 |
| 3.1.2.6.1 Einfluss von GM-CSF auf den Glykogengehalt isolierter Granulozyten während der Lagerung | 108 |
| 3.1.2.6.2 Einfluss von G-CSF und GM-CSF auf den ATP-Gehalt während der Lagerung in unstimulierten Granulozyten | 109 |
| 3.1.2.6.3 Der Einfluss von G- und GM-CSF auf den ATP-Gehalt isolierter Granulozyten während der Lagerung nach Phagozytose von opsonisiertem Zymosan..... | 112 |
| 3.1.2.6.4 Einfluss einer Inkubation isolierter neutrophiler Granulozyten mit GM-CSF auf die Bildung von ROS | 114 |
| 3.1.2.6.5 Einfluss von GM-CSF auf den Degranulationszustand neutrophiler Granulozyten (Verlauf der Degranulation) | 117 |

| | |
|---|------------|
| 3.1.2.7 Einfluss von G-CSF, GM-CSF und Biobran® auf die ROS-Bildung nach Phagozytose von opsonisiertem Zymosan..... | 119 |
| 3.2 „Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity“ (ADCC) von Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen | 120 |
| 3.2.1 ADCC in Abwesenheit und Gegenwart von GM-CSF und G-CSF | 121 |
| 3.2.2 ADCC nach Vorbehandlung der Granulozyten mit Biobran®..... | 123 |
| 3.2.3 Rolle der ROS bei der ADCC-Reaktion..... | 125 |
| 3.2.3.1 Rolle von ROS bei der ADCC-Reaktion in Abwesenheit und Gegenwart von G-CSF und GM-CSF | 125 |
| 3.2.3.2 Rolle von ROS bei der ADCC-Reaktion in Gegenwart und Abwesenheit von Biobran®..... | 127 |
| 4 Diskussion | 129 |
| 5 Zusammenfassung | 137 |
| 6 Literaturverzeichnis | 140 |
| Erklärungen zum Eigenanteil..... | 156 |
| Danksagung..... | 157 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| Abk. | Abkürzung |
| ADCC | Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl.: antibody dependent cellular cytotoxicity) |
| AGS | Amyloglucosidase |
| AK | Antikörper |
| Apaf 1 | apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1 |
| ASM | saure Sphingomyelinase |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAK | Bcl-2 homologous antagonist killer |
| BATDA | Bis-Acetoxymethyl-2,2':6'2"-Terpyridine-6,6"-Dicarboxylid Acid |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 |
| BID | BH3-interacting domain death agonist |
| Bq | Becquerel |
| BSA | Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin |
| ca. | circa |
| Ca ⁺⁺ | Calcium |
| CDKs | Cyclin-abhängigen Kinasen (engl.: cyclin-dependent kinases) |
| CGD | Septische Granulomatose (engl.: chronic granulomatous disease) |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CDKs | Cyclin-abhängige Kinasen (engl.: cyclin-dependent kinases) |
| CL | Chemilumineszenz |
| CXCR4 | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 |
| DAG | Diacylglycerol |
| DC | Dendritische Zellen |
| DISC | Death inducing signaling complex |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig |
| DTNB | 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ENA-78 | Epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| engl. | Englisch |
| ESL-1 | E-Selektin-Liganden-1 |
| E:T-Verhältnis | Effektor-/Target-Verhältnis |
| etc. | et cetera |
| Fa. | Firma |
| f.c. | final concentration |
| FCS | Fetal Calve Serum |
| G-CSF | Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (engl.: granulocyte-colony stimulating factor) |
| GD ₂ | Gangliosid GD ₂ |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GM-CSF | Granulocyte macrophage colony-stimulating factor |
| GO | Glukose-Oxidase |
| G-6-P | Glukose-6-Phosphat |
| G-6-P-DH | Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase |
| GPCRs | G-Protein-gekoppelte Rezeptoren |
| GPT | Glutamat-Pyruvat-Transaminase |
| GPX | Glutathiooxidase |
| Gr. | Granulozyt(en) |
| GR | Glutathion-Reduktase |
| GSH | Glutathion (reduzierte Form) |
| GSSG | Glutathion (oxidierte Form) |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde(n) |
| Hb | Hämoglobin |
| HIF-1 α | Hypoxia-inducible transcription factor-1 α |
| HK | Hexokinase |
| ICAM | Intercellular adhesion molecule |
| IF- α | Interferon- α |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| IL | Interleukin |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| IU | Internationale Einheit |
| JAM-A | Junctional Adhesion Molecule A |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LFA-1 | Leukocyte function-associated molecule 1 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LTB ₄ | Leukotrien-B ₄ |
| LUC | large unstained cells |
| m | Meter |
| Mac-1 | Macrophage-1 antigen |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| Mcl-1 | Myeloid cell leukemia sequence 1 |
| MDSC | Myeloid Derived Suppressor Cells |
| Mg ⁺⁺ | Magnesium |
| MGN-3 | Biobran®; generischer Name |
| MMP | Matrix metalloproteinase |
| MNC | Mononukleäre Zellen |
| MPO | Myeloperoxidase |
| NAD ⁺ | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid |
| NADP ⁺ | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (oxidierte Form) |
| NADPH | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduzierte Form) |
| NE | Neutrophilen Elastase |
| NETs | „Neutrophil Extracellular Traps“ |
| NF-κB | Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' von aktivierten B-Zellen |
| NfMLP | N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin |
| NK-Zelle | natürliche Killerzelle |
| nm | Nanometer |
| NOX | NADPH-Oxidase |
| NRBCs | Non Red Blood Cells |
| opson. | opsonisiert |
| PAD-4 | Peptidylarginine-Deiminase-4 |
| PAF | Plättchenaktivierender Faktor (engl. platelet activating factor) |
| PBS | Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Saline) |
| PBS ⁺⁺ | Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Saline) mit Calcium und Magnesium |
| PECAM-1 | Platelet/Endothelial-cell Adhesion Molecule |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PIP3 | Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat |
| PLC-γ | Phospholipase C-γ |
| PMA | Phorbol-(12)-myristat-(13)-acetat |
| PMN | Polymorphkernige neutrophile Granulozyten |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| PSGL-1 | P-Selektin-Glykoprotein Ligand-1 |
| RAG1/2 | “Recombination activating genes“ 1 und 2 |
| RLU | relative Lichteinheiten (engl.: relative light units) |
| ROS | reaktive Sauerstoffverbindungen (engl.: reactive oxygen species) |
| rpm | round per minute |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| S.D. | Standard Deviation (Standardabweichung) |
| S1P | Sphingosin-1-phosphat |
| SOD | Superoxiddismutase |
| SSA | 5-Sulfosalicylsäure |
| SYK | Milztyrosinkinase (engl.: spleen tyrosine kinase) |
| TCR | T-Zell-Rezeptor |
| TGF- β | Transformierender Wachstumsfaktor β |
| TNF α | Tumornekrosefaktor- α |
| TNF-R1 | Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 |
| TRALI | Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (engl.: transfusion related acute lung injury) |
| Tregs | Regulatorische T-Zellen |
| U | Unit (Einheit) |
| u.a. | unter anderem |
| VCAM-1 | vascular cell adhesion molecule 1 |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| Zym. | Zymosan |
| μm | Mikrometer |

1 Einleitung

Im Gegensatz zu anderen Zellen des Immunsystems werden Granulozyten in der gängigen Fachliteratur eher bescheiden abgehandelt. Innerhalb der Leukozyten dominieren – insbesondere in onkologischer Hinsicht – T- und B-Zellen, Monozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), während die Granulozyten eine im Vergleich dazu eher marginale Rolle spielen. Ein verärgertes Autor hat sich sogar zur wahrscheinlich nicht ganz ernst gemeinten Formulierung hinreißen lassen, dass ein „T-Zell-Chauvinismus“ vorherrsche (Houghton and Lloyd, 1998).

Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren hat sich das Bild der neutrophilen Granulozyten als hauptsächliche Zelle der unspezifischen Immunabwehr deutlich erweitert und gewandelt. Deswegen soll im ersten Teil dieser Arbeit eine umfangreiche Darstellung des gegenwärtigen Wissensstandes über neutrophile Granulozyten gegeben werden.

Im zweiten – dem experimentellen Teil – werden eigene Untersuchungen mit isolierten Granulozyten beschrieben, die den Einfluss der Isolierung und Lagerung der neutrophilen Granulozyten auf ihre Funktion charakterisieren. Granulozyten sind äußerst labile Zellen. Deshalb wurde in einem ersten Abschnitt der Frage nachgegangen, wie lange isolierte Granulozyten für verschiedene Versuchszwecke eingesetzt werden können. Hierbei wurde der Einfluss der Isolierung und Lagerung der Zellen auf verschiedene Parameter und StoffwechsellLeistungen (Glykogen-, ATP-Status; Glukoseverbrauch und Laktatproduktion; Fähigkeit zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies etc.) untersucht, sowie hinsichtlich physiologischer Eigenschaften und Konsequenzen für die Anwendung in Testsystemen charakterisiert. So können dann auch erhaltene Versuchsergebnisse bei Verwendung von Granulozyten in Testsystemen kritischer beurteilt werden.

Abschließend wurden die Granulozyten in Pilotversuchen bezüglich verschiedener Aspekte im Rahmen der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (engl.: „antibody dependent cellular cytotoxicity“, ADCC) gegenüber Neuroblastomzellen charakterisiert.

1.1 Der neutrophile Granulozyt

Die Granulozyten bilden den weitaus größten Anteil der Leukozyten im zirkulierenden Blut (ca. 50-70%).

Die Granulozyten enthalten zahlreiche Lysosomen und Granula (Sekretionsvesikel) und können wiederum anhand dessen Morphologie und deren Anfärbeeigenschaft in eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten eingeteilt werden. Die neutrophilen Granulozyten werden aufgrund ihres segmentförmigen Kerns als polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) bezeichnet (siehe Abb. 1).

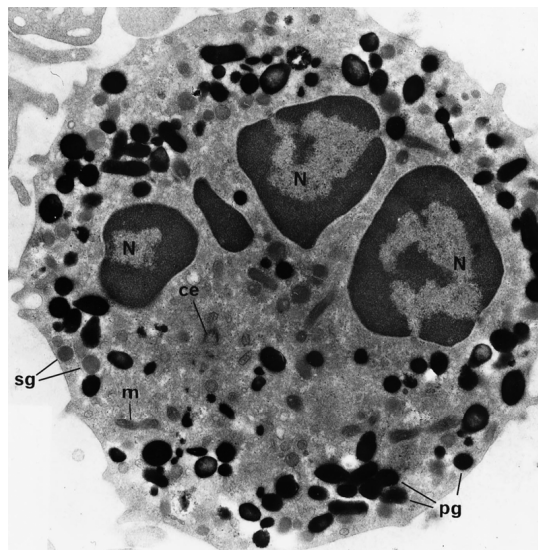


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines neutrophilen Granulozyten (aus Witko-Sarsat et al, 2000).

Abkürzungen (Abk.): pg=azurophile Granula, sg=spezifische Granula, N=Nukleus, ce=Centriole, m=Mitochondrium.

Neutrophile Granulozyten entstehen im Knochenmark durch Differenzierung aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Diese Stammzellen sind teilungsfähig und reifen unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren und den Zwischenstadien der Progenitorzellen zu sogenannten Precursor-Zellen aus. Mit der Entstehung der Myeloblasten aus den Precursorzellen verlieren die Neutrophilen ihre Teilungsfähigkeit. Aus dem Blastenstadium entwickelt sich über weitere Reifungsstadien der neutrophile Granulozyt.

Neutrophile Granulozyten sind wichtige Protagonisten der angeborenen Immunantwort mit der Fähigkeit zur Migration und Extravasation – einer notwendigen Voraussetzung zur Pathogenabwehr. Ihnen kommt die Aufgabe der Phagozytose und der Abtötung von Bakterien und anderen Mikroorganismen zu. Sie sind die ersten Zellen der Abwehr, die der Bekämpfung von Infektionen dienen, und sie sind – noch bevor es zu anderen Reaktionen des Immunsystems kommt – die ersten Zellen am Ort des Entzündungsgeschehens (Smith, 1994).

Die Bedeutung dieser Zellpopulation wird klar erkenntlich bei Patienten mit Neutropenie oder an Patienten, die gar an einer septischen Granulomatose leiden. Diese Patienten sind geradezu prädisponiert an bakteriellen oder mykotischen Infektionen zu erkranken.

Reife Granulozyten verbleiben nur wenige Stunden im Blut (etwa 8 Stunden). Insgesamt überleben sie nur wenige Tage. So bilden sich aus pluripotenten Knochenmark-Stammzellen eines gesunden Erwachsenen bis zu $1-2 \times 10^{11}$ neutrophile Granulozyten pro Tag (Borregaard, 2010). Eine genaue Kontrolle der Homöostase ist von Nöten. Bei plötzlichem Proliferationsstopp würde die Granulozytenreserve für 7-10 Tage reichen. Hiernach tritt eine manifeste Granulozytopenie ein (Herold, 2012).

Für diese kurze Lebensspanne brauchen neutrophile Granulozyten viel Energie. Dafür haben sie vorgesorgt. Während ihrer Reifung haben sie sehr viel Glykogen gespeichert. Da für ihre Funktionalität unbedingt Sauerstoff zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (engl.: „reactive oxygen species“, ROS) benötigt wird und

die Granulozyten selbst in einem Milieu agieren, wo Sauerstoff, ebenso wie Glukose, nur in geringen Mengen vorhanden ist, haben sie extravasal ihren Energiestoffwechsel – ähnlich dem Warburg-Effekt bei malignen Zellen – auf die weit weniger effektive Glykolyse und nicht auf die oxidative Phosphorylierung ausgerichtet. Verantwortlich für diese Art des Metabolismus – selbst in normoxämischen Zuständen – ATP rein aus dem Abbau von Glukose zu Laktat anstelle der viel effizienteren oxidativen Phosphorylierung zu produzieren, dürfte der Transkriptionsfaktor „hypoxia-inducible transcription factor-1 α “ (HIF-1 α) sein. HIF-1 α agiert als ein Master-Transkriptionsfaktor, der die Expression sehr vieler Gene reguliert, die Einfluss auf den Energiestoffwechsel, insbesondere der Sauerstoff-Homöostase, ausüben können (Cramer et al, 2003; Semenza, 2002).

Ferner präsentieren PMN verschiedenste Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Dies ist Voraussetzung, um die Blutzirkulation verlassen und sich extraluminal zum Ort des Entzündungsgeschehens bewegen zu können (siehe Abb. 2).

Ist am Ort des Entzündungsgeschehens ein bestimmtes Reizmuster vorhanden, z.B. eine Ansammlung von Bakterien, werden die Granulozyten über chemotaktische Faktoren angelockt. Dort angekommen, binden sie an ihrer Oberfläche die Mikroorganismen und die Granulozytenmembran umstülpt diese.

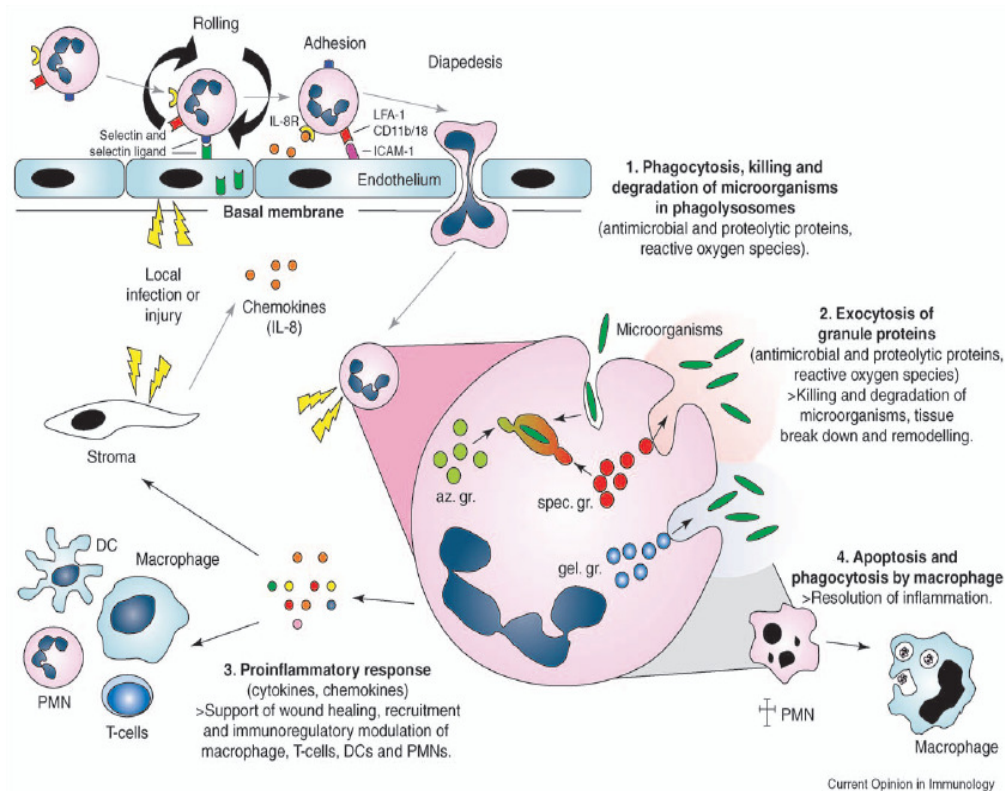


Abb. 2: Eigenschaften neutrophiler Granulozyten (aus Theilgaard-Monch et al, 2006).

Anmerkung: Als Teil des angeborenen Immunsystems kommt es nach Verletzung oder lokaler Infektion zu einer Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Diese wandern nach erfolgter Leukodiapedese entlang eines Chemokin-Gradienten zum Ort des Entzündungsgeschehen und werden funktionell aktiv (Beschriftung 1-3). Anschließend gehen die Granulozyten in Apoptose und werden von Makrophagen selbst phagozytiert und das Entzündungsgeschehen löst sich auf (Beschriftung 4).

Abk.: az. gr., azurophil granules; DC, dendritic cells; gel. gr., gelatinase granules; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; LFA-1, leukocyte function-associated molecule 1; PMN, polymorphonuclear neutrophil; spec. gr., specific granules.

Durch Abschnürung und Ausbildung eines Phagosoms kommt es zur Phagozytose. Innerhalb der Zelle kommt es zur Vereinigung mit verschiedenen Granula unter Ausbildung des Phagolysosoms und letztendlich zur Abtötung der Mikroorganismen. Der neutrophile Granulozyt behilft sich hierbei verschiedenster

Abwehrmechanismen: einem oxidativen und einem nicht-oxidativen Mechanismus (Ganz, 1999; Hampton et al, 1998).

Das oxidative System („respiratory burst“) katalysiert die Generation von ROS unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff. Über die Rekrutierung und Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase kommt es zur Bildung von Superoxidanion. Aus diesem gehen konsekutiv weitere ROS (H_2O_2 und HOCl) hervor.

Zu dem nicht-oxidativen System gehören eine Reihe mikrobizider Peptide und Proteasen wie Gelatinasen, Elastase und Cathepsin G. Diese Proteine werden in verschiedenen Granula bzw. sekretorischen Vesikeln gespeichert (Witko-Sarsat et al, 2000). Da bei der Ausbildung eines solchen Phagosoms – in das die Inhalte der Granula und die Produkte des „oxidativen burst“ sezerniert werden – es auch Phagozytose-unabhängig zu einer Sequestration in den extrazellulären Raum kommt, konfrontiert der Granulozyt seine Umgebung mit gewebe- bzw. zellschädigenden Substanzen. Bei unzureichendem Schutz, zum Beispiel durch Mangel an antioxidativen Schutzsystemen, kann es so zu Schäden an körpereigenen Strukturen kommen, wie wir sie beispielsweise bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, der rheumatoiden Arthritis oder auch bei der zystischen Fibrose beobachten können (Summers et al, 2010). Zudem befinden wir uns am Entzündungsort in einem proinflammatorischen Milieu. Es kommt zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie beispielsweise Leukotrien-B₄ (LTB₄) und dem „Platelet-activating-factor“ (PAF). Diese so gegensätzlichen Mechanismen der einerseits potenten Pathogenabwehr und andererseits gleichzeitigen Konfrontation des Wirts mit zytotoxischen und proinflammatorischen Molekülen verleihen dem neutrophilen Granulozyten einen bivalenten Charakter, den der Granulozyt auch hinsichtlich seiner Rolle in der Tumorgenese und Tumorbekämpfung noch weiter unterstreicht (Smith, 1994).

Eine weitere Funktion der neutrophilen Granulozyten besteht in der Ausbildung von so genannten „Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs). Bei diesem extrazellulären Mechanismus können Bakterien auch außerhalb der Zelle bekämpft werden, indem die neutrophilen Granulozyten eine netzartige Struktur ausbilden. In diesem Netz können verschiedene Mikroorganismen gefangen und abgetötet werden (Brinkmann and Zychlinsky, 2007). Abbildung 2 fasst in einer Übersicht nochmals eine Reihe vielfältiger Funktionen neutrophiler Granulozyten zusammen.

1.1.1 Reifung und Freisetzung aus dem Knochenmark

Die neutrophilen Granulozyten entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Die Produktion neutrophiler Granulozyten ist mit $1-2 \times 10^{11}$ Zellen pro Tag enorm hoch (Borregaard, 2010).

Der Hauptregulator der physiologischen Granulopoese ist der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (engl.: granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF). Diesem Differenzierungsfaktor kommt im Rahmen eines Infektgeschehens eine große Bedeutung zu. Jedoch ist es nicht ausschließlich G-CSF, das für die Granulopoese benötigt wird. Mäuse, die nicht G-CSF produzieren, haben immer noch eine Granulopoese von 25% und produzieren vollkommen reife Granulozyten (Lieschke et al, 1994). Die Regulation der Granulopoese obliegt hauptsächlich auch der Apoptoserate Neutrophiler im Gewebe. Sobald Makrophagen und dendritische Zellen apoptotische Neutrophile phagozytieren, wird die Synthese von Interleukin-23 herunterreguliert (Ley et al, 2006; von Vietinghoff and Ley, 2009). IL-23 stimuliert die Produktion von Interleukin-17A (IL-17A) durch Neutrophile regulierende T-Zellen (gamma-delta T-Zellen und NK-ähnliche T-Zellen), die in großer Anzahl in mesenterialen Lymphknoten lokalisiert sind (Ley et al, 2006). IL-17A selbst ist ein bedeutender Stimulator der Synthese von G-CSF und somit ein wichtiger Faktor der Granulopoese.

Die Neutrophilen-Population im Knochenmark kann in drei Pools unterteilt werden: den Stammzellpool, den mitotischen Pool und den postmitotischen Pool. Der Stammzellpool besteht aus undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen, wohingegen der mitotische Pool den granulozytischen Progenitorzellen zuzuschreiben ist, der sich weiter proliferieren und sich differenzieren kann. Der postmitotische Pool ist den ausdifferenzierten Granulozyten zuzuschreiben, die eine Knochenmarksreserve darstellen und auf einen Reiz für die Freisetzung in den Blutkreislauf warten. Studien, die ^{32}P - oder ^3H - markierte Zellen verwendeten, haben gezeigt, dass die durchschnittliche Transitzeit bis zum postmitotischen Pool 4-6 Tage beträgt (Dancey, 1976). Hierbei zeigten Untersuchungen, dass der Chemokin-Rezeptor CXCR4 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4) entscheidend für den Verbleib neutrophiler Granulozyten im Knochenmark ist (Lapidot and Kollet, 2002).

Das Erscheinen von Granula in neutrophilen Granulozyten markiert den Übergang der Reifung von Myeloblasten zu Promyelozyten (siehe Abb. 3). Neutrophile Granula werden in drei Subklassen unterschieden:

- primäre (azurophile) Granula, die Enzyme wie Myeloperoxidase (MPO), Elastase, Defensine und saure Hydrolasen wie Cathepsine enthalten,
- sekundäre (spezifische) Granula (Laktoferrin, Lysoszym, Kollagenase, Alkalische Phosphatase enthaltend) und
- tertiäre Granula (Gelatinase enthaltend).

Durch Phagozytose und anschließende Abtötung der Erreger durch Bildung von ROS und Aktivierung von Proteasen und anderen lytischen Enzymen kann so eine wichtige mikrobizide Immunabwehr stattfinden, bevor das erworbene Immunsystem aktiviert wird.

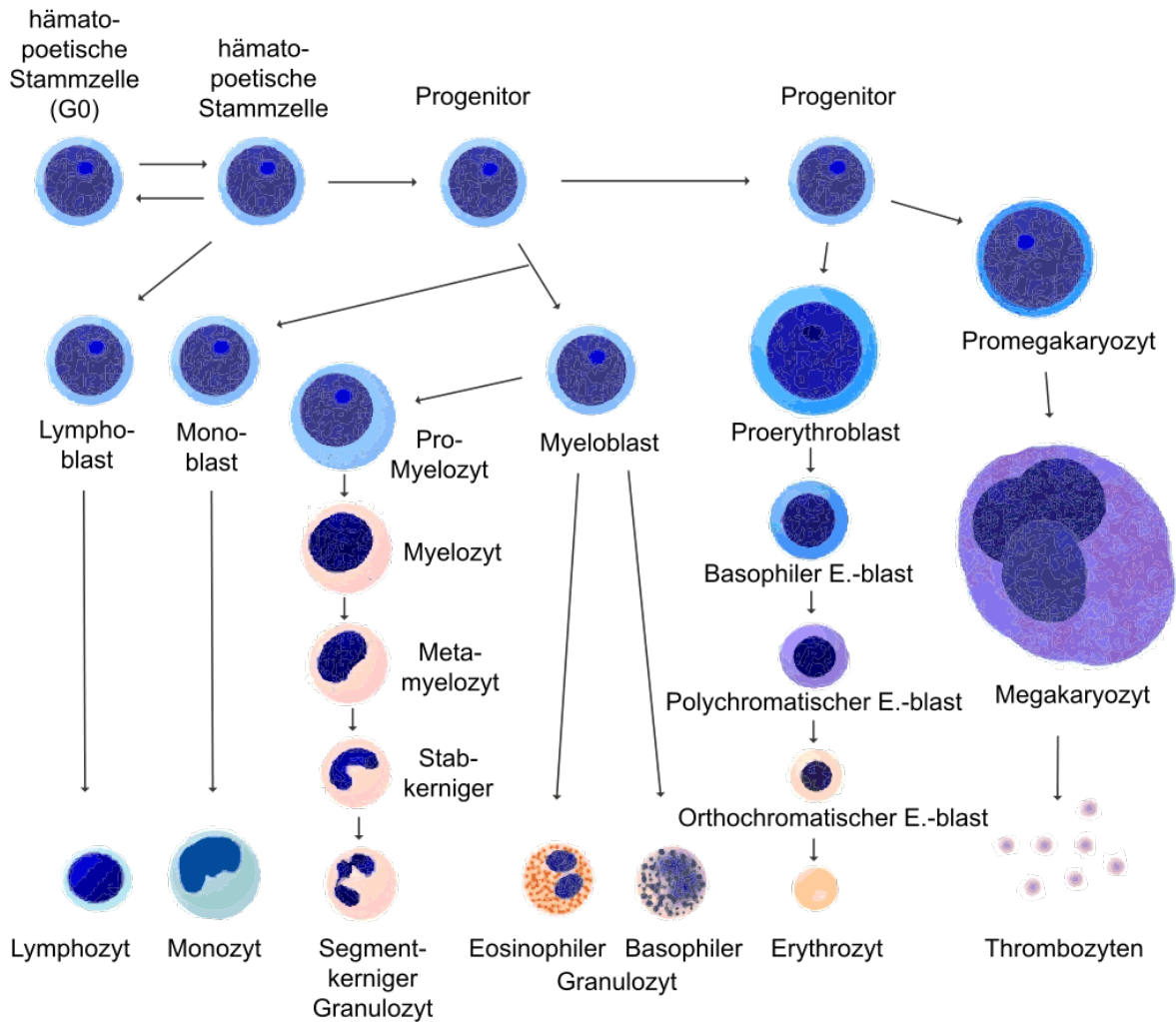


Abb. 3: Die Granulopoese (aus wikipedia.de).

Anmerkung: Neutrophile Granulozyten entstehen im Knochenmark durch Differenzierung aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Diese Stammzellen sind teilungsfähig und reifen unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren und den Zwischenstadien der Progenitorzellen zu sogenannten Precursor-Zellen aus. Mit der Entstehung der Myeloblasten aus den Precursorzellen verlieren die Neutrophilen ihre Teilungsfähigkeit. Aus dem Blastenstadium entwickelt sich über weitere Reifungsstadien dann der neutrophile Granulozyt.

1.1.2 Der Weg zum Entzündungsort – die Leukodiapedese

Der Weg neutrophiler Granulozyten zum Entzündungsort setzt voraus, dass sie die Blutzirkulation verlassen und die Endothelzellen überbrücken können. Hierzu müssen sie zunächst das Gefäßsystem verlassen, ein Vorgang, der als Diapedese bezeichnet wird. Die Diapedese wird durch die Bindung der Leukozyten an die Wand der postkapillären Venolen („tethering“) und ihr Rollen entlang dieser („rolling“) initiiert (Muller, 2003; Vestweber and Blanks, 1999).

Lange Zeit beschrieben Pathologen das traditionelle „drei-Stufen“-Konzept mit „leukocyte rolling, adhesion und transmigration“ (Ley et al, 2007). Ergänzt wird es nun um die Mechanismen „slow rolling, adhesion strengthening, intraluminal crawling und paracellular und transcellular migration“ (siehe Abb. 4).

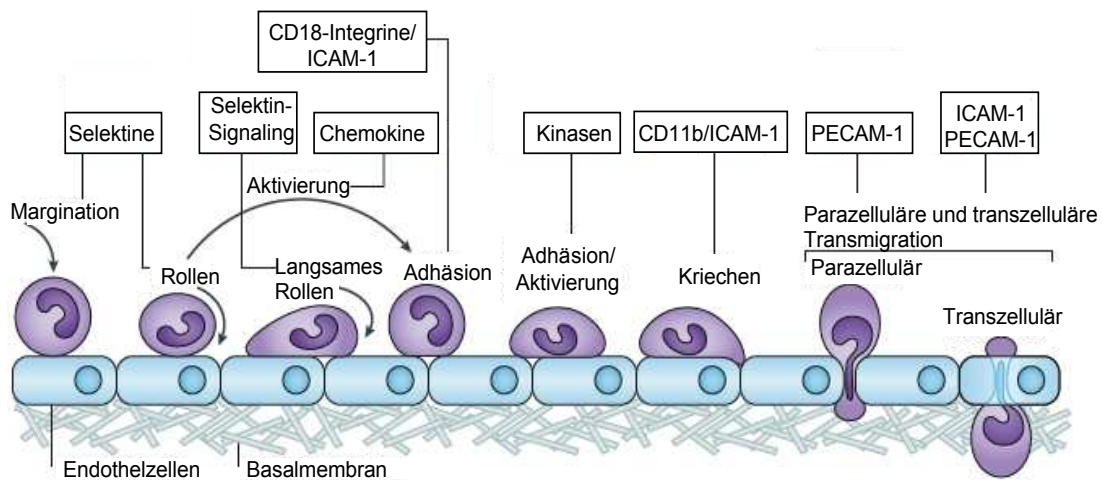


Abb. 4: Schematische Darstellung der migratorischen Kaskade eines neutrophilen Granulozyten und der an den einzelnen Phasen beteiligten Mediatoren (aus Ley et al, 2007).

1.1.2.1 „Leukocyte rolling“ und Adhäsion

Das „rolling“ wird durch L-Selektin (CD62L), P-Selektin (CD62P) und E-Selektin (CD62E) vermittelt, welche im Folgenden mit dem P-Selektin-Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) interagieren. L-Selektin wird konstitutiv von den meisten Leukozyten auf der Leukozytenmembran exprimiert, wohingegen E-Selektin und P-Selektin von inflammatorisch aktivierten Endothelzellen auf der luminalen Seite exprimiert werden. So wird auch der initiale Kontakt von den Endothelzellen hergestellt, indem sie durch IL-1 β , IL-17 oder Tumornekrosefaktor- α (TNF α) stimuliert werden. Diese Mediatoren entstehen im Rahmen von Entzündungsprozessen und führen zur luminalen Exprimierung von P-Selektin und E-Selektin. Diese Selektine binden PSGL-1, welcher als Ligand für alle 3 Typen der Selektine dient, und L-Selektin, welches wiederum in den Mikrovilli neutrophiler Granulozyten exprimiert wird. Die Bindung von PSGL-1 an L-Selektin generiert Leukozyten-Leukozyten-Interaktionen, die es weiteren Leukozyten vereinfachen, an die Endothelzellen zu binden. Es ermöglicht so sogar Leukozyten, die keine Liganden für E-Selektin oder P-Selektin exprimieren, ins Interstitium auszuwandern, um so ebenfalls an den Entzündungsort gelangen zu können. Analog zu PSGL-1 bindet E-Selektin zudem glykosyliertes CD44 und den E-Selektin-Liganden-1 (ESL-1; Hidalgo et al, 2007).

All diese Interaktionen mit oberflächlichen Adhäsionsmolekülen und ihren Liganden machen es letzten Endes möglich, dass Leukozyten befähigt sind, am richtigen Ort der Migration unter Bedingungen des regelrechten Blutflusses am Endothelium zu binden. L-Selektine und P-Selektine benötigen tatsächlich auch einen gewissen Grad an Scherkräften („shear stress“) um die Adhäsion zu unterstützen. Sobald der Blutfluss gestoppt wird, lösen sich gar die Zellen vom Endothelium. Dieses Phänomen korreliert mit dem Phänomen des „catch bond behavior“ der Selektine, welches den Einfluss von Scherkräften auf die kinetischen Anforderungen der Selektinbindung beschreibt (Marshall et al, 2003).

Wie bereits erwähnt, hat das Endothel einen aktiven Part bei der Leukodiapedese. Endothelzellen exprimieren E-Selektin und P-Selektin. Weitere Signalwege induzieren über PSGL-1 in myeloischen Zellen die Milztyrosinkinase (engl.: spleen tyrosine kinase, SYK). Aktivierte SYK aktiviert seinerseits die „bruton tyrosin kinase“, welche weiter zu einer Aktivierung von PLC- γ (Phospholipase C- γ), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und P38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) führt, mit dem Ergebnis, dass es zu einer Integrin-Aktivierung und zytoskelettalen Umstrukturierungen in neutrophilen Granulozyten kommt (Yago et al, 2010; Mueller et al, 2010; Ley et al, 2007). In Übereinstimmung zeigen Mausmodelle mit fehlender Expression von PI3K eine zehnfach höhere Geschwindigkeit beim „rolling“ im Rahmen einer Entzündungskonstellation (Puri et al, 2005).

Des weiteren spielen Integrine eine bedeutende Rolle bei der leukozytären Adhäsion. Bei den Integrinen existieren verschiedene Subgruppen. Eine davon, die CD18-Integrine, beschreiben leukozytenspezifische, heterodimere, transmembranäre Glykoproteine mit einer α - Untereinheit (CD11) und einer β - Untereinheit (CD18). Es sind mehrere α - Untereinheiten bekannt, sodass sich wiederum mehrere Mitglieder dieser Familie ergeben: CD11a/CD18 (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$ -Integrin), CD11b/CD18 (Mac-1; $\alpha_M\beta_2$ -Integrin), CD11c/CD18 (p150,95) und CD11d/CD18, von denen CD11a/CD18 und CD11b/CD18 die neutrophilen Hauptintegrine darstellen. Hierbei interagiert LFA-1 vorwiegend mit dem endothelialen Adhäsionsmolekül ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), währenddessen Mac-1 neben ICAM-1 noch mit einer Vielzahl weiterer Liganden interagiert, darunter verschiedene „Matrix-Proteine“ (Fibronectin, Fibrinogen oder Kollagen), Komplementfaktoren (C3bi), dem Gerinnungsfaktor X und mit den neutrophilen Proteinen Elastase und MPO.

LFA-1 vermittelt hierbei den Übergang vom „rolling“ zur „Adhäsion“ an der endothelialen Oberfläche (Phillipson et al, 2006). Währenddessen Granulozyten entlang der E- und P-Selektine am Endothel entlangrollen, wird eine höhere,

jedoch nicht die hochaffine Form der LFA-1 induziert, so dass es LFA-1 ermöglicht wird, mit ICAM-1 zu interagieren, um weiterrollen zu können, jedoch noch nicht in eine feste Adhäsion mit diesem Adhäsionsmolekül einzugehen (Kuwano et al, 2010). Diese Aktivierung von LFA-1 kommt durch PSGL-1 und CD44 zu Stande (Zarbock et al, 2008; Yago et al, 2010). Vollständig aktiviertes LFA-1 vermittelt dann einen Stopp des „rollings“ und einen Übergang in eine „firm adhesion“ zusammen mit Mac-1 (Woodfin et al, 2010).

Somit hängt letzten Endes die Fähigkeit der Integrine ihre Liganden zu binden vom Aktivierungszustand der Neutrophilen ab. Sind die Zellen in einem passiven Zustand, befinden sich die Integrine in einem "low-affinity-state" mit niedriger Ligandenaffinität. Durch weitere Stimulation durch inflammatorische Mediatoren – sei es von Liganden, die von Endothelzellen sezerniert werden oder von Endothelzellen präsentierten Glykosaminoglykanen – kommt es zur Aktivierung von Chemokin-Rezeptoren neutrophiler Granulozyten, die eine Konformationsänderung hervorrufen und so zu einer Cluster-Bildung der CD18-Integrine führen, einem "high-affinity-state" mit erhöhter Bindungsfähigkeit („inside-out-signaling“; Zarbock et al, 2007).

Außerdem folgt der Ligandenbindung bei den CD11b/CD18-Integrinen eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden („outside-in-signaling“), die den Aktivierungszustand der Leukozyten weiter erhöhen. Neben den Integrinen sind weitere zahlreiche Rezeptoren für die Initiierung eines intrazellulären „signalings“ verantwortlich: Toll-like Rezeptoren kommunizieren die zelluläre Reaktion auf bakterielle und Hefezellbestandteile. Ferner vermitteln G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) die Antwort auf Zytokine und Chemokine (Witko-Sarsat et al, 2000).

Um den Vorgang der Aktin-Polymerisation kontrollieren zu können, sind einige zentrale intrazelluläre Mediatoren notwendig. So wird durch Stimulation der GPCRs die PI3K aktiviert, wodurch die Bildung des Signalmoleküls Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP3) katalysiert wird (Li et al, 2000). PIP3 aktiviert direkt oder über den Guanosinnukleotid-Exchange-Faktor Vav

Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen, insbesondere Rac2 und Cdc42, die eine zentrale Rolle in der Kaskade spielen (Nobes et al, 1999). Es kommt zur Komplexbildung mit den Proteinen der Wiskott-Aldrich-Syndrom-Familie WAVE und WASp und mit Arp2/3 und Profilin, die an Aktinfilamente binden und die Polymerisation kontrollieren (Zhelev and Alteraifi, 2002; Takenawa and Miki, 2001).

Darüber hinaus ist eine Beteiligung von Myosin/Aktin-abhängigen Prozessen beschrieben, die während der Fortbewegung eine Kontraktion am Uropodium auslösen und somit das Loslösen des hinteren Pols von der Matrix ermöglichen (Xu et al, 2003). Auch an diesem Mechanismus scheinen Rho-GTPasen beteiligt zu sein.

1.1.2.2 Die transendotheliale Migration

Nachdem die Leukozyten fest an die Endotheloberfläche angelagert sind, wandern diese entlang des Endothels zu Zell-Zell-Verbindungen, um eine geeignete Stelle für die Transmigration zum Ort des Entzündungsgeschehens zu finden („intravascular crawling“; Phillipson et al, 2006). Der Vorgang der Extravasation kann derweil auf zwei verschiedene Arten geschehen: parazellulär und transzellulär.

Adhärente Leukozyten können die Ausbildung von sogenannten „docking structures“ und „transmigratory cups“ induzieren – endotheliale Ausstülpungen, die reich an ICAM-1 und VCAM-1 („vascular cell adhesion molecule 1“), sowie zytoplasmatischen Molekülen wie ERM (Ezrin, Radixin und Moesin) und zytoskelettalen Komponenten wie beispielsweise Vinculin, alpha-Actinin und Talin-1 sind. Diese „cups“ sind notwendig für eine effiziente Migration sowohl über die transzelluläre, als auch über die parazelluläre Route (Carman and Springer, 2004).

1.1.2.3 Die parazelluläre Zellmigration

Der parazelluläre Weg geht einher mit der vorübergehenden Lockerung interendothelialer Kontakte, um so die Migration von Leukozyten zu erleichtern (Greenwood et al, 2003). Es wird angenommen, dass die CD11b-ICAM-1-Interaktion die Endothelzelle stimuliert, die vor allem durch VE-Cadherine gebildeten Kontakte zu lösen und Rezeptoren für die Granulozyten, diesmal vor allem PECAM-1 (Platelet/Endothelial-cell Adhesion Molecule 1) und JAM-A (Junctional Adhesion Molecule A), vermehrt in den Bereich der Zellzwischenräume zu rekrutieren. Dadurch wird ein adhäsiver, haptotaktischer Gradient erzeugt, der die Neutrophilen durch die interendothelialen Zellkontakte lotst (Muller, 2003; Shaw et al, 2001). Leukozytäres LFA-1 interagiert dabei mit ICAM-1 und ICAM-2, während PECAM-1, CD99, JAM-A, -B und JAM-C bevorzugt homophile Interaktionen mit den jeweiligen Isoformen eingehen.

1.1.2.4 Die transzelluläre Zellmigration

Neben der parazellulären Migration konnte auch die transzelluläre Migration von Leukozyten nachgewiesen werden (Feng et al, 1998). Diese findet an Stellen mit vergleichsweise dünner Endothelschicht statt und betrifft je nach Gewebeart und Art der Stimulation bis zu 20% der migrierenden Leukozyten (Woodfin et al, 2010).

Man nimmt an, dass die durch Mac-1-vermittelte Migration neutrophiler Granulozyten die parazelluläre Route bevorzugt. So konnte in einem Maus-Modell unter Abwesenheit von Mac-1 die transzelluläre Migration von 20% auf 80% gesteigert werden (Phillipson et al, 2008).

Der Kontakt von Leukozyten mit Endothelzellen führt zur Konzentrierung von ICAM-1, VCAM-1, Aktin und Caveolin-1 in definierten Endothelzellbereichen und zur Bildung von Caveolae. Diese Caveolae können miteinander fusionieren und bilden eine Anhäufung von miteinander verbundenen Organellen (vesikulo-vakuoläre Organellen). Diese Organellen können das vaskuläre Lumen mit dem

extravaskulären Bereich verbinden und ermöglichen so die Extravasation von Makromolekülen. Möglicherweise bildet diese Fusion die Grundlage für einen „Migrationskanal“ durch die beteiligte Endothelzelle, der von Leukozyten zur transzellulären Migration genutzt werden kann (Ley et al, 2007). Um in das Entzündungsgeschehen vordringen zu können, muss nach Migration über die endotheliale Barriere die perivaskuläre Schicht aus Perizyten und Basallamina überwunden werden. Hierbei scheinen vor allem die leukozytäre alpha-6-Integrine (Lamininrezeptoren) und proteolytische Enzyme wie Matrix-Metalloproteasen (MMP-9, MMP-8, MT6-MMP: Gelatinase und sekretorische Vesikel) und die Neutrophilen-Elastase (azurophile Granula) eine wichtige Rolle zu spielen (Kang et al, 2001; Kolaczowska et al, 2009).

1.1.3 Chemotaxis

Wie andere Phagozyten besitzen neutrophile Granulozyten die Fähigkeit der Chemotaxis, d.h. das gerichtete Bewegen in Richtung eines ansteigenden Gradienten „anlockender“ Moleküle wie mikrobieller Substanzen (z.B. N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin, NfMLP). Mit Geschwindigkeiten von bis zu 20 µm pro Minute zählen die Neutrophilen zu den am schnellsten wandernden Säugerzellen (Niggli, 2003; Durr et al, 2006). Im extraluminalen Raum wandern die Neutrophilen in Richtung der jeweiligen Noxe. Um ihr Ziel zu erreichen, folgen sie diesem chemotaktischen Gradienten, der durch interstitielle Diffusion dieser Moleküle entsteht und so den Infektionsherd markiert. Die Granulozyten sind in der Lage, einen Gradienten von < 1% pro Zelllänge zu detektieren. Ferner können Granulozyten zwischen Endtarget und intermediären Chemotaxinen unterscheiden, der durch interstitielle Diffusion dieser Moleküle entsteht, um definieren zu können, wo sich der inflammatorische Auslöser genau befindet (Heit et al, 2002). Dieser Prozess wird durch Chemoattraktanden, wie beispielsweise das bakterielle Peptid NfMLP vermittelt, das an der Infektionsstelle von Bakterien ausgeschüttet wird, und für welche die Neutrophile passende Rezeptoren aus der

Superfamilie der GPCRs besitzen (Hauert et al, 2002; Carrigan et al, 2007). Wird NfMLP erkannt, kommt es über die Aktivierung von Phospholipase C zur Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃). DAG bewirkt die Aktivierung der Proteinkinase C und nachfolgend der NADPH-Oxidase – das zentrale Enzym zur Bildung von ROS im Rahmen des „oxidativen burst“. IP₃ führt zur Ausschüttung von Ca²⁺ mit nachfolgender Degranulation.

Vom verletzten Gewebe selbst werden zusätzlich ebenso körpereigene Lockstoffe ausgeschüttet, denen die Neutrophile zur Entzündungsstelle hin nachfolgen. Dazu zählen beispielsweise Faktoren wie PAF und Chemokine wie IL-8. IL-8 ist ein Chemokin der CXC-Familie und eine erhöhte Expression und Abgabe von IL-8 wurde u.a. bei Krebszellen, endothelialen Zellen und Tumor-assoziierten Makrophagen festgestellt (Di Cioccio et al, 2004). PAF ist ein Phospholipid, das von Neutrophilen, Thrombozyten und Endothelzellen gebildet wird. Dieser Faktor löst eine Zellaggregation aus und tritt bei Entzündungen und Wundheilungsprozessen auf.

Angelockt durch Chemotaxine und durch einen abgestimmten Prozess zwischen zytoskelettären Rearrangements und dem adhäsivem Prozess an der extrazellulären Matrix entlang, wird die extravasale, amöboide Fortbewegung der Granulozyten ermöglicht. Die spärliche Zelle weist eine Polarisierung auf. Am vorderen Ende bildet sich ein hervorstehendes Lamellipodium aus, während das hintere Ende Uropodium genannt wird (Mitchison and Cramer, 1996; Zhelev and Alteraifi, 2002). Das Lamellipodium bildet sich durch die schnelle Formation von Aktin-Filamenten aus. An diesem Punkt der Zelle sind sowohl vermehrt Chemotaxin-Rezeptoren lokalisiert, um die Sensitivität für entsprechende Chemotaktine zu erhöhen, als auch Integrine, um die Fähigkeit der Bindung zur Matrix zu erhöhen. Durch gegenteilige Mechanismen wird hingegen am Uropodium die Sensitivität und die Bindungsfestigkeit erniedrigt (Hughes et al, 1992).

Letzten Endes ermöglicht so eine komplexe – ATP-abhängige – Dynamik der Aktin-Filamente mit sukzessiver Streckung und Kontraktion des Zellkörpers, welches von Knüpfen adhäsiver Kontakte begleitet wird, ein "Kriechen" der Zelle auf dem extravasalen Gebiet (Anderson et al, 2000).

Die Auflösung der extrazellulären Matrix erfolgt hierbei durch Freisetzung verschiedener Proteasen (z.B. Kollagenasen, Elastase und Gelatinase), die durch eine limitierte Bildung von ROS zuvor aktiviert werden (Weiss, 1989). Die Lebenszeit neutrophiler Granulozyten nach Auswanderung ins Gewebe beträgt in etwa 1-2 Tage.

1.1.4 Phagozytose und „killing“ der Mikroorganismen

Am Entzündungsort angekommen, beginnen die Neutrophilen mit der Phagozytose. Sie binden sich über Rezeptoren an die fremden Stoffe (Bakterien, Pilze) und „umfließen“ sie. Dieser Prozess wird durch unterschiedliche Makromoleküle erleichtert (Opsonine) und schließlich gelangt das zu phagozytierende Molekül über Vesikel in das Zellinnere der Granulozyten (Phagosom). Zugleich kommt es zur Bildung von ROS, die für das „killing“ – zum Abtöten der pathogenen Keime – essentiell sind (siehe entsprechend dem Krankheitsbilde der septischen Granulomatose). Mit Beginn der Produktion von Superoxidanion (O_2^-) kommt es dabei zu einer kaskadenartigen Bildung verschiedener ROS, wie sie in den folgenden Kapiteln beschrieben wird. In weiterer Folge verschmelzen die Phagosomen mit den Granula unter Ausbildung der sogenannten Phagolysosomen (Stuart and Ezekowitz, 2005). Der pH-Wert in dieser Phagolysosom genannten Vakuole steigt vorerst durch Bildung von Superoxidanion an, um später wieder abzusinken, was zuerst die Aktivierung kationischer Proteine (z.B. Defensine) bewirkt und anschließend durch den gesunkenen pH-Wert die Wirkung lysosomaler Enzymen verstärkt. Die Krankheitserreger werden durch die kombinierte Aktion von ROS, lysosomalen Enzymen und anderen Proteinen vollständig zerstört. Zudem steht dem

neutrophilen Granulozyten mit der Ausbildung von NETs (siehe Kapitel 1.1.5) neben der Phagozytose und dem „oxidativen burst“ eine dritte Möglichkeit für das „killing“ pathogener Mikroorganismen zur Verfügung.

1.1.4.1 „Killing“ und „oxidativer burst“

Beobachtungen an phagozytierenden neutrophilen Granulozyten zeigten, dass während des „killings“ der Sauerstoffverbrauch in den Zellen abrupt anstieg und vermehrt H_2O_2 gebildet wurde (Iyer et al, 1961). Zudem geht es einher mit einer Aktivierung des Pentosephosphatweges (Iyer et al, 1961; Babior, 1978). Dieses Phänomen des nicht an Mitochondrien gebundenen Umsatzes an Sauerstoff wird respiratorischer oder auch „oxidativer burst“ genannt. Hier werden ROS wie $\text{O}_2^{\cdot-}$, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und hypochlorige Säure (HOCl) mit Hilfe von Enzymen (Superoxiddismutase, SOD; MPO) bzw. spontan ($\text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$) gebildet.

Reaktionsgleichungen:



Die Reaktion (1) wird durch die SOD katalysiert, währenddessen die Reaktion (2) spontan abläuft.

Die Generation von Superoxidanionen wird durch das Enzym NADPH-Oxidase (NOX bezeichnet hierbei die Familie der NADPH-Oxidasen; hier handelt es sich um NOX2) katalysiert. Der Pentosephosphatweg stellt hierfür durch Bereitstellung von NADPH die Elektronen zur Verfügung. Die NADPH-Oxidase kann auf verschiedene Weise aktiviert werden (u.a. opsonierte Bakterien; opsonisiertes

Zymosan – einem Hefezellwand-Polysaccharid; Phorbol-ester wie Phorbol-Myristat-Acetate, PMA; NfMLP oder Komplement-Peptid C5a). Nach Aktivierung kommt es so über second-messenger-Systeme – wie z.B. Proteinkinase C – zur Aktivierung des Multikomponenten-Enzyms NADPH-Oxidase. Der Enzymkomplex selbst wird bei Aktivierung neutrophiler Granulozyten aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt (siehe Abb. 5). Der Enzymkomplex besteht aus dem membrangebundenen Flavocytochrom_{b558} und zytosolischen Komponenten (Iverson et al, 1977, 1978; Babior, 1999; Babior et al, 2002).

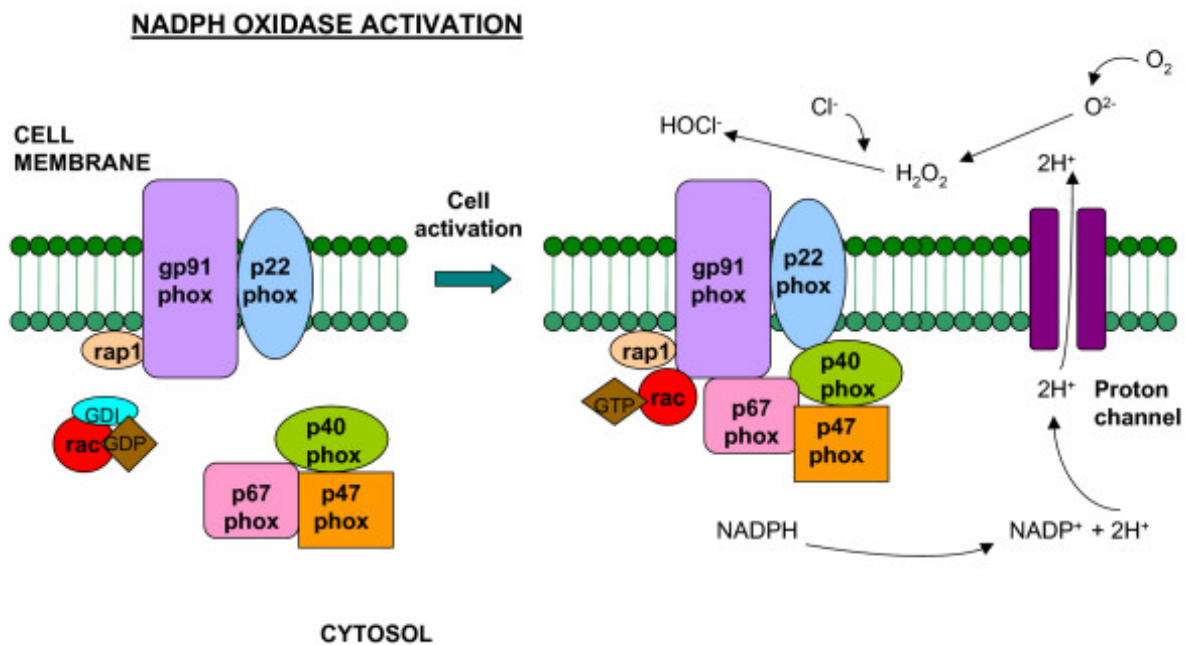


Abb. 5: Schematische Darstellung der NADPH-Oxidase-Aktivierung (aus Assari, 2006).

Anmerkung: Die NADPH-Oxidase besteht aus mehreren verschiedenen Untereinheiten, die sowohl in der Membran, als auch im Zytosol lokalisiert sind. Die Aktivierung erfolgt durch Anlagerung der zytosolischen an die membranständigen Untereinheiten. Der aktivierte NADPH-Oxidase-Komplex ist so in der Lage über den „oxidativen burst“ Superoxidation zu generieren. Superoxidation selbst kann über H_2O_2 zu $HOCl$ reagieren, welche alle zusammen zum „killing“ pathogener Keime beitragen. Das in der Abbildung erwähnte NADPH entstammt der Startreaktion des Pentosephosphatweg (Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion).

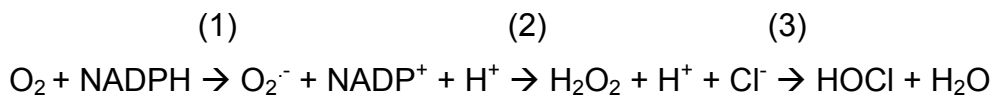
Der Cytochrom_{b558}-Komplex besteht zum einen aus der transmembranalen Untereinheit gp91^{phox} und der membranassoziierten Untereinheit p22^{phox} (Zalba et al, 2001). Die Zahlen geben hierbei das Molekulargewicht in Kilodalton an, die Bezeichnung „phox“ rührt vom englischen Begriff „Phagocyte Oxidase“. Fehlt die Stimulation, so liegt die NADPH-Oxidase inaktiv vor. Bei Stimulierung der Granulozyten wandern die sich frei im Zytoplasma befindlichen Untereinheiten p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} und das kleine G-Protein rac zur Plasmamembran, und es kommt zur Aktivierung der NADPH-Oxidase (Björgvinsdóttir et al, 1996; Griendling and Lyle, 2006).

Für die Aktivierung der NADPH-Oxidase ist einerseits die Umwandlung von GDP zu GTP an der Rac-Untereinheit, andererseits die Phosphorylierung von p47^{phox} erforderlich (Griendling and Lyle, 2006). Dieser Vorgang führt zu einer Konformationsänderung der zytosolischen Untereinheit, die sich dem membranständigen Cytochrom_{b558}-Komplex anlagert. Das Substrat NADPH bindet auf der zytoplasmatischen Membranseite an die gp91^{phox} Untereinheit und setzt zwei Elektronen frei (Lassègue and Clempus, 2003). Die Elektronen werden auf die gegenüberliegende Membranseite übertragen, wo sie Sauerstoffmoleküle zu Superoxidanionen reduzieren (siehe Abb. 5). Da negative Ladungen über die Membran transportiert werden, erfolgt der elektrische Ausgleich durch die gleichgerichtete Übertragung von Protonen durch einen Kanal, der Bestandteil der NADPH-Oxidase ist, beziehungsweise mit dieser assoziiert ist (Maturana et al, 2002; Lassègue and Clempus, 2003; Henderson et al, 1987).

Aus einem Sauerstoffmolekül (O_2) entsteht so durch die NADPH-Oxidase Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), das entweder spontan oder enzymatisch (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff umgewandelt wird (siehe Reaktionsgleichung S. 19 und S. 22). Das Enzym MPO setzt letzten Endes das Peroxid zu hypochloriger Säure (HOCl) um. Die Bildung des Superoxidanions ist jedoch nicht nur für den Beginn der Kaskade der ROS-Bildung wichtig, sondern ist

auch ausschlagend für die Regulation des pH-Wertes und die Aktivierung der Proteasen innerhalb der Vakuole (siehe Abb. 6 und 8).

Reaktionsgleichungen:



(1) NADPH-Oxidase

(2) ± SOD

(3) MPO

Diese hochreaktiven Oxidantien reagieren mit verschiedenen mikrobiellen Bestandteilen wie DNA, Proteinen oder Lipiden und induzieren so das Absterben der Mikroorganismen. Nebst der NADPH-Oxidase besitzt der neutrophile Granulozyt – wie bereits erwähnt – noch weitere Enzyme zur Generation von antimikrobiellen Oxidantien. Die MPO, die die Bildung von hypochloriger Säure aus Wasserstoffperoxid und Chloridionen katalysiert, macht hierbei etwa 5 % des gesamten Neutrophilenproteins und etwa 25 % des Granulaproteins aus. Die hypochlorige Säure gilt als das am stärksten wirksame Oxidanz in neutrophilen Granulozyten (Hampton et al, 1998; Segal, 2005). Interessanterweise führt jedoch ein Fehlen der MPO – ganz im Gegensatz zur NADPH-Oxidase – in der Regel nicht zu einer Beeinträchtigung der antimikrobiellen Aktivität der Neutrophilen.

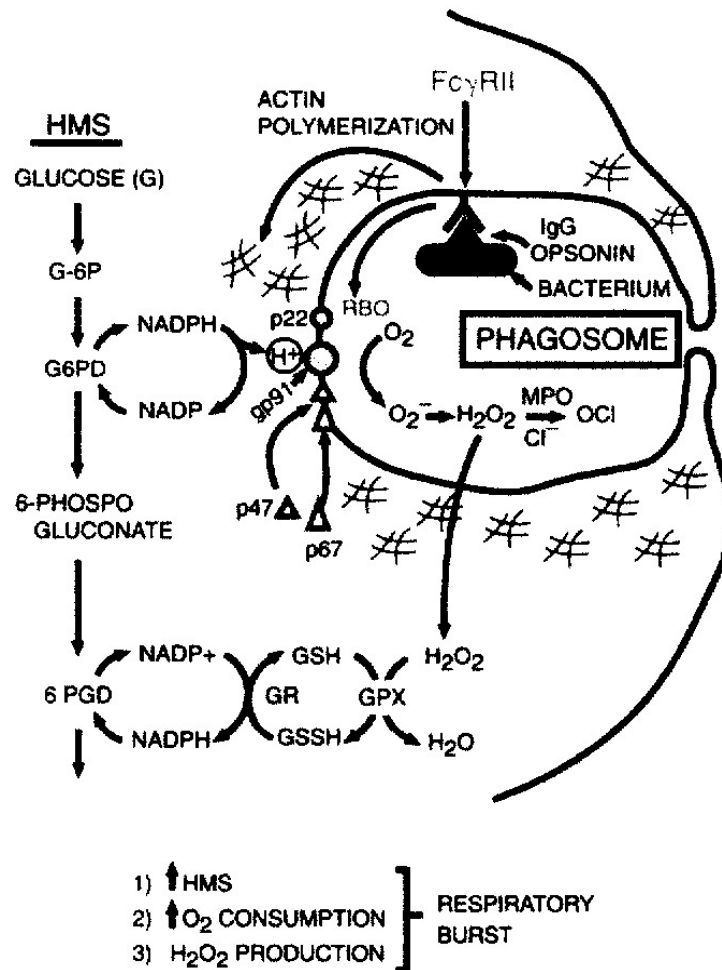


Abb. 6: Schematische Darstellung des Metabolismus Neutrophiler Granulozyten während der Phagozytose (aus Paraskevas, 1999).

Anmerkung: NADPH stammt aus dem Hexose-Monophosphat-Shunt (HMS, Pentosephosphatzyklus). Die Bildung von ROS lässt sich in mehrere Schritte unterteilen: Sauerstoff wird durch die NADPH-Oxidase zu Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$). $O_2^{\cdot-}$ disproportioniert zu H_2O_2 und O_2 . H_2O_2 und Chlorid werden im Phagolysosom durch die MPO zu HOCl. Hier entfalten die ROS ihre bakterizide Wirkung. Aus dem Phagolysosom austretendes $O_2^{\cdot-}$ wird durch die SOD in H_2O_2 umgewandelt. Sowohl Katalase, als auch Glutathio-peroxidase (GPX) vermögen H_2O_2 zu entgiften. Über das Glutathion (GSH)-System oxidiert es hierbei mit Hilfe der GPX. Das dabei oxidierte Glutathion (GSSG bzw. GSSH in dieser Abb.) wird durch die Glutathion-Reduktase (GR) unter NADPH-Verbrauch wieder zu GSH reduziert.

Zu beachten ist, dass die extra-phagosomale Freisetzung von ROS sowohl zu Störungen innerhalb der Neutrophilen als auch zu Schädigungen des Gewebes in der Umgebung der Granulozyten führen kann. Der neutrophile Granulozyt besitzt Mechanismen um sich hierfür zu schützen. Im Zytosol befinden sich Enzyme, die Superoxidation und Wasserstoffperoxid zu Wasser inaktivieren und somit die Zellen vor deren toxischer Wirkung schützen. Diese Enzyme sind die Superoxid-Dismutase, die Katalase und die Glutathion-Peroxidase.

Obwohl der neutrophile Granulozyt für Migration, Phagozytose und das „killing“ der pathogenen Keime viel Energie in Form von ATP benötigt, produziert er ATP nicht über die weitaus effektivere oxidative Phosphorylierung ($C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$, Energiegewinn >30 ATP pro Glukosemolekül). Bis zu fast 90% des Sauerstoffverbrauchs aktivierter neutrophiler Granulozyten wird zur Bildung von ROS verwendet (Reiss and Roos, 1978). Wird die oxidative Phosphorylierung gehemmt, kommt es zu keiner Verminderung des Sauerstoffverbrauches. Dies weist daraufhin, dass Granulozyten ihre Energie mit Hilfe der anaeroben Glykolyse gewinnen (Glukose \rightarrow Laktat, Energiegewinn 2 ATP pro Glukosemolekül).

Dies ist in sofern sinnvoll, da Neutrophile v.a. am Ort der Entzündung benötigt werden. Dort herrscht Sauerstoffmangel, zudem ist dort kaum Glukose vorrätig. Da er sich jedoch während seiner Reifung und/oder während seiner Zirkulation im Blutkreislauf große Mengen an Glykogenvorrat aneignet, macht er sich im interstitiellen Gewebe von der kaum vorhandenen Glukose unabhängig. Abbildung 7 gibt einen Überblick über den Energiestoffwechsel neutrophiler Granulozyten.

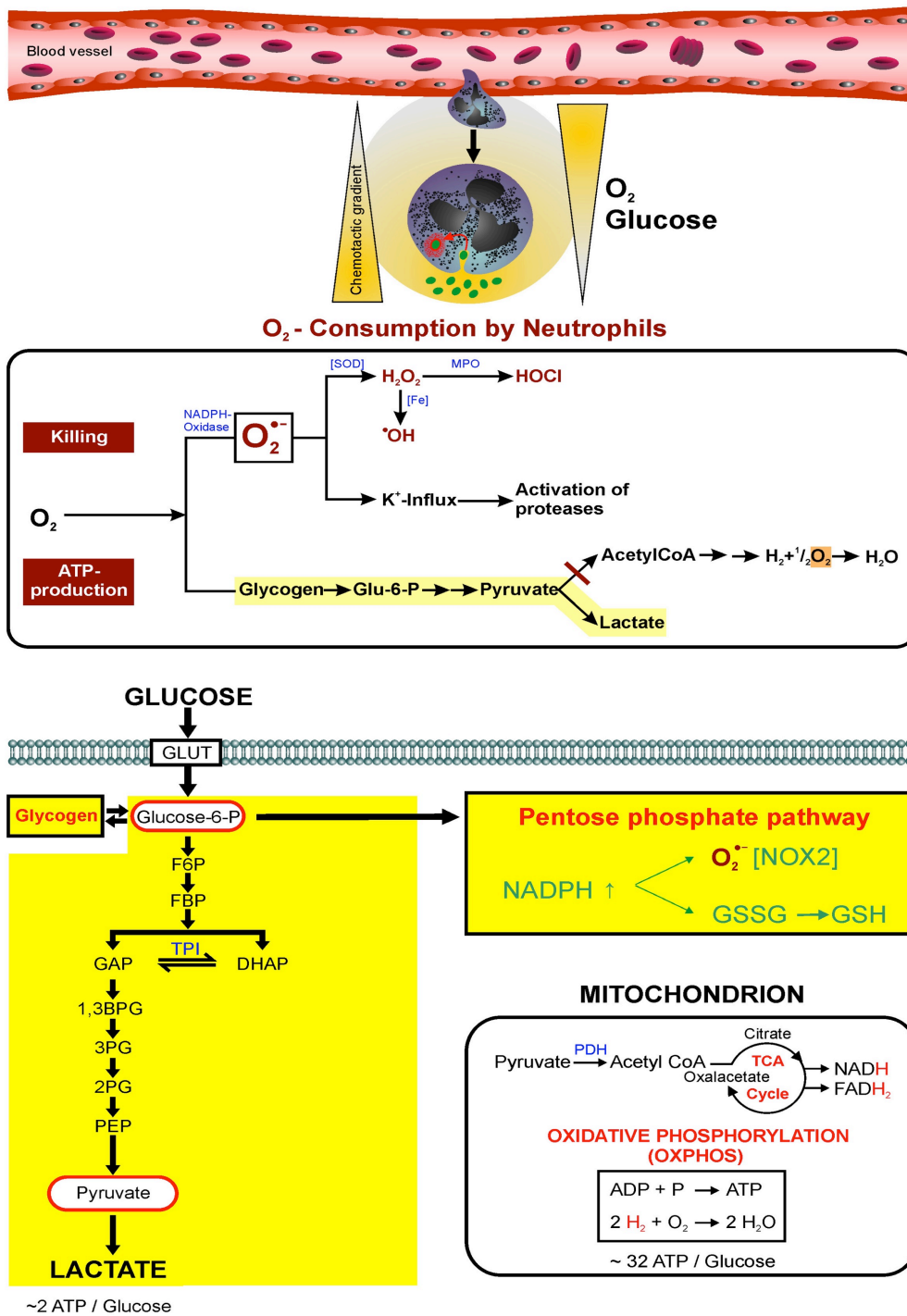


Abb. 7: O₂-Verbrauch und Energiestoffwechsel nach Aktivierung neutrophiler Granulozyten (aus Bruchelt et al, 2014).

Anmerkung: Trotz dessen, dass der neutrophile Granulozyt für das „killing“ der pathogenen Keime viel Energie in Form von ATP benötigt, produziert er ATP nicht über die weitaus effektivere oxidative Phosphorylierung ($C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$, Energiegewinn >30 ATP pro Glukosemolekül), sondern gewinnt seine Energie mit Hilfe der weniger effektiven anaeroben Glykolyse (Glukose \rightarrow Laktat, Energiegewinn 2 ATP pro Glukosemolekül). Bis zu 90% des Sauerstoffverbrauchs aktivierter neutrophiler Granulozyten wird zur Bildung von Wasserstoffperoxid verwendet. NADPH stammt aus dem Pentosephosphatzyklus. Das bei der Entgiftung von H_2O_2 gebildete GSSG wird durch die Glutathion-Reduktase (GR) unter NADPH-Verbrauch wieder zu GSH reduziert.

1.1.4.2 „Killing-Modell“ nach Reeves

Bis vor kurzem galt, dass reaktive Sauerstoffverbindungen, insbesondere die hypochlorige Säure, die wichtigste Rolle beim „killing“ durch neutrophile Granulozyten spielen (Hampton et al, 1998). Es konnte jedoch festgestellt werden, dass bei ca. jedem 2000 bis 4000. Menschen die MPO fehlt und somit kein HOCl gebildet werden kann (Nauseef, 1988). Diese MPO-defizienten Patienten sind jedoch klinisch unauffällig und zeigen – im Gegensatz zu an septischer Granulomatose erkrankten Patienten – in der Regel kein erhöhtes Infektionsrisiko. In dieser Hinsicht interessant ist daher die Beobachtung von Reeves et al (2002). Die Arbeitsgruppe postuliert die zentrale Bedeutung lysosomaler Enzyme, insbesondere die Elastase, für ein effektives „killing“.

Nach der Bildung negativ geladener Superoxidanionen kommt es zu einem Ladungsausgleich in den Phagolysosomen durch Einströmen positiv geladener Ionen (H^+/K^+). Reeves geht hierbei von K^+ -Ionen aus. Positiv geladene inaktive Proteasen (wie beispielsweise Elastase) sind im Lysosom über sulfatierte Glykoproteine an die Membran der azurophilen Granula gebunden. Positiv geladene Teilchen (K^+) machen den sauren pH-Wert alkalisch und ermöglichen so die Freisetzung der Elastase und anderer Proteasen (siehe Abb. 8). Proteasen wie Elastase und andere lytische Enzyme sind somit in der Lage, die phagozytierten Mikroorganismen abzubauen.

Auch an diesem Modell wird die zentrale Bedeutung der NADPH-Oxidase sichtbar. Während das Fehlen der MPO in diesem Modell keine Konsequenzen haben sollte (in Übereinstimmung mit den tatsächlichen Beobachtungen), ist das für die NOX-2 nicht der Fall. Ist ihre Funktion aufgehoben – wie dies bei der septischen Granulomatose (engl. chronic granulomatous disease, CGD) der Fall ist – fehlt den Patienten die Fähigkeit, mit Hilfe der NADPH-Oxidase Mikroorganismen zu eliminieren. Die morphologisch normalen Phagozyten können zwar in normalem Umfang phagozytieren, jedoch nicht effektiv „killen“. Die Anfälligkeit für rezidivierende Infektionen – oftmals ausgelöst durch *Aspergillus fumigatus* und *Staphylococcus aureus* – ist dadurch bei CGD-Patienten groß (Winkelstein et al, 2000). Es existieren insgesamt vier Typen der CGD, die sich durch Mutationen in jeweils einem der vier für das Enzym kodierenden Gene auszeichnen. Am häufigsten ist hierbei die gp91phox-Untereinheit betroffen (etwa 65 % aller CGD-Fälle; betrifft fast ausschließlich Männer; Segal, 2005).

Neuere Untersuchungen legen im Übrigen nahe, dass doch Protonen anstelle von Kaliumionen für den Ladungsausgleich verantwortlich sein müssen (Essin et al, 2009).

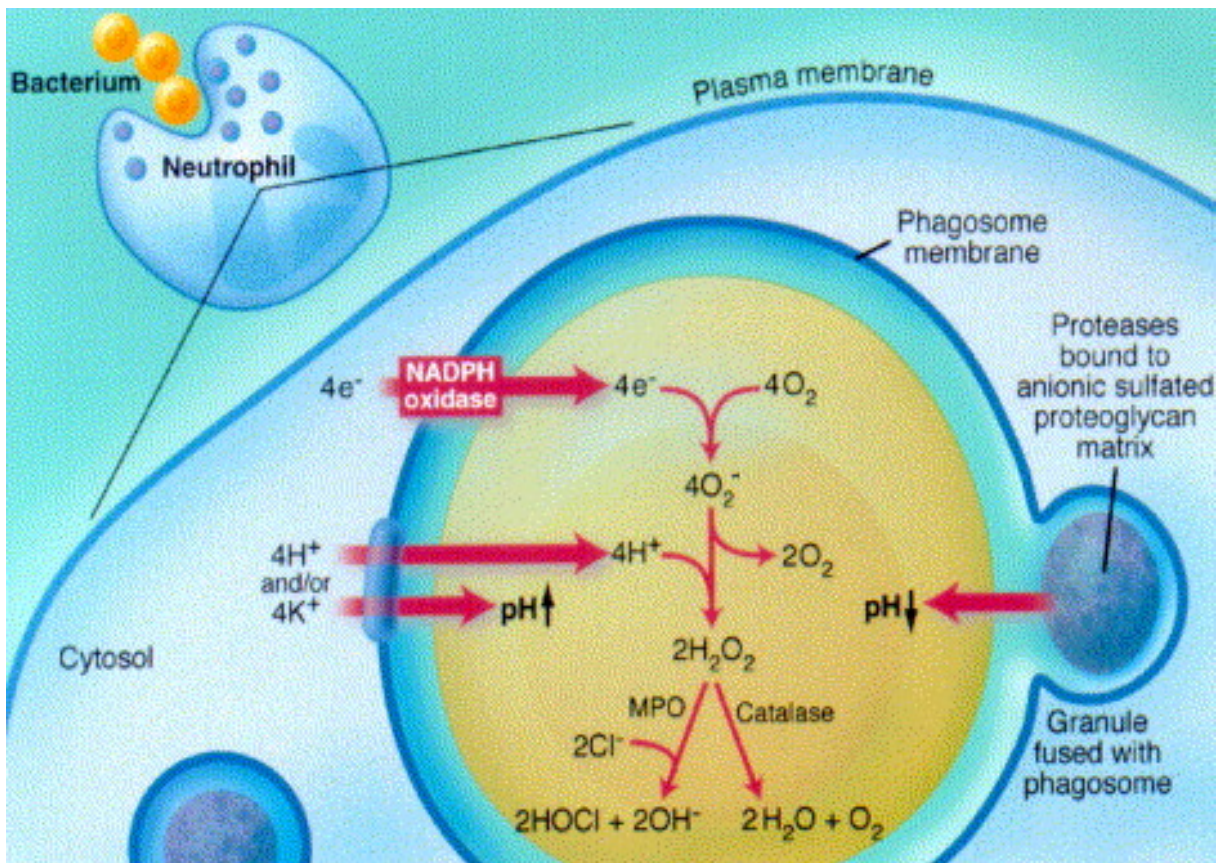


Abb. 8: Schematische Darstellung des Ladungsausgleiches an der phagosomalen Membran beim Ablauf des „oxidativen bursts“ (aus Roos et al, 2003).

Anmerkung: Durch Aktivierung der NADPH-Oxidase wird Superoxidanion (negativ geladen) gebildet. Durch den Einstrom von positiv geladenen Ionen (H^+/K^+) ins Phagolysosom kommt es durch Ladungsausgleich zum pH-Anstieg und in weiterer Folge zur Freisetzung der über Sulfatgruppen an die Membran des Lysosoms gebundenen positiv geladenen Proteasen, wie beispielsweise der Elastase.

1.1.5 „Neutrophil Extrazellulär Traps“ (NETs)

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass neutrophile Granulozyten durch fädige, netzartige Strukturen neben der Phagozytose und der Bildung von ROS einen weiteren Effektormechanismus besitzen, mit dem sie Mikroorganismen abtöten können (Brinkmann et al, 2004; Brinkmann and Zychlinsky, 2007). Werden neutrophile Granulozyten durch Lipopolysaccharide (LPS), IL-8, PMA oder durch

Pathogene wie Shigellen, Streptokokken, Staphylokokken oder durch Candida-Spezies aktiviert, kommt es zur Ausbildung von NETs (siehe Abb. 9).

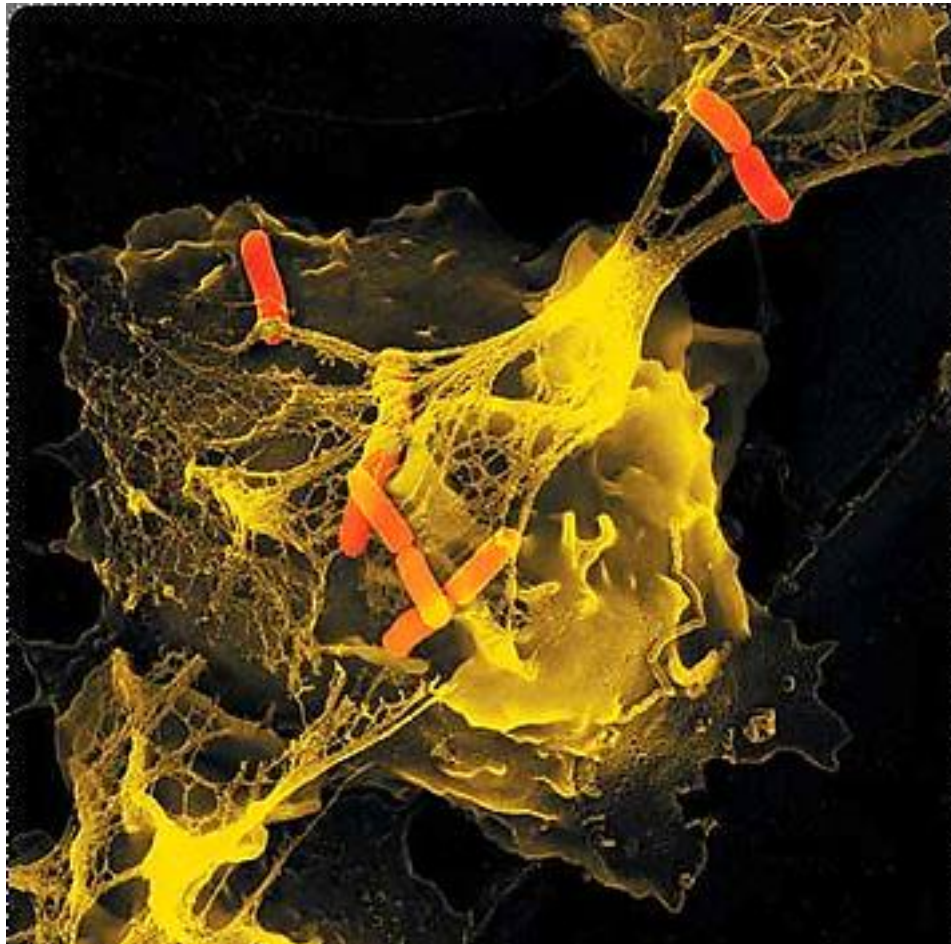


Abb. 9: Ausbildung von NETs (aus Brinkmann, MPI für Infektionsbiologie, Berlin).

Anmerkung: Granulozyten bilden „Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs), die dem mechanischen Einfangen von pathogenen Keimen dienen – seien es Gram-positive bzw. Gram-negative Bakterien oder gar Pilze. In diesem Bild verfangen sich Shigellen, die stäbchenförmigen Erreger der Bakterien-Ruhr, in den netzartigen Strukturen.

NETs bestehen aus glatten, DNA-haltigen Fasern, welche einen Durchmesser von 15-17 nm besitzen, und aus kugelförmigen Abschnitten, welche in größeren Fasern aggregiert sind. Sie bilden ein dreidimensionales Netzwerk um den

neutrophilen Granulozyten aus (Brinkmann et al, 2004). Pathogene – seien es gram-positive, gram-negative Bakterien oder gar Pilze – werden durch die Netzstruktur der NETs eingefangen, wo sie einer hohen Konzentration an antimikrobiellen Molekülen, wie etwa der Neutrophilen Elastase (NE), „bactericidal permeability-increasing Protein“ und Histonen ausgesetzt sind und dadurch abgetötet werden können (Brinkmann et al, 2004; Mayer-Scholl et al, 2005; Urban et al, 2006).

NETs-Proteine sind überwiegend kationisch und dadurch DNA-bindende bakterizide Proteine und bestehen unter anderem aus Chromatin, Histonen (H1, H2A, H2B, H3 und H4) und dem granulären Enzym Elastase. Neuere Studien zeigen, dass das antimikrobiell wirksame Protein Calprotectin – das 40% des zytosolischen Proteins neutrophiler Granulozyten ausmacht – ebenfalls Bestandteil der NETs ist (Urban et al, 2009; Murthy et al, 1993). Calprotectin verleiht NETs die Fähigkeit Candida-Spezies abzutöten (Urban et al, 2009) und verhindert die Ausbreitung von *Aspergillus fumigatus* (McCormick et al, 2010).

Eine Untersuchung mittels Massenspektrometrie hat insgesamt 24 Proteine identifiziert, welche mit NETs assoziiert sind (Urban et al, 2009). Neben den bereits erwähnten u.a. auch Defensine, Proteinase 3, Heparin-bindende-Proteine, Kathepsin G, Lactoferrin, MPO und das „pattern recognition Molekül“ Pentraxin 3 (Jailon et al, 2007).

Wie bereits erwähnt, spielt Calprotectin bei der NETs-abhängigen Abtötung von *Candida albicans* eine essentielle Rolle. Fehlt es in den NETs, verlieren diese ihre fungizide Wirkung. Hingegen wirken bei Bakterien vor allem Histone und Elastase mikrobizid (Brinkmann et al, 2004; Brinkmann and Zychlinsky, 2007). Kommt es bei neutrophilen Granulozyten zur Ausbildung von NETs, führt dies zum Zelltod indem sie einen zelltod-ähnlichen – „Netose“ genannten – Prozess durchwandern, dessen Art des Zelltodes weder der klassischen Apoptose noch der Nekrose entspricht (Fuchs et al, 2007). Durch die Aktivierung verformt sich der Nukleus, es

kommt zu einer Vermischung von Chromatin und Elastase. Die Zellmembran bricht auf, um die Masse in Richtung des Mikroorganismus in den extrazellulären Raum abzugeben. Typischerweise kommt es bei der Bildung von NETs zu einer vollständigen Fragmentierung der Kernhülle und einer Auflösung der meisten Granula. Es kommt so zu einer Vermischung von nukleären und zytoplasmatischen Bestandteilen (Fuchs et al, 2007).

Eine große Rolle bei der Ausbildung von NETs spielt hierbei die Dekondensation des Chromatins, die assoziiert ist mit der Citrullinierung des Histons H3 durch die Peptidylarginine-Deiminase-4 (PAD4; Wang et al, 2004), die im Wesentlichen in reifen Granulozyten enthalten ist. Verdeutlicht wurde dies durch Untersuchungen an PAD4-defizienten Mäusen, die signifikant empfänglicher waren an einer nekrotisierenden Fasziitis durch Gruppe-A-Staphylokokken-Infektion zu erkranken, als die Wildtyp-Mäuse (Li et al, 2010). Verschiedene Studien haben zudem gezeigt, dass die Bildung von ROS durch die NADPH-Oxidase für die Ausbildung von NETs nötig ist (Fuchs et al, 2007). Durch die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und der daraus resultierenden Produktion von ROS, kann die NE aus den azurophilen Granula entweichen und in den Kern translozieren, wo sie spezifische Histone (H2A-H2B-DNA-Komplex, H3, H4) degradiert und so die Chromatindekondensation vorantreibt. Relativ spät transloziert die MPO aus den Granula in den Kern, bindet an das Chromatin und verstärkt die Chromatindekondensation (Papayannopoulos et al, 2010; siehe Abb. 10).

Neutrophile von Patienten mit septischer Granulomatose können keine NETs ausbilden, da für die NETs-Bildung ROS erforderlich sind (Bianchi et al, 2009; Metzler et al, 2010). Somit sind diese Patienten einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt. Ebenso auch Neugeborene, die trotz voller ROS-Produktionsfähigkeit eine reduzierte NETs-Ausbildung haben und so eine reduzierte extrazelluläre bakterizide Aktivität aufzeigen (Yost et al, 2009).

Interessanterweise sind MPO-defiziente Personen eigentlich keiner massiv erhöhten Infektionsgefahr ausgesetzt, obwohl die MPO für die Ausbildung von NETs wesentlich beteiligt ist. Dies hat damit zu tun, dass ROS auch bei MPO-Mangel gebildet werden können und die MPO unabhängig von seiner Enzymaktivität mit der Elastase zusammen die Chromatin-Dekondensation bewirken kann.

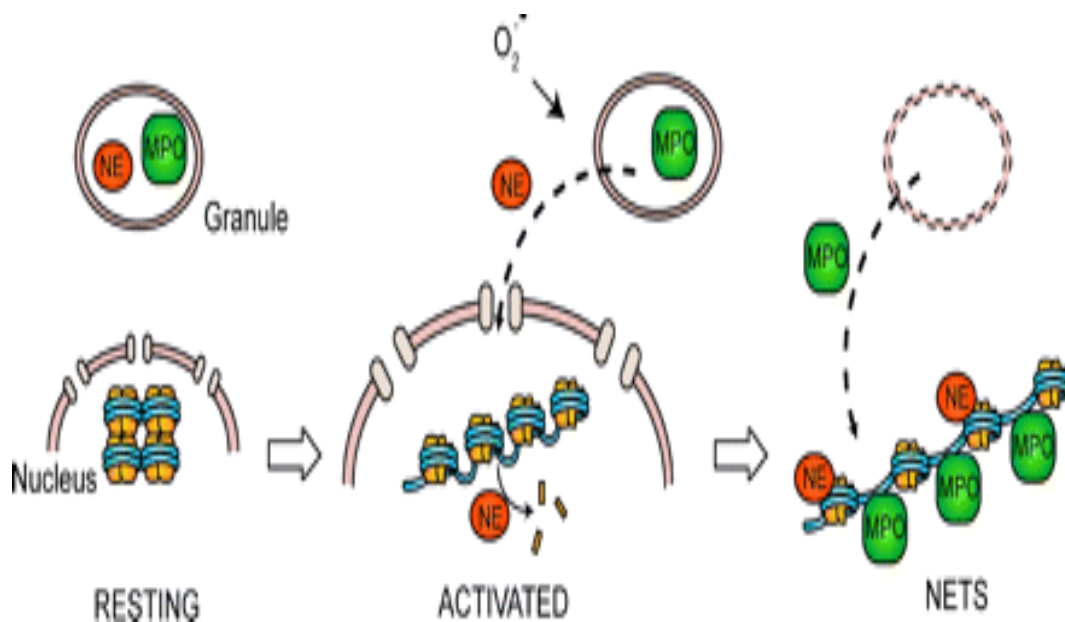


Abb. 10: Ausbildung von NETs mit Hilfe von NE und MPO (aus Papayannopoulos et al, 2010).

Anmerkung: In ruhenden Granulozyten sind die Neutrophilen Elastase (NE) und MPO in azurophilen Granulas gespeichert. Durch die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten werden ROS produziert. Daraufhin beginnt die Kernmembran sich in kettenartige Stücke aufzulösen und auch die Granulamembranen verlieren an Intaktheit, wobei NE den Granulas entweicht und in den Zellkern gelangt. Die NE vermag Histone zu spalten und vermittelt dadurch den Prozess der Dekondensation. Die Kerne verlieren ihr typisches gelapptes Erscheinungsbild, runden sich ab und der Kerninhalt mischt sich mit dem Inhalt der Granula. MPO bindet hierbei Chromatin und trägt zur weiteren Dekondensation bei. Letzten Endes ist keine Intaktheit des Kerns und der Granula mehr zu erkennen. Schließlich wird der neutrophile Granulozyt rund, kontrahiert sich und entlässt die NETs in den extrazellulären Raum.

Auch haben einige Pathogene Strategien entwickelt, um dem „killing“ durch NETs zu entgehen. So besitzen Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* sowie *Staphylococcus aureus* die Fähigkeit DNase zu produzieren und können dadurch das DNA-Gerüst zerstören (Beiter et al, 2006; Buchanan et al, 2006).

Ferner lassen aktuelle Untersuchungen vermuten, dass NETs eine größere Rolle in der Pathogenese von autoinflammatorischen Erkrankungen spielen (Marcos et al, 2011; Fuchs et al, 2010; Brill et al, 2011; Borissoff and ten Cate, 2011). Beispielsweise kann durch die Freilegung extrazellulärer Histonkomplexe ein Schub eines Lupus erythematodes ausgelöst werden (Hakkim et al, 2010). So werden NETs durch DNAsen abgebaut. Patienten mit der Erkrankung eines systemischen Lupus erythematodes haben Antikörper, die gegen DNA-assoziierte Proteine gerichtet sind, wie sie in NETs zu finden sind. Vor kurzem wurde bei Lupus-Patienten eine Untergruppe mit einer geringeren Aktivität an DNase-1 identifiziert, einem im Plasma befindlichen NET-abbauenden Protein. Diese Patienten sind einem erhöhten Lupusnephritis-Risiko ausgesetzt, was die proinflammatorische Eigenschaft von NETs unterstreicht (Hakkim et al, 2010).

Des Weiteren wurde ein direkter Zusammenhang zwischen neutrophilen Granulozyten und mikrovaskulären thrombotischen Prozessen aufgezeigt. Die Haupteffektoren der mikrobiziden Abwehr der neutrophilen Granulozyten, die NE und das Cathepsin G, können im Zusammenspiel mit den NETs die Koagulation und das intravaskuläre Thrombuswachstum in vivo fördern (Massberg et al, 2010).

Auch scheinen NETs neusten Publikationen zu Folge eine Rolle in der Tumormetastasierung zu spielen (Cools-Lartigue et al, 2013). Abbildung 11 gibt zusammenfassend einen Überblick über die vielfältigen Aspekte der NETs-Bildung und Konsequenzen seiner Inhibition.

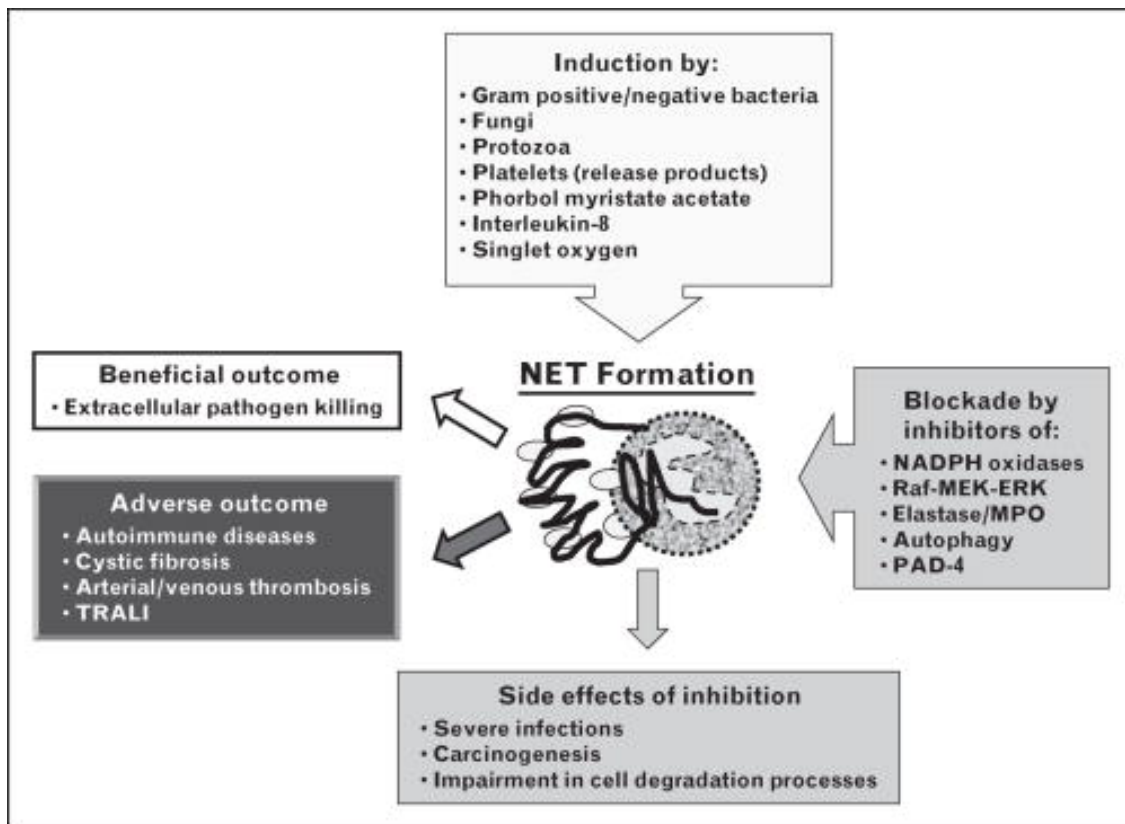


Abb. 11: Folgen einer NETs-Bildung und Möglichkeiten der Inhibition (aus Saffarzadeh and Preissner, 2012).

Anmerkung: NETs-Bildung kann durch verschiedene Agonisten induziert werden und ist einerseits elementar für ein effizientes Abtöten von pathogenen Keimen. Jedoch kann eine übermäßig gesteigerte NETs-Bildung Autoimmunerkrankungen induzieren, oder auch Thromboserkrankungen hervorrufen. Wird eine NETs-Bildung geblockt, kann dies ein Risikofaktor für eine Krebserkrankung darstellen und mit anderen Zellvorgängen interferieren.

Abk.: MPO, Myeloperoxidase; PAD-4, Peptidylarginine Deiminase-4; TRALI, transfusion-related acute lung injury.

1.1.6 Aspekte im Rahmen der Apoptose neutrophiler Granulozyten

Unter physiologischen Bedingungen ist die Lebenszeit von Granulozyten über die Apoptose geregelt. Die Apoptose wird durch die Abwesenheit von pro-Überlebensfaktoren indiziert.

1.1.6.1 Apoptose – Allgemein

Der als Apoptose bezeichnete programmierte Zelltod stellt einen wichtigen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase in vielzelligen Organismen dar, über den überschüssige oder potenziell schädliche Zellen entfernt werden können und wurde erstmals 1972 von Kerr, Wyllie und Currie beschrieben (Kerr et al, 1972). Es gibt zwei Hauptarten von Zellsterben: die Nekrose und die Apoptose.

Bei der Nekrose schwillt die Zelle an und zerplatzt unkontrolliert. Zytoplasma, DNA und Zellorganelle gelangen hierbei ins Außenmedium und werden dort von Phagozyten in einer Entzündungsreaktion beseitigt.

Bei der Apoptose handelt es sich hingegen um einen im Erbgut programmierten Selbsttötungsmechanismus, der unter aktiver zellulärer Kontrolle abläuft (Steller et al, 1995). Morphologisch zeichnet sich die Apoptose im Gegensatz zur Nekrose durch Zellschrumpfung bei erhaltenen Membranstrukturen, sowie durch Chromatinkondensation aus. Die DNA wird aufgrund erhöhter Endonukleaseaktivität in kleine Fragmente definierter Größe zerteilt (Gold et al, 2001; Kuschinski and Gillardon, 2000; Wyllie et al, 1980). Membranvesikel mit Zellinhalt („apoptotic bodies“) schnüren sich ab, die von Makrophagen phagozytiert werden. Diese Autolyse erfolgt ohne Freisetzung proinflammatorischer Enzyme, und ist somit auch nicht von einer sekundären Entzündungsreaktion gefolgt.

Die Apoptose ist ein bedeutender Mechanismus in der Zellhomöostase neutrophiler Granulozyten, um ältere – nicht mehr „funktionsfähige“ – Neutrophile zu eliminieren, was durch Apoptoseinduktion mit nachfolgender Phagozytose durch Makrophagen geschieht. Auch bei vielen Krankheitsbildern kommt der Apoptose große Bedeutung zu. Beispielhaft sei die rheumatoide Arthritis genannt. Hier liegt in der Frühphase der Krankheit eine verzögerte Apoptose vor, was an der Cytokin-Zusammensetzung in der Synovial-Flüssigkeit aus vorwiegend antiapoptotischen Cytokinen (IL-2, IL-4, IL-15 und GM-CSF) liegen könnte (Raza et al, 2006).

Verschiedene unspezifische und spezifische Stimuli wie ionisierende Strahlen, der Entzug von Wachstumsfaktoren oder ROS können das Apoptoseprogramm einer Zelle aktivieren (Lewen et al, 2000; Warren et al, 2000; Jacobson et al, 1997). Es existieren hierfür zwei verschiedene Signalkaskaden (siehe Abb. 12).

Der extrinsische Weg benötigt sogenannte Todesrezeptoren und führt zur Fas-vermittelten Caspase-8-Aktivierung. Ein Beispiel aus der Familie der Todesrezeptoren ist der Fas-Rezeptor (CD95). Der intrinsische Weg wird beispielsweise durch oxidativen Stress der Zelle ausgelöst und führt Mitochondrien-abhängig zur Aktivierung der Caspase 9 (Ueda et al, 2002). Letzten Endes führen beide Wege in die sogenannte Caspase-Kaskade. Es wird angenommen, dass es sich bei der Apoptose um einen relativ raschen, innerhalb von 4-5 Stunden ablaufenden Prozess handelt (Bursch et al, 1990).

Zu den Apoptoserezeptoren gehören z.B. der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNF-R1), die TNF-related-Rezeptoren 1 und 2 und auch das ebenfalls zur TNF-Rezeptorfamilie zählende Fas-Protein (Apo1/CD95). Es handelt sich hierbei um transmembrane Proteine, die nach Aktivierung an ihrer zytosolischen Seite spezifische Proteininteraktionen in Gang setzen. Durch diesen als „death inducing signaling complex (DISC)“ bezeichneten Komplex, werden Caspasen aktiviert,

welche die Spaltung wichtiger Regulator- und Strukturproteine bewirken und damit die für die Apoptose typische DNS-Fragmentation hervorrufen.

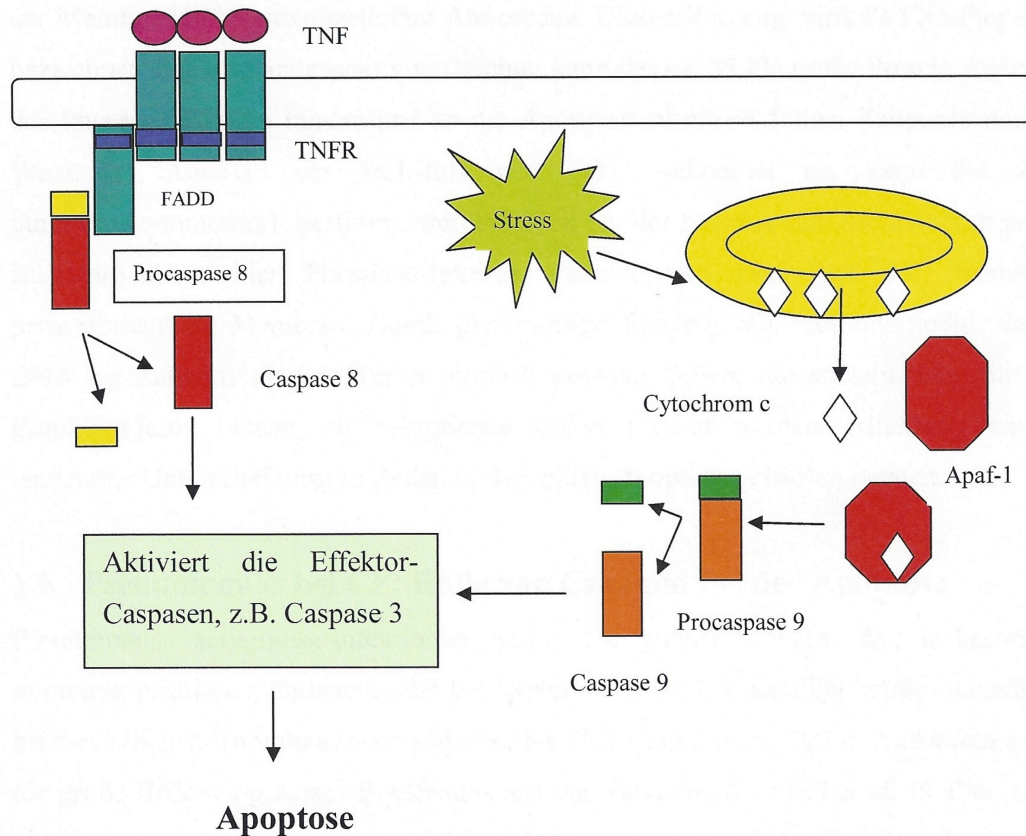


Abb. 12: Apoptosewege (aus Löffler, 2005).

Anmerkung: Apoptose kann durch eine Reihe von Zellschädigungen, z.B. durch Radikale, Bestrahlung, Toxine oder Hypoxie, sowie durch spezifische Signale ausgelöst werden. Der extrinsische Weg führt durch Aktivierung der sogenannten Todesrezeptoren (z.B. TNF- α -Rezeptor) zur Aktivierung von Caspase 8. Beim intrinsischen Weg bewirkt Zellstress eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, das an das Adaptorprotein Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) bindet. Dies führt zur Aktivierung der Caspase 9, die wiederum Caspase 3 aktiviert, die für viele der bei der Apoptose ablaufenden Zellveränderungen verantwortlich ist.

Beim extrinsischen Weg leiten so extrazelluläre Signale wie TNF, Apo oder Fas durch Bindung an einen Rezeptor der TNF-Rezeptor-Familie wie CD95 die Apoptose ein. Die CD95-Aktivierung bewirkt eine Spaltung von Sphingomyelin in

der Zellmembran. Ceramid kann freigesetzt werden und so die Apoptose einleiten. Auch P53 bewirkt eine Spaltung von Sphingomyelin mit konsekutivem Anstieg der Superoxidanionkonzentration.

Beim intrinsischen Weg bewirken nichtrezeptormediierte Auslöser wie freie Radikale die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien durch Bildung eines Membranporenkomplexes in der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch ebenfalls die Aktivierung der Caspasen ausgelöst wird. Cytochrom c bindet an Apaf 1, das nicht ATP-abhängig oligomerisiert wird. Dadurch wird die Bindung von Procaspase 9 an Apaf 1 ermöglicht. Es kommt zur Bildung des Apoptosoms und nachfolgender Aktivierung von Caspase 9 und letztentlichem Abbau der Zelle.

1.1.6.2 Aspekte der Neutrophilen-Apoptose

Verschiedene Mechanismen, die den neutrophilen Granulozyten in die Apoptose führen, sind in der Literatur beschrieben. Das Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) homologe antiapoptotische Mcl-1 (Myeloid cell leukemia sequence 1) schützt neutrophile Granulozyten vor einer Apoptose über den intrinsischen Weg und ist wahrscheinlich verantwortlich für die limitierte Überlebenszeit neutrophiler Granulozyten, da das Molekül eine kurze Halbwertszeit aufweist. Eine zentrale Bedeutung kommt hierbei den Cyclin-abhängigen Kinasen (engl. cyclin-dependent kinases, CDKs) zu, einem Hauptregulator des Mcl-1-Levels (besonders CDK9; Hampson, Hazeldine and Lord, 2013).

In Abwesenheit von Zellstress wird die Integrität der Mitochondrien durch eine Balance zwischen dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 und proapoptotischen Proteinen wie BAX, BIM und BID aufrechterhalten. Bcl-2 ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert und verhindert, dass sich diese proapoptotischen Moleküle in dieser Membran oligomerisieren. Diese Balance liegt beim Neutrophilen eher auf der Seite der pro-apoptotischen Seite. Neuere Untersuchungen belegen zudem, dass GM-CSF und IL-3 BIM hochregulieren

können, was als eine Art physiologische Bremse der Zytokin-verlängerten Lebenszeit neutrophiler Granulozyten angesehen werden kann (Andina et al, 2009).

Ferner ist im Hinblick der Apoptose bei Neutrophilen der duale Effekt von TNF- α interessant: einerseits vermittelt TNF- α eine „frühe“ Apoptose über den extrinsischen Weg, vermittelt jedoch zudem eine „späte“ Lebensverlängerung des Zellzyklus über den NF- κ B-Pathway (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer; Kim et al, 2006). ROS ist essentiell für die TNF- α -induzierte Apoptose neutrophiler Granulozyten. Letztendlich dürfte der dichotome Effekt durch die TNF-Rezeptor-Stimulation durch den Level an ROS erklärbar sein: Granulozyten-Stimulation durch geringe Konzentration an TNF- α resultiert in eine niedrige Konzentration an ROS in den Granulozyten und wirkt letztendlich als „survival-factor“, wohingegen eine höhere Konzentration von TNF- α zu einer höheren Konzentration an ROS führt und das Absterben der Granulozyten einleitet (Geering et al, 2011).

Besondere Bedeutung bezüglich der Neutrophilen-Überlebenszeit kommt auch den anderen Immunzellen zu. Regulatorische T-Zellen (Tregs) und NK-Zellen sind in der Lage direkt Einfluss auf die Neutrophilen-Apoptose zu nehmen (Thorén et al, 2012).

Auch ist das wissenschaftliche Interesse an Sphingolipiden in den letzten Jahren gestiegen. Dies war bedingt durch die Erkenntnis, dass Sphingolipide nicht nur als Membranbausteine für die Zelle dienen, sondern auch als zentrale Signalmoleküle wirken können. Die Ceramide waren die ersten Sphingolipide, deren funktionelle Beteiligung an der Apoptose erkannt wurde. Im Gegensatz zum Ceramid wirkt Sphingosin-1-phosphat (S1P) mitogen bzw. antiapoptotisch. S1P gilt daher als intrazellulärer Gegenspieler von Ceramid und das intrazelluläre Konzentrationsverhältnis zwischen Ceramiden einerseits und S1P andererseits entscheidet über das Schicksal der Zelle. Die pro- bzw. antiapoptotischen

Eigenschaften der Sphingolipide stehen im Fokus bei der Entwicklung neuer antikanzerogener Medikamente.

Des Weiteren erwähnenswert im Zusammenhang mit der Apoptose von Granulozyten sind auch Untersuchungen, die zeigen, dass es über die Bildung von ROS zu einer Aktivierung der sauren Sphingomyelinase kommt. Dabei kommt es primär zu einem Glutathionabfall durch die ROS und in weiterer Folge durch Cystein-Oxidation zur Aktivierung der sauren Sphingomyelinase. Diese spaltet aus Sphingomyelin Ceramid ab, das die Apoptose auslöst. Interessanterweise hemmt das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin die Ceramidbildung und kann so einen apoptotischen Zelltod verhindern (Kemmler, 2012; siehe Abb. 13).

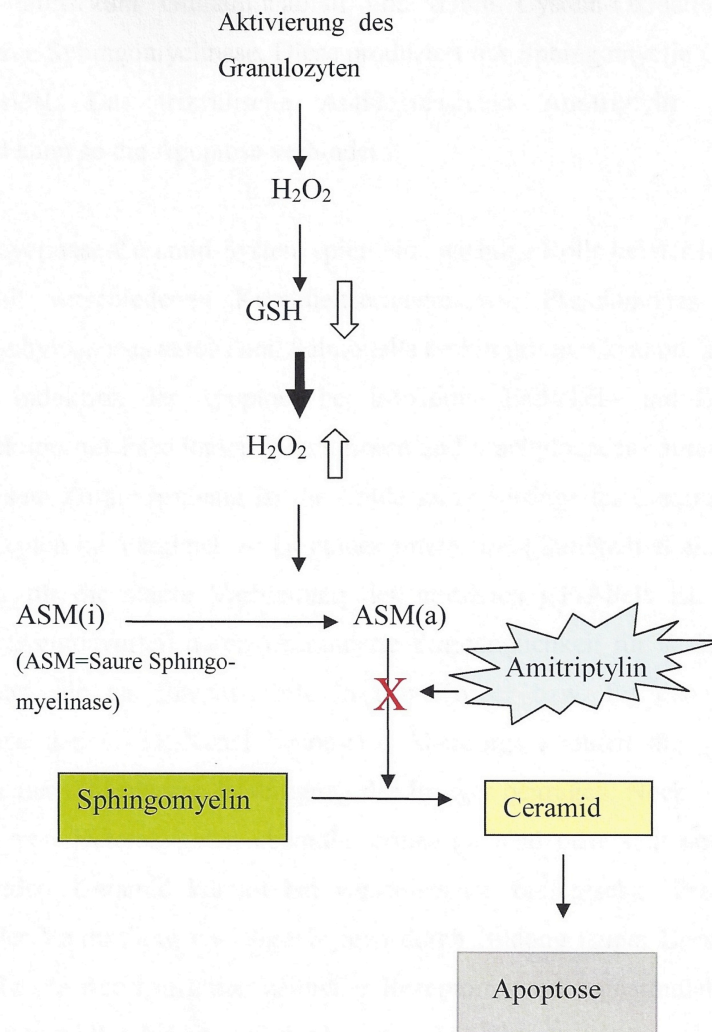


Abb. 13: Apoptoseweg über Ceramid bei neutrophilen Granulozyten (aus Kemmler, 2012).

Anmerkung: Nach Anstieg reaktiver Sauerstoffverbindungen und konsekutiven Glutathionabfall und durch Cystein-Oxidation kommt es zu einer Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (ASM), die Sphingomyelin in Ceramid umwandelt und dadurch eine Apoptose neutrophiler Granulozyten auslöst. Interessanterweise vermag das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin die Ceramidbildung zu hemmen und kann dadurch die Apoptose verhindern.

Abk.: ASM= saure Sphingomyelinase, i= inaktiv, a= aktiv; GSH= Glutathion.

1.1.6.3 Das anti-inflammatorische Potenzial apoptotischer neutrophiler Granulozyten

Auch in Entzündungsvorgängen spielt die Apoptose bei neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle. Ein gehemmter Apoptoseprozess bei Neutrophilen führt zu autoinflammatorischen Erkrankungen wie z.B. rheumatoide Arthritis oder Lupus erythematodes (Raza et al, 2006). Dadurch ergibt sich ein Potenzial einer Behandlung solcher Erkrankungen mit Medikamenten, die spezifisch eine Apoptose neutrophiler Granulozyten induzieren können. In Tierversuchen mit Mäusen konnten durch Injektionen von apoptotischen Neutrophilen ein durch Lipopolysaccharid-induzierter Tod durch septischen Schock verhindert werden (Ren et al, 2008). Untersuchungen durch in-vitro-Experimente belegen, dass die Apoptose neutrophiler Granulozyten einen entzündungshemmenden Effekt bewirkt: apoptotische Granulozyten verlieren beispielsweise funktionelle Fähigkeiten wie Degranulation, werden von Makrophagen phagozytiert und so kann verhindert werden, dass umgebendes Gewebe „angegriffen“ wird. Ferner führt die Phagozytose apoptotischer Granulozyten durch Makrophagen auch zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und zu einer gesteigerten Freisetzung entzündungshemmender Substanzen (Haslett, 1999; Dransfield et al, 2005). Die Arbeitsgruppe um Godson hat hierbei eine Freisetzung von Annexin 1 durch apoptotische Zellen festgestellt (Scannell et al, 2007). Ferner zeigte sich eine Immunmodulation von phagozytierenden Makrophagen durch Produktion von IL-10 und dem transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β), allesamt Zytokine, die eine antiinflammatorische Wirkung auf TH1-Zellen aufweisen und im Zusammenhang mit Heilungsprozessen und Fibrosierung von Gewebe von relevanter Bedeutung sind (Scannell et al, 2007; Miller et al, 2006).

Auch die bereits Eingangs des Kapitel beschriebenen CDKs bieten durch die Fähigkeit der Regulierung des antiapoptotischen Levels an Mcl-1 ein therapeutisches Potenzial (Wang et al, 2012). So zeigten CDKs-Inhibitoren wie R-

Roscovitine und Flavopiridol in mehreren Tierversuchen einen deutlichen antiinflammatorischen Effekt (Leitch et al, 2012; Sekine et al, 2008).

Gegenteilig kann experimentell die Apoptose von Neutrophilen durch Entzündungsmediatoren wie Interleukine, IFN- γ , G-CSF und GM-CSF auch hinausgezögert werden, verhindern lässt sie sich jedoch nicht. Neben dem kennzeichnenden Verlust von CD16 weisen die Zellen hierbei eine verminderte Expression auch anderer Oberflächenmoleküle wie CD31, CD50 und CD66 auf (Cohen, 1993; Edwards et al, 2003).

1.1.7 Variable Immunrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten

Neueste Untersuchungen legen nahe, dass eine Subpopulation neutrophiler Granulozyten variable Immunrezeptoren ähnlich dem des T-Zellrezeptors (T-cell-receptor, TCR) ausbilden. Bislang gingen Immunologen davon aus, dass Granulozyten – als sehr rasch agierendes Verteidigungssystem – lediglich unflexible Abwehrmechanismen besitzen und somit die Säule des unspezifischen Immunsystems ausbilden. Es wurde postuliert, dass variable Rezeptoren im Rahmen der Immunantwort auf T-Zellen und B-Zellen – also auf Zellen des adaptiven Immunsystems – beschränkt sind (Janeway and Medzhitov, 2002).

Um nachzuweisen, dass neutrophile Granulozyten variable Immunrezeptoren exprimieren, wurden die Zellen nach Anfertigung von Zytospinpräparaten immunhistochemisch auf TCR- α - und TCR- β -Expression untersucht. Zusätzlich wurden die Zellen nach Färbung mit Antikörpern auf TCR- α - und TCR- β -Expression durchflusszytometrisch untersucht. So konnte festgestellt werden, dass eine Subpopulation von 5-8% neutrophiler Granulozyten TCR-Moleküle und den RAG1/RAG2-Rekombinase-Komplex exprimieren. Ferner ist dieser Rezeptor nicht nur variabel, sondern auch funktionsfähig. Durch Stimulation dieser TCR auf neutrophilen Granulozyten kann die Apoptoserate gesenkt und IL-8 vermehrt sekretiert werden (Puellmann et al, 2006).

Durch diese Erkenntnisse ist ein ganz neuer Aspekt für das Verständnis des neutrophilen Granulozyten aufgezeigt worden, da Subpopulationen von Neutrophilen von nun an nicht nur der angeborenen, sondern auch der adaptiven Immunantwort zuzuordnen sind.

1.1.8 Myeloide Suppressorzellen und Tumor-induzierte Immunsuppression

Obwohl auf allen humanen Karzinomen Tumorantigene detektiert wurden, die im Prinzip eine Immunantwort auslösen können (Schreiber and Rowley, 2008), bringen oftmals Immuntherapiestrategien nicht die gewünschten Erfolge. Tumore fördern aktiv Toleranzinduktion im Immunsystem und zahlreiche immunsupprimierende Mechanismen von Seiten der Tumorzellen stehen der Immunerkennung maligner Neoplasien entgegen (Rabinovich, Gabrilovich and Sotomayor, 2007). Neben Veränderungen auf Tumorzellen selbst, führen eine Vielzahl an Mechanismen zu einer verstärkten Immunsuppression, fördern dadurch Tumorprogression und verhindern eine Immun-Tumor-Abwehr, insbesondere auch durch Rekrutierung immunsuppressiver Zellen.

Myeloide Suppressorzellen ("Myeloid Derived Suppressor Cells", MDSC), als auch regulatorische T-Zellen haben physiologisch die Aufgabe während einer akuten Immunreaktion Gewebeschäden zu verhindern, die sonst durch eine fortwährende Entzündungsreaktion ausgelöst werden würden. Dies geschieht durch kurzzeitige Anreicherung von Zellpopulationen, die in der Lage sind, die T-Zell-Funktion herunter zu regulieren und nach Eliminierung des Antigens die Immunreaktion beenden zu können (Rieber et al, 2013; Serafini et al, 2006; Vieweg et al, 2007). MDSC sind Zellen myeloider Abstammung und sind an eben diesen Rückkopplungsmechanismen beteiligt. Diese sehr heterogene Population beinhaltet unreife Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien (Serafini et al, 2006). MDSC sind besonders im Knochenmark lokalisiert, befinden sich aber auch in der Milz und im Blut (Serafini et al, 2006; Sinha et al, 2008). Tumorwachstum, Infektion oder

andere Veränderungen im Immunsystem können ein verändertes Zytokinprofil bewirken. Dieses Zytokinprofil bewirkt synergistisch die Migration von MDSC aus dem Knochenmark in die Milz, von dort in Lymphknoten und ins Tumorgewebe (Serafini et al, 2006; Marigo et al, 2008).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über Faktoren, die an der MDSC-Rekrutierung in lymphatische Organe bzw. ihrer suppressiven Wirkung auf T-Zellen beteiligt sind.

Tab. 1: An der Rekrutierung von MDSC beteiligte tumorassoziierte Faktoren.

| Tumorassoziierte Faktoren | Literatur |
|----------------------------------|------------------------|
| ENA-78 | Yang et al, 2008 |
| G-CSF | Sawanobori et al, 2008 |
| GM-CSF | Filipazzi et al, 2007 |
| IFN-gamma | Baniyash 2004 |
| IL-6 | Pan et al, 2006 |
| IL-10 | Chen et al, 2001 |
| IL-12 | Li et al, 2004 |
| IL-13 | Terabe et al, 2004 |
| Prostaglandine | Sinha et al, 2007 |
| VEGF | Melani et al, 2003 |

Ferner konnte nachgewiesen werden, dass MDSC selbst eine Reihe wichtiger immunmodulatorischer Zytokine ausschütten, die zu ihrer eigenen Verbreitung sowie zu ihrer immunsuppressorischen Wirkung auf T-Lymphozyten beitragen. Tabelle 2 stellt die bisher bekannten – von myeloiden Suppressorzellen sezernierten – Zytokine zusammen.

Tab. 2: Von MDSC sezernierte Zytokine.

| MDSC-sezernierte Zytokine | Literatur |
|----------------------------------|----------------------|
| IFN-gamma | Baniyash 2004 |
| IL-10 | Chen et al., 2001 |
| IL-13 | Gallina et al., 2006 |
| TGF-beta | Terabe et al., 2003 |
| TNF-alpha | Umemura et al., 2008 |

MDSC erleichtern die Transformation prämaligener Zellen und vermitteln Tumorprogression und Metastasierung, indem es das angeborene wie auch das adaptive Immunsystem zu unterdrücken versteht. Die Induktion von MDSC durch ein proinflammatorisches Milieu stellt eine Verbindung dar, wie chronische Entzündungsvorgänge zu der Entstehung und Progression einer malignen Erkrankung beitragen. So führt eine IFN- γ -Sekretion im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion durch aktivierte T-Zellen zu einer Rekrutierung von MDSC, die über verschiedene Mechanismen eine weitere T-Zell-Überaktivierung verhindern (Sercan et al, 2006). Bei dauerhafter Antigenstimulation im Rahmen einer chronischen Entzündungsreaktion wird kontinuierlich IFN- γ ausgeschüttet. Dadurch reichern sich MDSC an, da das entzündungsauslösende Antigen nicht eliminiert werden kann (Baniyash 2004). Dieser Prozess wird beispielsweise durch die inflammatorischen S100-Proteine induziert (Cheng et al, 2008; Sinha et al, 2008).

So könnte in Zukunft der Elimination von MDSC eine zentrale Rolle für Krebstherapien zukommen, um optimale Voraussetzungen für eine Immuntherapie zu schaffen. Auch stellt die Retention und die Limitierung einer Akkumulation von MDSC im Rahmen chronischer Entzündungsvorgängen eine Möglichkeit dar, das Risiko einer Krebsentstehung zu verringern (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

| | |
|---|---------------|
| Adenosin-5'-triphosphat (ATP) | Sigma-Aldrich |
| Ammoniumsulfat | Roth |
| AMPUWA | Fresenius |
| Arabinoxylan (Biobran®/MGN-3) | Braun |
| D(+) Glukose | Sigma-Aldrich |
| D-Glukose Kit | Roche |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Sigma-Aldrich |
| Di-Natriumhydrogenphosphat (Dihydrat) | Merck |
| 5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) | Sigma-Aldrich |
| Essigsäure (100%) | Merck |
| Essigsäure, p.a. 96% | Merck |
| Ethanol | Merck |
| Glutathion (oxidiert; GSSG) | Serva |
| Glutathion (reduziert; GSH) | Sigma-Aldrich |
| Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF, Neupogen®) | Amgen |
| Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) | Behring |
| Histopaque® 1119 und 1077 | Sigma-Aldrich |
| Kaliumhydrogencarbonat | Merck |
| Kalilauge (KOH), p.a., 1 M | Merck |
| L-Milchsäure Kit | Roche |
| Luminol | Sigma-Aldrich |
| Magnesiumsulfat (MgSO ₄) | Merck |
| Medunasal®-Heparin 500 I.U. [100 I.U./ml] | Meduna |

| | |
|--|---------------|
| NaOH | Merck |
| Natriumacetat | Merck |
| Natriumdihydrogenphosphat (Monohydrat) | Merck |
| Natrium-EDTA (Dihydrat) | Sigma-Aldrich |
| Nicotin-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADP(H)) | Sigma-Aldrich |
| Perchlorsäure, p.a.70% | Merck |
| Phosphate Buffered Saline (PBS) | |
| mit Ca ⁺⁺ und Mg ⁺⁺ | Gibco |
| ohne Ca ⁺⁺ und Mg ⁺⁺ | Gibco |
| 5-Sulfosalicylsäure (SSA) | Merck |
| Triethanolamin | Sigma-Aldrich |
| Triethanolamin-hydrochlorid | Merck |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich |
| 2-Vinylpyridin | Sigma-Aldrich |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30% | Merck |
| Zymosan A | Sigma-Aldrich |

2.1.2 Enzyme

| | |
|----------------------------------|---------------|
| Glutathionreductase (147 U/mg) | Sigma-Aldrich |
| Glukoseoxidase (10.000 U/5,5 ml) | Sigma-Aldrich |
| Hexokinase (≥130 U/mg protein) | Sigma-Aldrich |

2.1.3 Geräte

| | |
|--------------------------------|-----------|
| ADVIA 120 | Siemens |
| Analysenwaage, Analytic AC210S | Sartorius |
| Brutschrank, Heraeus | Heraeus |

| | |
|--|---------------------|
| Feinwaage, MC1 | Sartorius |
| Laborwaage, E400 D | Ohaus |
| Lichtmikroskop, 473047 | Zeiss |
| Luminometer, Tropix TR717 | Perkin Elmer |
| Luminometer-Software, WinGlow | Perkin Elmer |
| Magnetrührer, MR 2002 | Heidolph |
| Multipette (10-100 µl; 100-1000 µl) | Eppendorf |
| pH-Meter, pH 535 MultiCal | WTW-Weilheim |
| Photometer, Ultraspec Plus | LKB Biochrom |
| Pipettierhilfe, Pipettboy Plus | Integra Biosciences |
| Plattenschüttler | Heidolph |
| Sicherheitswerkbank (steril), HeraSafe | Heraeus |
| Tiefkühlschränke | Liebherr |
| Ultraschallgerät, Sonifier B-12 Cell Disrupter | Branson Sonic Power |
| Vortexer, Reax top (Mischgerät) | Heidolph |
| Wasserbad | Kottermann |
| Zentrifugen | |
| Rotixa 50 RS | Hettich |
| Mikro 22 R | Hettich |

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Es wurden Materialien der gängigen Hersteller benutzt.

| | |
|--|-----------|
| Einwegpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml) | Costar |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml) | Eppendorf |
| Pipettenspitzen (10 µl) | Biozym |
| Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl) | Sarstedt |
| BD-Falcon 6 ml Polystyrene Round Bottom Tube | |

| | |
|---------------------------------------|----------------------------|
| (FACS-Röhrchen) | BD-Biosciences |
| Halb-Mikroküvetten | Greiner |
| Kanülen, steril | Braun |
| Parafilm | Serva |
| Objektträger ca. 77 x 26 mm | R. Langenbrinck |
| Softasept N (Desinfektionsmittel) | Braun |
| Spritzen (1ml, 5 ml, 20 ml, 50 ml) | Braun |
| Sterile Einmalpipetten (5, 10, 25 ml) | Costar Zentrifugenröhrchen |
| (15, 50 ml) | Falcon |
| 96 Well Platte, blickdicht | Wallac |
| 96 Well Platte Flachboden | Corning |
| 96 Well Platte Rundboden | Corning |

2.1.5 Zelllinien

Für die Versuche wurden zwei humane, GD₂-positive Neuroblastomzelllinien verwendet:

NB1: GD₂-positive humane Neuroblastomzelllinie mit nicht eindeutiger Herkunft.

NB2 (Kelly): GD₂-positive humane Neuroblastomzelllinie von DSMZ, Braunschweig (Preis et al, 1988).

2.1.6 Antikörper

AK⁺: Antikörper gegen das Gangliosid GD₂, mit Komplement-Bindungsstelle; CHIMERIC Antibody CH 14.18, Subclass: Human IgG/Kappa, 6mg/ml; erhalten von R. Handgretinger.

AK⁻: Antikörper gegen das Gangliosid GD₂, ohne Komplement-Bindungsstelle

- a) Hu 14.18 MoAb Development 8.6 mg/ml # 5/6 in PBS, 100mM Arginine 0.03% Tween-80, pH 6.0; erhalten von R. Handgretinger
- b) Hu 14.18 MoAb Development 10 mg/ml Vial # 42; erhalten von R. Handgretinger

AK⁻ war ab dem 9. Versuch verbraucht, sodass anschließend eine neue AK-Charge genutzt wurde. Die Antikörper wurden, sofern nicht anders vermerkt, in einer f.c. von jeweils 1µg/ml Zellsuspension eingesetzt.

2.1.7 Zellkulturmedien und Zusätze

| | |
|--|------------|
| Roswell Park Memorial Institute (RPMI) – Medium 1640 | Biochrom |
| Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline (DPBS) | |
| DPBS (ohne Ca ⁺⁺ /Mg ⁺⁺) | Invitrogen |
| DPBS (+Ca ⁺⁺ /Mg ⁺⁺) | Invitrogen |
| Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml; 10 000 µg/ml) | Biochrom |
| L-Glutamin (200mM) | Biochrom |
| FCS (fetal calf serum) | Biochrom |
| Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02%) | Biochrom |

Die Zellkulturzusätze FCS, Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin wurden zur besseren Handhabung nicht in großen Mengen, sondern in Aliquoten bei -20°C aufbewahrt.

Das RPMI 1640 Medium wurde auch nach Zugabe der Zusätze bei 4°C aufbewahrt.

Inaktivierung von FCS

Zur Inaktivierung (Komplement-Inaktivierung) wurde FCS bei 56°C für 30 min im Wasserbad erhitzt => FCS_i

RPMI⁺/FCS_i = Medium 1 = Standardmedium

RPMI⁺: 500ml RPMI Medium wurde mit 5 ml Penicillin/Streptomycin (P/S) und 5 ml L-Glutamin (200mM) versetzt.

RPMI⁺/FCS_i: 500 ml RPMI⁺ + 50 ml inaktiviertes FCS (FCS_i)

RPMI⁺/FCS_a = Medium 2

(Für die Komplementlyse wird Medium benötigt, dem FCS zugeführt wird, welches zuvor nicht inaktiviert wurde).

RPMI⁺/FCS_a: 500 ml RPMI⁺ Medium + 50 ml aktivem FCS (FCS_a)

Einfriermedium

Die gewünschte Menge an RPMI⁺ Medium wurde mit 20% (v/v) inaktiviertem FCS (FCS_i) und 10% (v/v) DMSO als Kristallisationsschutz versetzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Blutentnahme

Der Blutentnahme ging eine freiwillige Bereitschaft des jeweiligen Spenders voraus. Die venöse Punktion – nach vorheriger manueller Stauung – erfolgte unter ärztlicher Aufsicht. Das dadurch gewonnene Blut war heparinisiert (100 IU/ml).

2.2.2 Gewinnung und Isolierung der Granulozyten aus Vollblut

Prinzip:

Die Isolierung wurde in Anlehnung an die Methode, wie sie in Abb. 14 beschrieben ist, durchgeführt.

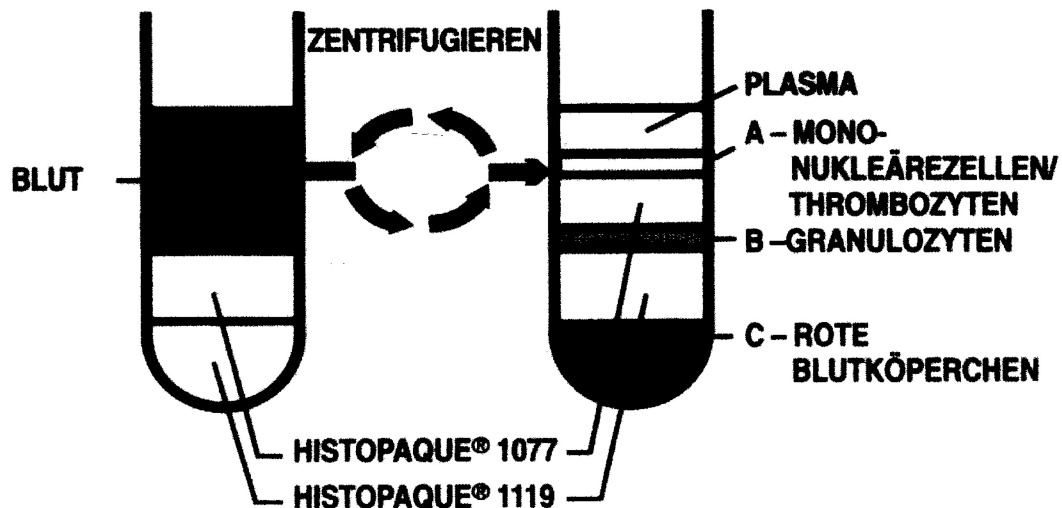


Abb. 14: Blutprobenaufarbeitung mittels Histopaque (aus: Firmenheft SIGMA Diagnostics, INC.).

Anmerkung: Nach Dichtezentrifugation mit Histopaque 1119 und Histopaque 1077 sammeln sich die Blutzellen entsprechend ihrer jeweiligen Dichte auf den beiden Histopaque-Zonen an. Oben ist das Plasma zu sehen, darunter ist die Ansammlung peripherer mononuklearer Zellen. Hierunter sammeln sich idealerweise die Granulozyten an. Ganz unten sind die Erythrozyten zu sehen.

Durchführung:

Zu Beginn wurden die beiden Dichtegradientenlösungen Histopaque 1119 und 1077 auf Raumtemperatur gebracht.

Je nach Granulozytenbedarf wurden dann entsprechend viele 15 ml Falcon-Röhrchen nacheinander mit jeweils 3,75 ml Histopaque 1119 gefüllt und mit wiederum jeweils 3,75 ml Histopaque 1077 überschichtet.

Die doppelte Dichtegradientenlösung wurde mit 5 ml heparinisiertem (100 IU/ml Vollblut, unverdünnt) überschichtet und bei 633 x g, 20 Minuten Dauer, 3°C und vorsichtiger An- und Rücklaufstufe zentrifugiert. Die einzelnen Zellen des Blutes weisen eine unterschiedliche Dichte auf und sammeln sich deshalb in den beiden unterschiedlich schweren Gradientenschichten an (siehe Abb. 14).

Anschließend wurde das Plasma, der Ring der mononukleären Zellen und die obere Dichtegradientenlösung (Histopaque 1077) abgesaugt und verworfen.

Die im Bereich der unteren Dichtegradientenlösung angesiedelten Granulozyten wurden vorsichtig mit der Pipette abgesaugt – ohne dabei die darunter befindliche Erythrozytenschicht aufzuwirbeln – und in ein separates 50 ml Falcon-Röhrchen transferiert und auf Eis gekühlt. Das Volumen wurde dann mit PBS⁺⁺ oder PBS⁺⁺ mit Glukose (5mmol/l) auf 50 ml aufgefüllt und bei 400 x g, 3°C und 10 Minuten Dauer gewaschen. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet erneut in PBS⁺⁺ oder PBS⁺⁺ mit Glukose (5mmol/l) resuspendiert und auf Eis bis zur Weiterverarbeitung gekühlt. Circa 95-98% der Leukozyten waren in der Regel Granulozyten. Dies konnte sowohl durch eine semiquantitative Analyse am ADVIA-Gerät, als auch durch eine mikroskopische Prüfung bestätigt werden (siehe auch Abb. 20).

2.2.3 Analyse des Differentialblutbildes und der isolierten neutrophilen Granulozyten mit Hilfe des ADVIA 120 der Fa. Siemens

Das Blutzellanalysegerät ADVIA 120 wird in der hämatologisch-onkologischen Routinediagnostik in der Kinderklinik Tübingen eingesetzt und stand für die Anfertigung von Differentialblutbildern zur Verfügung.

Die Messanalytik erfolgt nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie. Nach Aufnahme von circa 120 µl der heparinisierten Blutprobe wird das Volumen in den vier Kanälen des Gerätes (Erythrozyten-/Thrombozytenkanal, Hämoglobinkanal, Peroxidasekanal und Basophilenkanal) auf die unterschiedlichen Parameter untersucht.

Für die vorliegende Arbeit war die Bestimmung und Differenzierung der Leukozytenkonzentration von Bedeutung, um im Rahmen der Granulozytenisolierung eine Zellzahlbestimmung durchführen zu können, und um die Reinheit der Isolierung zu bestätigen.

Die Bestimmung der Leukozytenkonzentration erfolgt in zwei voneinander unterschiedlichen Kanälen, dem Peroxidasekanal und dem Basokanal.

2.2.3.1 Der Peroxidase-Kanal

Im Peroxidasekanal erfolgt mittels Halogenlicht an peroxidasegefärbten Leukozyten die Trennung in vier Zellpopulationen (neutrophile und eosinophile Granulozyten; Monozyten; Lymphozyten und basophile Granulozyten) und in große unidentifizierte Zellen („large unstained cells“, LUC) über Volumenbestimmung (Streulicht) und Peroxidase-Aktivität (Absorption).

Einem Teil der Blutprobe wird die Peroxidase-Reagenz hinzugefügt, und die Probe wird anschließend in der Flussküvette photometrisch unter Halogenlicht analysiert.

So wird nach der Erythrozytenlyse 4-Chloro-Naphtol und H_2O_2 zugegeben. Die MPO der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten, sowie die Peroxidase der eosinophilen Granulozyten reagieren hiermit und werden dadurch angefärbt. Als Peroxidase-positive Zellen sind also zu nennen: die eosinophilen Granulozyten (eosinophile Peroxidase), die neutrophilen Granulozyten (MPO) und etwas weniger die Monozyten (MPO). Lymphozyten, basophile Granulozyten und große, peroxidase-negative Zellen (LUC) besitzen keine Peroxidasaktivität und bleiben deshalb ungefärbt.

Nach der Färbung werden die Zellen einzeln vermessen und validiert. Hierbei wird ein Vorwärtsstreulichtsignal („forward Scatter“) und die Absorption jeder Zelle – als Charakteristikum für die endogene Peroxidaseaktivität der Zellen – gemessen.

In einem Schaubild (Leukogramm) wird folgend die Peroxidaseaktivität gegen die Lichtstreuung, die die Zellgröße charakterisiert, aufgetragen. Je höher die Peroxidaseaktivität der Zellen, desto weiter sind sie im Peroxkanal nach rechts auf der x-Achse verschoben. Somit entsteht mittels einer Cluster-Analyse eine exakte Trennung der Zellpopulationen. Neutrophile und eosinophile Granulozyten, als auch Monozyten können somit allein anhand des Perox-Kanals voneinander unterschieden werden (siehe Abb. 15). Basophile Granulozyten und Lymphozyten jedoch können erst mit Hilfe des Baso-Kanals differenziert werden. Die Gruppe der LUC, als „große, Peroxidase-negative Zellen“, sind beim Menschen meist lymphatischer Natur.

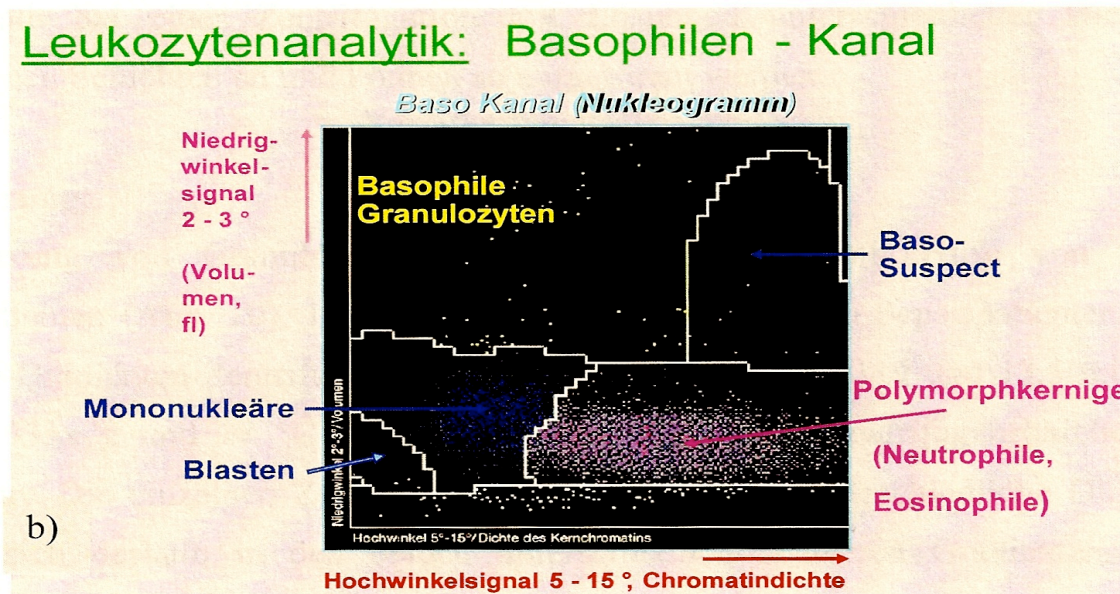
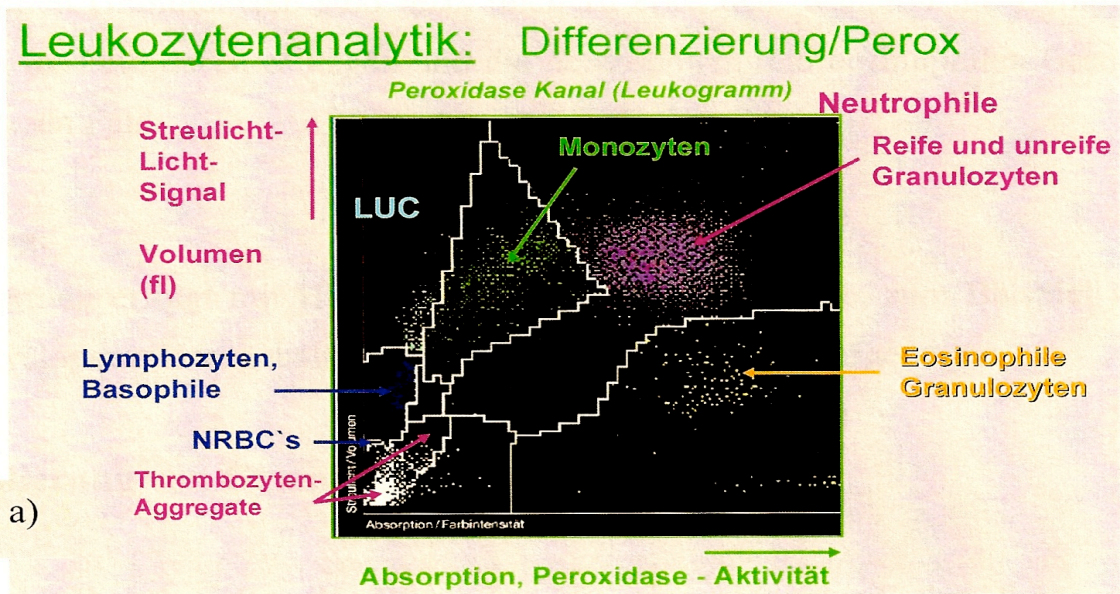


Abb. 15: Graphische Darstellung eines Vollblut-Leukogramms im Rahmen einer ADVIA-Messung (von Bayer-Vital/Siemens).

Anmerkung: a) Perox-Kanal: Die Perox-Graphik zeigt auf der x-Achse nach rechts ansteigend die Peroxidaseaktivität. Die y-Achse zeigt das Streulichtverhalten der Zellen. Unten links befinden sich Trümmer, Thrombozyten und die Non Red Blood Cells (NRBCs). Darüber sind Lymphozyten und basophile Granulozyten zu finden. Im Feld oben links werden die großen unidentifizierten Zellen (LUC) abgebildet, rechts davon die Monozyten. Rechts oben sind die reifen neutrophilen Granulozyten zu sehen und im Feld darunter die eosinophilen Granulozyten.

b) Baso-Kanal: Hier können basophile Granulozyten von Lymphozyten durch unterschiedliches Streuwinkelverhalten unterschieden werden. Die basophilen Granulozyten sind links oben zu erkennen, während die Lymphozyten und Monozyten im Feld darunter zu finden sind. Die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten befinden sich im rechten unteren Feld.

2.2.3.2 Der Baso-Kanal

Im Baso-Kanal kommt es durch Doppelwinkel-Laserstreulicht an Leukozytenkernen zur Separation von mononukleären (Lymphozyten und Monozyten), polymorphkernigen und basophilen Granulozyten.

Dieser Kanal zeigt somit die Kernmorphologie der Leukozyten auf, weshalb man diesen Kanal auch den Kernsegmentierungskanal nennt.

Die Zellkerne werden hierbei vom Zytoplasma befreit und es wird – wie bereits erwähnt – im Doppelwinkel-Laserstreulicht gemessen. Den Prozess der Separation des Zellkerns vom Zytoplasma wird „Stripping“ genannt.

Prinzip der Messung:

Einem Teil der Blutprobe wird die sogenannte „cytoplasmatic stripping reagent“ zugeführt. Dadurch werden alle zytoplasmatischen Membranen – ausgenommen die basophilen Granulozyten – lysiert. Diese Suspension wird danach durch eine Flussküvette geleitet, wo das Streulicht in zwei verschiedenen Winkelbereichen (forward scatter in zwei Streulichtwinkeln: 2-3° und 5-15°) gemessen wird. Diese Winkelbereiche werden letztendlich in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen und es kann dann zwischen meist drei Populationen vorrangig unterschieden werden (siehe Abb. 15):

- a. polymorphkernige Zellen
- b. mononukleäre Zellen: diese Kerne bilden eine Art „Wolke“ im unteren Bereich des Basokanal-Diagramms
- c. basophile Granulozyten: da deren zytoplasmatische Membran nicht aufgelöst wurde, sind sie meist als größere Zellen im oberen Bereich des Diagramms erkennbar.

2.2.3.3 Degranulation

Vorbemerkung

Granulozyten besitzen Granula mit Enzymen wie z.B. der MPO. Eine Besonderheit ist, dass bei Vorhandensein eines chemotaktischen Reizes, oder im Allgemeinen durch mechanischen Stress der Zelle, wie es beispielsweise während der Isolierung neutrophiler Granulozyten im Verlauf einer Zentrifugation kommt, ein Teil der Granula ins Außenmedium abgegeben wird (Degranulation). So ist, wie in Abb. 16 zu sehen, im Gegensatz zu der Vollblutprobe die Granulozytenfraktion im Peroxidasekanal nach erfolgter Histopaqueisolierung nicht mehr von der Monozytenwolke abzutrennen.

So wurde an Histopaque-isolierten Granulozyten einerseits der Einfluss der Lagerung bei verschiedenen langen Inkubationszeiten, als auch der Einfluss einer Lagerung in verschiedenen Inkubationsmedien wie PBS⁺⁺ (+/- Glukose) untersucht. Ferner wurde der Einfluss von GM-CSF auf den Vorgang der Degranulation bestimmt.

Durchführung

Granulozyten (200.000 Zellen/ 75 µl PBS⁺⁺ +/- 5mM Glukose) wurden unterschiedlich lange im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Zeitachse variierte von einem Nullwert (t₀-Wert) bis zu 22 Stunden. Ein Teil der Granulozyten wurde in Gegenwart von GM-CSF (1000 U/ml Granulozytensuspension) inkubiert.

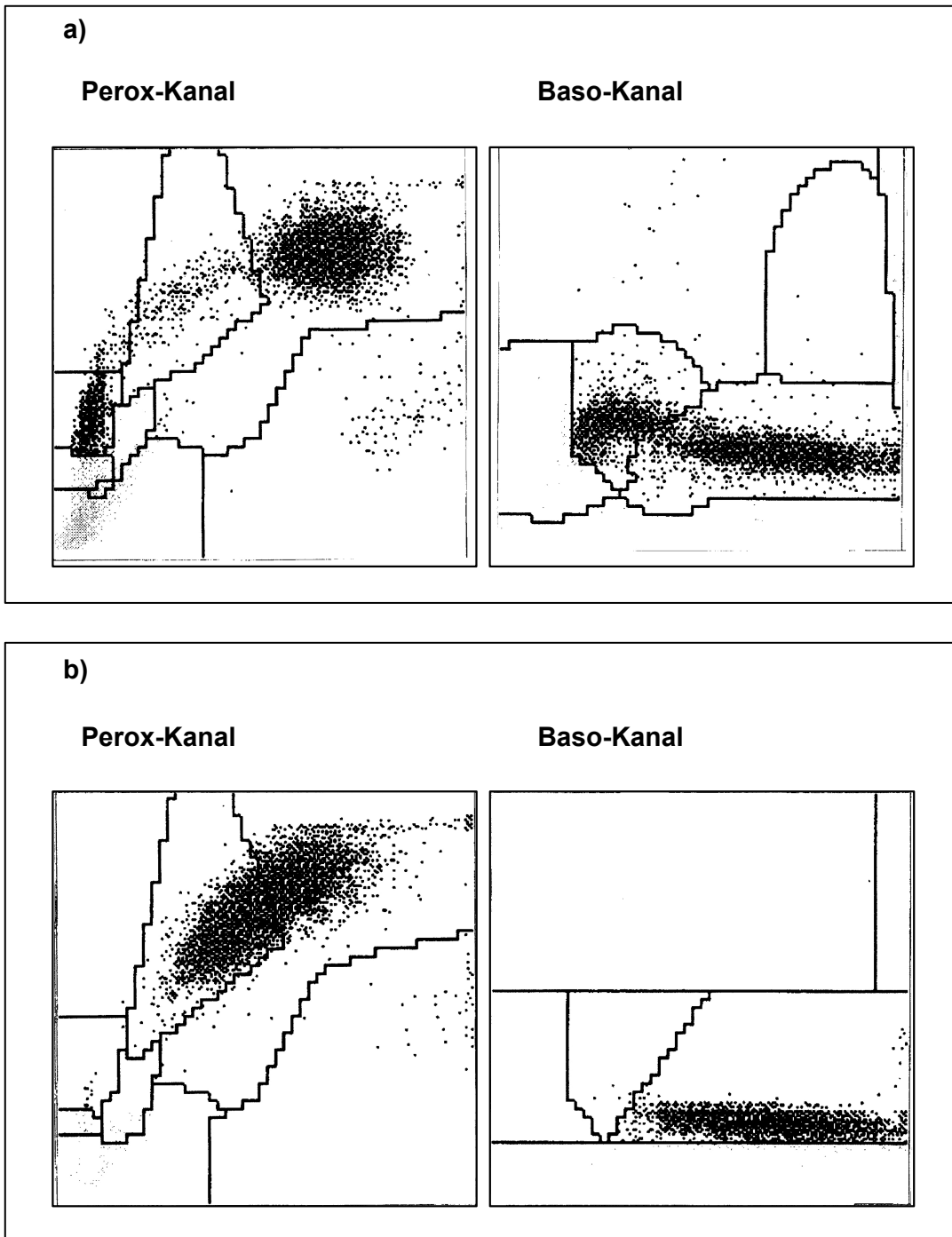


Abb. 16: Graphische Darstellung einer ADVIA-Messung mit Vergleich der Granulozyten im Vollblut (a) und nach erfolgter Histopaque-Isolierung (b).

Anmerkung: Vollblut einer Kontrollperson (a); im Vergleich hierzu sind die isolierten Granulozyten der gleichen Kontrollperson nach erfolgter Histopaque-Isolierung zu sehen (b). Dargestellt sind jeweils die Peroxidaseaktivität im Peroxidase-Histogramm (Perox) und der Basophilen-Kanal (Baso).

Auswertung

Die Degranulation wurde aufgrund der Myeloperoxidasefreisetzung im ADVIA 120 als Verschiebung der „Granulozytenwolke“ aufgezeigt. Charakteristisch hierfür ist eine Verschiebung im Perox-Diagramm. Hierbei ist auf der x-Achse die Aktivität der MPO angegeben. So kann in dem zugehörigen Perox-X-Histogramm eine Verschiebung graphisch genau erfasst werden, indem die Lage des Peaks ausgemessen wird. So können Testansätze zum Zeitpunkt t_0 mit einem späteren Zeitpunkt verglichen werden (siehe Abb. 21).

2.2.4 Glykogenbestimmung neutrophiler Granulozyten

Lösungen

- | | |
|---|--|
| (1) Perchlorsäure (0,6 M) | 5,2 ml 70% HClO_4 mit H_2O dest. ad 100 ml verdünnen. |
| (2) Kaliumhydrogencarbonat (1M) | 2 g Kaliumhydrogencarbonat mit H_2O dest. ad 20 ml lösen. |
| (3) Acetatpuffer (0,2 M; pH= 4,8) | 4,8 ml 96% Essigsäure und 9,75 g Natriumacetat mit H_2O dest. ad 1000 ml lösen. pH-Wert an der pH-Elektrode kontrollieren. |
| (4) Triethanolaminpuffer (0,3 M TRA; pH= 7,5; 4,05 mM MgSO_4) | 5,6 g Triethanolamin-hydrochlorid und 100 mg MgSO_4 in 50 ml H_2O dest. lösen und mit 12 ml 1 M KOH versetzen. pH an der Glaselektrode prüfen und Lösung ad 100 ml mit H_2O dest. auffüllen. |

(5) Adenosintriphosphat/Nicotinamidadeninucleotidphosphat/Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1 mM ATP; 0,9 mM β -NADP⁺; 5 μ g/ml Suspension G6P-DH (≥ 200 U/mg protein))

6 mg ATP und 8 mg NADP⁺ in
10 ml Triethanolaminpuffer
(Lösung 4) lösen und 0,05 ml
G6P-DH-Suspension zusetzen.
G6P-DH-Suspension zuvor 1:21
verdünnt mit Ammoniumsulfat

(6) Hexokinase (Sigma H4502-500UN, 500 units; ≥ 130 units/mg protein)

1:11-Verdünnung mit
Ammoniumsulfat; hiernach Zugabe
von 10 μ l pro Probe vor
Extinktionsbestimmung

(7) Amyloglucosidase (AGS) (10 mg/ml; 200 U/ml)

20 mg Enzymprotein in 2 ml
Acetatpuffer (Lösung 3) lösen

Die Glykogenbestimmung wurde mittels enzymatischer Hydrolyse durch Amyloglucosidase durchgeführt (Ammon, 1975).

Das Enzym Amyloglucosidase aus *Apergillus niger* kann als Exoglucosidase α -D-(1 \rightarrow 4)- und α -D-(1 \rightarrow 6)-Bindungen des Glykogens spalten. Der Hydrolyse anschließend wird Glukose spezifisch mit Hexokinase (HK) und Adenosin-5'-

triphosphat (ATP) zu Glukose-6-Phosphat (G-6-P) phosphoryliert. Mittels des Enzyms Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) wird G-6-P von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP⁺) zu Glukonat-6-Phosphat oxidiert, wobei NADP⁺ zu NADPH reduziert wird. Die entstehende NADPH-Menge ist der Glukose-Menge äquivalent.

Reaktionsgleichungen zur Glykogenbestimmung:

- (1) Glykogen + (H₂O)_{n-1} → (Glukose)_n: Amyloglucosidase (pH= 4,8)
- (2) Glukose + ATP → ADP + Glukose-6-Phosphat: Hexokinase, Mg⁺⁺, pH=7,5
- (3) Glukose-6-Phosphat + NADP⁺ → 6-Phospho-gluconolacton + NADPH + H⁺:
G-6-P-DH

Die Granulozytenisolation erfolgte nach der im Vorkapitel beschriebenen Methode. Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurde die Granulozytensuspension in PBS⁺⁺ mit bzw. ohne Glukose (5 mmol/l) gewaschen und das Zellpellet anschließend in PBS⁺⁺ mit bzw. ohne Glukose (5 mmol/l) resuspendiert.

Je nach Aufgabenstellung wurde vor der Inkubation im Wasserbad bei 37°C den Proben entsprechend 10 µl/ml Granulozytensuspension GM-CSF (1000 U/ml Granulozytensuspension) zugegeben bzw. nicht zugegeben.

Nach Ende der Inkubation und der Entnahme eines Aliquots für die parallel laufende Chemilumineszenzmessung (siehe Kapitel 2.2.7) wurde der Inhalt in 15 ml Falcon-Röhrchen transferiert, um die Probe bei 400G bei 3°C 10 min lang zu zentrifugieren. Für die Glukose-/Laktatbestimmung wurde 1000 µl Überstand mit einer Pipette abgesaugt und in Eppendorf-Cups transferiert. Die Probe wurde bei -20°C eingefroren.

Der Rest des Überstandes wurde für die Glykogenbestimmung bis zum Zellpellet abgesaugt und mit PBS⁺⁺ ohne Glukose gewaschen, um die exogen zugeführte Glukose herauszuwaschen. Die Probe wurde bei 400G 10 min lang bei 3°C

zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum bis zum Zellpellet abgesaugt, mit 200 μl PBS⁺⁺ und 1000 μl HClO₄ resuspendiert (1:6 Verdünnung der Granulozytenprobe). Die Granulozytenprobe wurde anschließend noch auf Eis mit Ultraschall drei mal fünf Sekunden lang behandelt, um anschließend noch das Gewicht des Homogenats zu bestimmen. Die Granulozytenprobe wurde bei -80°C für die noch anstehende Glykogenbestimmung eingefroren bzw. direkt verwendet. Die untersuchte Zeitachse variierte von einem Nullwert bis zu 24 Stunden.

Für den Bestimmungsansatz wurden 200 μl der zuvor in Perchlorsäure 1:6-verdünnten Granulozytenprobe mit 100 μl Kaliumhydrogencarbonat (Lösung 2) und 2000 μl AGS-Lösung (Lösung 7) für zwei Stunden bei 40 °C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Die Inkubation wird durch Zugabe von 1 ml Perchlorsäure (Lösung 1) beendet.

Anschließend wurden 2000 μl der Proben in neue Eppendorf-Cups für die Zentrifugation (15000g für 15 min Dauer bei 18°C) transferiert. Die Überstände wurden sofort für die enzymatische Bestimmung verwendet.

Gemessen wurde photometrisch bei 340 nm Messtrahlung, einem Testvolumen von 1060 μl , einer Schichtdicke der Halbmikroküvette von 1 cm, bei Raumtemperatur und gegen Wasser. Hierfür wurde je ein Ansatz für den Glukoseleerwert, der zuvor mit festem Kaliumhydrogencarbonat neutralisiert wurde, und für das Glykogenhydrolysat gemacht. Nacheinander wurden in Halbmikroküvetten 1 ml Lösung 5 (ATP/NADP⁺/G6P-DH-Puffer) und 50 μl Probe pipettiert, gut gemischt und die Extinktionszunahme (Glukose-6-Phosphat-Dehydrierung) bis zur Konstanz (ca. 10 min) verfolgt und die Extinktion E1 abgelesen.

Anschließend Zugabe von 10 μl Hexokinase-Suspension (f.c. 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 1,4 U/ml), mischen der Proben und Ablesen der Extinktionszunahme E2 bis zur Plateauphase nach ca. 15 min.

2.2.5 Bestimmung des Glukose- und Laktat-Gehalts mittels Photometrie

Zur Bestimmung des Glukose- und Laktat-Gehalts im Überstand der Reaktionsmedien wurden zwei Test-Kits der Firma r-biopharm (Roche) benutzt. In beiden Fällen handelt es sich um einen enzymgekoppelten, indirekten Nachweis der Substanzen.

Vorbereitung der Inkubationsansätze

Die Granulozytenisolation wurde wie im vorherigen Kapitel 2.2.2 beschrieben durchgeführt.

Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurde die Granulozytensuspension in PBS⁺⁺ mit bzw. ohne Glukose (5 mmol/l) gewaschen und das Zellpellet anschließend in 8,5 ml PBS⁺⁺ (+/- Glukose, 5 mmol/l) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei 37°C.

Nach Ende der Inkubation und der Entnahme eines 100 µl Aliquots für die Chemilumineszenzmessung wurde der Inhalt in 15 ml Falcon-Röhrchen transferiert, um die Probe bei 400G bei 3°C 10 min lang zu zentrifugieren.

Für die Glukose-/Laktatbestimmung wurde 1000 µl Überstand mit einer Pipette entnommen und in ein Eppendorf-Cup transferiert.

Die Probe wurde bei -20°C bis zur Bestimmung des Glukose- und Laktatgehaltes eingefroren.

2.2.5.1 Laktatbestimmung

Lösungen

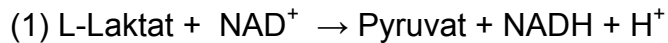
| | |
|----------|--|
| Lösung 1 | Glycylglycin, L-Glutamat; pH ca. 10 |
| Lösung 2 | NAD ⁺ -Lyophilisat; gelöst in 6 ml bidestilliertem Wasser |
| Lösung 3 | Glutamat-Pyruvat-Transaminase-Suspension (ca. 1100 U) |

Lösung 4 L-Laktat-Dehydrogenase (ca. 3800 U)

Lösung 5 Kontrollösung (0,1 µg Laktat/ml)

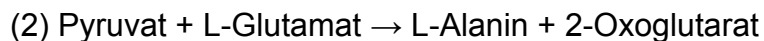
Das in den Überständen vorhandene Laktat wird in der ersten Reaktion durch die Laktatdehydrogenase (LDH) in Pyruvat umgesetzt. Hierbei kommt es zur Umwandlung von NAD^+ (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid) in die reduzierte Form NADH/H^+ .

Reaktion der LDH:



Da das Gleichgewicht dieser Reaktion jedoch auf der Seite von L-Laktat liegt, kann die Reaktion nicht vollständig ablaufen. Durch eine Reaktion mit dem Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) kann das anfallende Pyruvat der Reaktion entzogen werden und die Reaktion kann – gemäß nach dem Prinzip von Le Chatelier – auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben werden.

Reaktion der GPT:



Die Menge an gebildetem NADH ist äquivalent der L-Milchsäure-Menge im Ansatz. Im Gegensatz zu NAD^+ besitzt NADH ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 340 nm. Man misst die Absorption des NADH und errechnet mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes hieraus die Laktatkonzentration im Ansatz. Die Proben wurden genau nach Anleitung behandelt und bei 340 nm vermessen.

2.2.5.2 Glukosebestimmung

Lösungen

- Lösung 1 Triethanolamin-Puffer, NADP⁺, ATP, MgSO₄; pH ca. 7,6; gelöst in 45 ml bidestilliertem H₂O
- Lösung 2 Hexokinase (ca. 320 U), Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (ca. 160 U)
- Lösung 3 Kontrolllösung (0,25 µg Glukose/ml)

Der Testkit funktioniert nach dem Prinzip einer "gekoppelt enzymatischen Reaktion". Die im Überstand befindliche Glukose wird in einer ersten Reaktion unter ATP-Verbrauch phosphoryliert. Dabei entsteht Glukose-6-Phosphat (G-6-P).

Reaktion der Hexokinase:



Da in dieser Reaktion ATP zu ADP umgesetzt wird und sowohl die Substrate (ATP und Glukose), als auch die Produkte (ADP und G-6-P) farblos sind, kann diese Reaktion nicht direkt photometrisch gemessen werden.

Das gebildete G-6-P wird in einer zweiten Reaktion durch das Coenzym NADP⁺ oxidiert, wobei der "Indikator" NADPH entsteht, dessen Konzentration aus seiner Lichtabsorption bei 340 nm photometrisch bestimmt wird. Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der D-Glukose-Menge im Ansatz äquivalent. Diese zweite Reaktion wird durch das Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, einem Enzym des Pentosephosphatweges, katalysiert.

Reaktion der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase:



Die Proben wurden genau nach Anleitung behandelt und bei 340 nm vermessen. Einzige Abweichung war die Halbierung der Volumina. Es wurden somit 50 µl Probe bei 1510 µl Gesamtvolumen eingesetzt.

2.2.6 Bestimmung des ATP-Gehalts von neutrophilen Granulozyten mittels Biolumineszenz

FLASC® ATP-Chemilumineszenz Kit (Sigma)

ATP Assay Mix (AAM): MgSO₄; DTT; EDTA; BSA (Rinderserum-albumin);
Tricinsalze; Luciferase und Luciferin pH 7,8

ATP Assay Mix Dilution Buffer (AAB): MgSO₄; DTT; EDTA; BSA; Tricinsalze

ATP Assay Standard (AAS): ATP Standard; Stammlösung (181 µM, 200 µM)

Somatic Cell ATP releasing reagent (SAR): 10 fach konzentriert

Herstellung einer Suspension mit opsonisiertem (= opson.) Zymosan:

500 mg Zymosan werden über Nacht mit 1 ml AB-Serum inkubiert. Hiernach Zentrifugation über 5 min bei 1000 g. Der Überstand wird abgesaugt. Dieses Pellet wird in 20 ml 0,9% NaCl resuspendiert. Diese Suspension kann dann nach Wunsch mit PBS⁺⁺ in die gewünschte Verdünnung gebracht werden.

Die ATP - Bestimmung wurde mit einem Testkit der Fa. Sigma durchgeführt.

Das Messprinzip beruht auf einer biochemischen Reaktion bei der Licht emittiert wird (Biolumineszenz; siehe Gleichung 1–3). Hierbei behilft man sich der von der Luciferase („firefly“, Leuchtkäfer) katalysierten Reaktion von ATP mit D-Luciferin.

Gleichung 1–3: Reaktionsprinzip

(1) Intrazelluläres ATP → Freies ATP (Lyse-Reagenz)

(2) Freies ATP + Luziferin → Adenyl-Luziferin + PPi (Luziferase; Mg²⁺)

(3) Adenyl-Luziferin + O₂ → Oxyluziferin + AMP + CO₂ + Licht

Bei Reagenzienüberschuss ist die Menge der Lichtemission proportional zum ATP-Gehalt der Probe. Die Lichtemission wurde in blickdichten 96-Well-Platten am Luminometer gemessen.

Vor jeder Messung der Granulozytenproben wurde, auch in Hinblick der Lichtempfindlichkeit der Reagenzien des Test-Kits, eine Kalibrierungskurve mitgeführt. Hierfür wurden aus der mitgelieferten Standardlösung Verdünnungen der Konzentration 20 μM , 10 μM , 2 μM , 0,2 μM , 0,02 μM und 0,002 μM vermessen. In diesem geeichten Messsystem kann von der gemessenen Lichtintensität auf den ATP-Gehalt der Granulozytenprobe geschlossen werden.

Vorbereitung der Inkubationsansätze

Die Granulozytenisolation wurde – wie im vorherigen Kapitel 2.2.2 beschrieben – durchgeführt. Die Zellzahl wurde auf 200.000 Granulozyten pro 75 μl RPMI-Medium (267.000 Zellen/ml) eingestellt und je 2,5 ml Granulozytensuspension auf drei Ansätze verteilt.

- Ansatz a) Zugabe von 25 μl RPMI (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Zellsuspension)
- Ansatz b) Zugabe von 25 μl GM-CSF (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Zellsuspension); f.c. 1000 units/ml
- Ansatz c) Zugabe von 25 μl G-CSF (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Zellsuspension); f.c. 1000 units/ml

Danach wurden von jedem Ansatz je 200 μl in ein Eppendorf-Cup transferiert und verschieden lange (t_0 -Wert, 1h, 4h, 22-25h) bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Parallel dazu wurden für die selbe Zeitreihe nochmals je 200 μl Zellsuspension mit jeweils 10 μl 1:10-verdünntem opson. Zymosan (0,1 mg/ml Granulozytensuspension und 200.000 Zellen/75 μl) für die Stimulation des „oxidativen burst“ inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden den Ansätzen 1 ml RPMI hinzugegeben, die Proben 2 min bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Die Zell-Pellets wurden danach sofort auf Trockeneis eingefroren und bis zur Bestimmung des ATP-Gehaltes bei -80°C gelagert.

Messung der Proben

In ein Eppendorfcup wurden 100 µl Somatic Cell ATP releasing agent (SAR) und 50 µl bidestilliertem H₂O vorgelegt. Die bei -80°C gelagerten Granulozytenproben wurden mit 50 µl PBS⁻ resuspendiert, dem Reaktionsansatz hinzugegeben und stark gemischt. Sofort wurden hieraus 2 mal 50 µl entnommen und in die 96-Well-Platte pipettiert.

Somit sind insgesamt $2,67 \cdot 10^5$ Zellen pro Well im Reaktionsansatz vorhanden gewesen. Direkt vor der Messung am Luminometer wurde pro Well 50 µl des ATP Assay Mix (AAM) beigemischt. Der ATP-Assay-Mix wurde in einer Verdünnung von 1:25 verwendet. Verdünnt wurde mit dem „Dilution Buffer“.

Für die Messung im Luminometer wurde eine blickdichte, schwarze 96-Well-Platte der Firma BD Biosciences verwendet. Es wurden nur 12 Wells (also eine Reihe) gleichzeitig vermessen, da die Reaktion durch den Verbrauch an Luciferin nicht sehr lange stabil ist (Mayer, 2009).

Gemessen wurde zweimal pro Probe im Abstand von 5 Sekunden. Eine Messung der 12 Wells dauerte somit 2 min.

Herstellung der Eichkurven/Standardreihe

Die ATP-Konzentration der Zellsuspension wurde über einen internen ATP-Standard (AAS) mit bekannter Konzentration ermittelt.

Die für die Standardreihe benutzten Konzentrationen sollten im Bereich der ATP-Gehalte in den Granulozyten liegen.

Dem im Testkit mitgelieferten ATP Assay Standard (AAS) mit einer Stoffmenge von 2 μmole wurde 10 ml bidestilliertes H_2O hinzugegeben, was einer Konzentration von 200 μM entspricht. Ausgehend von dieser Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Es wurden Verdünnungen mit einer Konzentration von 20, 10, 2, 0,2, 0,02 und 0,002 μM vermessen. Hiervon wurden 25 μl pro Well im Reaktionsansatz eingesetzt, was einer Stoffmenge von 500, 250, 50, 5, 0,5 und 0,05 pmol entspricht. Verdünnt wurde mit bidestilliertem Wasser.

Die Messung wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie auch später die Granulozytenproben vermessen wurden.

Da sowohl die Zellzahl, als auch die absolute Stoffmenge im Ansatz bekannt war, konnte als Ergebnis die Stoffmenge zur Zellzahl in Relation gesetzt werden. Bei bekanntem Volumen der Zellen konnte so auch auf die Konzentration von ATP in Granulozyten geschlossen werden.

2.2.7 Messung des „oxidativen bursts“ mit Hilfe der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz

Vorbemerkung

Bereits seit 1972 ist bekannt, dass es im Rahmen des „respiratory bursts“ bzw. des „oxidativen bursts“ von neutrophilen Granulozyten Lichtquanten emittiert werden (Allen, 1982; Bruchelt and Schmidt, 1984). Dieses Phänomen nennt man Chemilumineszenz oder auch chemisches Leuchten.

Setzt man neutrophile Granulozyten extraphagosomalen Stress aus, z.B. durch Stimulation mit opson. Zymosan oder PMA, bilden sie verschiedene ROS wie Superoxidanionen, H_2O_2 , Hydroxylradikale, Singlet-Sauerstoff oder

hypochlorige Säure, die u.a. mit ungesättigten Doppelbindungen des Zellmaterials reagieren und diese in Derivate des Dioxydions überführen.

Diese Verbindungen sind sehr energiereich und geben ihre Energie an fluoreszenzfähige Moleküle in der Zelle ab, wodurch diese selbst in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt werden.

Der Übergang von instabilen chemischen Zuständen in stabile führt zu einer Energiefreisetzung in Form von einer Lichtemission, die teilweise für das menschliche Auge als Lichtquanten sichtbar sind – diesen Vorgang nennt man Chemilumineszenz (Biolumineszenz).

Diese natürlich auftretenden Lumineszenzen, die doch i.d.R. sehr schwach ausfallen, können durch Lumineszenzverstärker wie beispielsweise Luminol intensiv verstärkt werden und so in einen besser messbaren Bereich gebracht werden, wobei eine Korrelation zwischen der Höhe des beobachteten Chemilumineszenz-Signals und der Produktion von ROS besteht.

Das Luminol wird dabei hauptsächlich durch H_2O_2 und HOCl in das lichtemittierende 3-Aminophthalsäure-Dianion überführt. Hierbei spielen das Superoxidanion und der Singlet-Sauerstoff eine geringere Rolle (Müller-Peddinghaus, 1984; Vilim and Wilhelm, 1988).

Lösungen

Luminollösung

17,5 mg 5-Amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dion (Luminol) wurden in 10ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und zu je 1000 μl aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Vor Gebrauch wurde ein Aliquot der Stammlösung 1:50 mit PBS^{++} verdünnt.

In diesem Versuchsblock wurde die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten zur Bildung von ROS nach verschiedenen langen Lagerungszeiten überprüft und die Luminol-abhängige Chemilumineszenz gemessen. Untersucht wurde sowohl der

Einfluss der Lagerung nach verschiedenen langen Inkubationszeiten, als auch der Einfluss bei der Wahl des Inkubationsmediums (5 mmolare glukosehaltige PBS⁺⁺ bzw. nichtglukosehaltige PBS⁺⁺). Ferner wurde auch der Einfluss von GM-CSF (Endkonzentration 1000 U/ml Zellsuspension) und zudem der Einfluss einer Glukosezugabe (5 mmolar, 10µl pro Well) unmittelbar vor der Messung des oxidativen burst bestimmt.

Die Stimulation des oxidativen burst erfolgte mit opson. Zymosan (f.c. 250 µg/ml). Hierdurch können diese natürlich auftretenden Lumineszenzen, die doch i.d.R. sehr schwach ausfallen, intensiv verstärkt werden und so in einen besser messbaren Bereich gebracht werden, wobei eine Korrelation zwischen der Höhe des beobachteten Chemilumineszenz-Signals und der Produktion von ROS besteht. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle.

Vorbereitung der Inkubationsansätze

Die Granulozyten wurden, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, isoliert.

Schon bei den ersten Isolationsschritten wurde auf eine Trennung der Ansätze bei den Waschschrinen mit PBS⁺⁺ und PBS⁺⁺ mit Glukose (5mmol/l) geachtet. Nach der Zellzahlbestimmung mit dem ADVIA120 wurden die Zellen auf 4 verschiedene Ansätze mit je 4 ml Granulozytensuspension (200.000 Zellen/75 µl) verteilt.

- Ansatz a) Granulozyten in PBS⁺⁺ mit Glukose (5mmol/l)
- Ansatz b) Granulozyten in PBS⁺⁺
- Ansatz c) Granulozyten in PBS⁺⁺ mit Glukose (5mmol/l)
Zugabe von 40 µl GM-CSF (10 µl/ml Zellsuspension; f.c. 1000 units/ml)
- Ansatz d) Granulozyten in PBS⁺⁺
Zugabe von 40 µl GM-CSF (10 µl/ml Zellsuspension; f.c. 1000 units/ml)

Die Inkubationsansätze wurden verschieden lange (0h; 2h; 4h; 16h; 22h) bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde von den Ansätzen ein Aliquot von 400 µl für die gleich im Anschluss stattfindende Chemilumineszenz-Messung entnommen.

Parallel zu diesem Versuch erfolgten Messungen für die Charakterisierung der Degranulation neutrophiler Granulozyten (siehe Kapitel 2.2.3.3 und 3.1.2.1). Hierfür wurden dem jeweiligen Inkubationsansatz zu denselben Inkubationszeiten wie oben beschrieben (0h; 2h; 4h; 14h; 22h) nochmals 400 µl entnommen, um eine Bestimmung im Perox X-Kanal des ADVIA120 durchzuführen.

Messung der Proben

Für die luminolabhängige Chemilumineszenz wurden 100.000 neutrophile Granulozyten in 100 µl PBS⁺⁺ (+/- Glukose 5 mmol/l) in einer nichttransluminenten 96-Well-Platte für – sofern nicht andersweitig vermerkt –30 min untersucht. 25 µl Luminol (1,75 mg/ml in DMSO; 1:50 mit PBS⁺⁺ verdünnt; f.c. 4 µg/ml pro Well) wurden zugegeben. Die Granulozyten wurden mit 1:10-verdünntem (PBS⁺⁺) opson. Zymosan (2mg/ml) stimuliert. Hiervon Zugabe von 25 µl zum Reaktionsansatz (f.c. 250 µg/ml).

Ein weiterer Ansatz diente der Untersuchung, welchen Effekt es hat, unmittelbar direkt vor Beginn der Chemilumineszenzmessung den in PBS⁺⁺ isolierten Granulozyten Glukose (5mmol/l) in PBS⁺⁺ zuzugeben. Hierfür wurden wiederum 75 µl PBS⁺⁺ mit Glukose (5mmol/l) in die Wells vorgelegt.

Die Messung startete mit der automatischen Zugabe von 25 µl Luminol (f.c. 4 µg/ml) über den P-Injektor des Tropix TR717 vor dem ersten Messzyklus. Auf einen Volumenausgleich mit PBS⁺⁺/- Glukose (5 mmol/l) wurde geachtet. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen.

Jeder Ansatz wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die ausgehenden Lichtsignale werden über einen Photomultiplier verstärkt und von einer Photozelle aufgenommen. Gemessen wurde mit dem Tropix TR717 (Firma Perkin Elmer) mit der zugehörigen Software „WinGlow“. Die Lichtquanten pro Sekunde wurden als Reaktionskinetik aufgezeichnet und das Integral als Summenwert der Einzelwerte angegeben. Alle 3 Sekunden wurde für eine Sekunde pro Well die Lichtquantenmenge über insgesamt 30 min bei Zimmertemperatur gemessen. Die Summe der Einzelwerte entspricht – ausgedrückt als Reactive Light Units (RLU) – der Lichtquantenmenge über diese Zeit. Somit ist die Fläche unter dieser Kurve proportional der Menge der insgesamt gebildeten ROS und ermöglicht eine semiquantitative Angabe abgegebener Lichtquanten pro Sekunde bei chemischen Reaktionen. Die Intensität der Bildung von ROS nach Aktivierung der Granulozyten durchläuft ein Maximum und geht dann auf den Ausgangswert zurück (siehe Abb. 17). In manchen Versuchsreihen erfolgten die Messungen auch über einen Zeitraum von 1h. Dies wurde an entsprechender Stelle vermerkt.

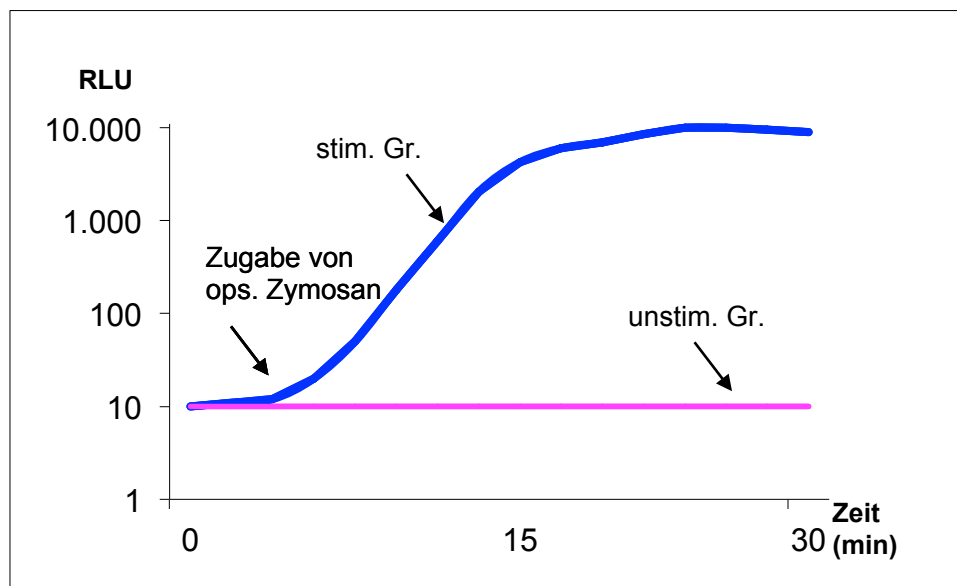


Abb. 17: Beispiel ROS-Bildung bei isolierten Granulozyten (eigene Darstellung).

Anmerkung: Isolierte Granulozyten (pro Well 100.000 Zellen in PBS⁺⁺) wurden über 30 min mit Luminol f.c. 4 µg/ml pro Well) inkubiert. Als Stimulanz diente opson. Zymosan (f.c. 250 µg/ml). Unstimulierte Granulozyten sind bereits durch die Isolation im Histopaquegradienten schwach aktiviert und weisen lediglich eine geringe ROS-Bildung auf. Nach Stimulation mit opson. Zymosan steigt die ROS-Produktion stark an und beginnt nach ca. 30 min langsam wieder abzusinken.

Abk.: unstim.= unstimuliert; stim.= stimuliert; Gr.= Granulozyten.; RLU= relative Lichteinheiten (engl.: relative light units); ops.= opsonisiert.

Pipettierschema:

| | Granulozyten (100.000 Zellen) | PBS ⁺⁺ / Glukose (5mmol/l) | Opson. Zymosan |
|--------------|----------------------------------|--|---------------------------|
| unstimuliert | 100 µl in PBS/Glukose | 75 µl | - |
| stimuliert | 100 µl in PBS/Glukose | 50 µl | 25 µl (f.c. 250 µg/ml) |

In alle Wells kommen zusätzlich 25 µl Luminol (1,75 mg/ml in DMSO; 1:50 mit PBS⁺⁺ verdünnt; f.c. 4 µg/ml pro Well).

Weitere Modifikationen

In einem weiteren Versuchsblock sollte der Frage nachgegangen werden, welchen Effekt Immunmodulatoren wie Biobran® im Zusammenwirken mit Differenzierungsfaktoren wie G- bzw. GM-CSF auf den „oxidativen burst“ ausüben können. Analog zu den bereits in diesem Kapitel aufgezeigten Versuchen wurden die Granulozyten wie üblich über eine Dichtegradientenlösung isoliert und in RPMI-Medium bei 37°C im Brutschrank plus/minus G- bzw. GM-CSF (1000 U pro ml Granulozytensuspension bei einer Zellzahl von 200.000 Zellen/75 µl) und 2 Stunden vorinkubiert.

Ein Teil der in RPMI-Medium gelagerten Granulozyten wurde kurz vor der Stimulation des „oxidativen burst“ durch opson. Zymosan 10 µl Biobran® (f.c. 500 µg/ml) zum Reaktionsansatz hinzugegeben.

Anschließend erfolgte – wie bereits beschrieben – die Messung der Chemilumineszenz.

2.2.8 Rolle von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) bei neutrophilen Granulozyten bei der „antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity“ (ADCC) gegenüber Neuroblastomzellen

Lösungen

- Biobran® (MGN-3) (10 mg/ml) Braun
aus der Originallösung wurde dem Reaktionsansatz 10 µl zugegeben (f.c. 0,5 mg/ml)

Die Generierung von ROS wurde mit Hilfe der Luminol-vermittelten Chemilumineszenz gemessen. Es erfolgte eine Aktivierung des „oxidativen burst“ neutrophiler Granulozyten durch opsonisiertes Zymosan.

2.2.8.1 Allgemeines zum Arbeiten mit Zellkulturen

Sowohl das Passagieren, das Einfrieren der Zellen, als auch das Herstellen von Medien, sowie die Verdünnungen von Antikörpern erfolgte stets unter sterilen Bedingungen. Vor der Verwendung wurden das Trypsin und das RPMI 1640 Medium im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt. Die Zelllinien wurden, sofern nicht anders vermerkt, immer bei 400 g und 3°C für 5 min zentrifugiert.

2.2.8.1.1 Kultivierung von Zellen

Zu Beginn wurden die Zellen aus dem Stickstofftank im Stickstofflager geholt, auf Eis transportiert und aufgetaut. Anschließend wurden sie zum Waschen in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit 35 ml Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) aufgefüllt. Wie oben beschrieben wurden die Zellen für 5 min bei 400 g zentrifugiert und der Überstand mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Das auf dem Boden befindliche Zellpellet wurde mit vorgewärmtem Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) resuspendiert und in eine 750 ml Zellkulturflasche überführt. Anschließend wurde das Volumen auf 35 ml mit Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) aufgefüllt und die Flasche mit leicht geöffnetem Deckel bei 37 °C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank gezüchtet. Je nach Bedarf musste das Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) von 35 ml Volumen/Flasche ca. alle 3 Tage gewechselt werden (Farbveränderung des Mediums von rot zu orange-gelb).

2.2.8.1.2 Subkultivierung der Zellen

Der adhärent wachsende Zellrasen auf dem Boden der Kulturflasche wurde mikroskopisch geprüft. Passagiert wurde, wenn der Flaschenboden zu ca. 80-90% bewachsen war. Dazu wurde das Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) mit der Vakuumpumpe unter der Sterilbank abgesaugt und 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 60 Sek. wurden die Zellen durch mechanisches Klopfen vom Boden der Flasche gelöst und 7,5 ml frisches Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) zugegeben, um die Wirkung von Trypsin zu stoppen. Die Zellsuspension wurde gut resuspendiert und auf neue Kulturflaschen verteilt, die jeweils mit frischem Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) auf 35 ml aufgefüllt wurden.

2.2.8.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu bestimmen, mussten die Zellen, wie vorab beschrieben, abtrypsinisiert werden. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50 ml Röhrchen

überführt, mit 45 ml Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 3-5 ml Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) gut resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 50 µl entnommen und mit 50 µl Trypanblau-Lösung vermischt. Von diesem Gemisch wurden 8,5 µl in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und die lebenden Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Durch das Trypanblau wurden die toten im Gegensatz zu den lebenden Zellen blau angefärbt. Die lebenden, zu zählenden Zellen waren als helle Strukturen mit dunkler Umrandung zu erkennen.

Bei der Zählung wurde darauf geachtet, dass nicht mehr als 20% der Zellen blau markiert waren, da ansonsten im Test eine zu hohe Spontanlyse zu erwarten ist.

Es wurden 2-4 Großquadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt und der Mittelwert zur Errechnung der Zellzahl/ml verwendet. Dieser Mittelwert wurde mit 2 multipliziert, da die Zellsuspension zuvor 1:1 mit Trypanblau verdünnt wurde.

Zur Berechnung wurde folgende Gleichung genutzt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \times 2 \times 10^4$$

Um auf die gewünschte Zellzahl zu kommen, musste die Zellsuspension nun mit frischem Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) verdünnt werden.

2.2.8.1.4 Einfrieren der Zellen

Nachdem sich ein konfluenter Zellrasen aus Neuroblastomzellen auf dem Boden der Kulturflasche gebildet hat, konnte das Kulturmedium abgesaugt werden. Die adhärennten Zellen wurden mit 2 ml Trypsin abgelöst und in geringem Volumen Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) aufgenommen. Nach einer Zentrifugation (5 min bei 400 g) wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit Einfrieremedium versetzt und die Suspension auf Kryoröhrchen verteilt. Anschließend wurden die Röhrchen mit

Papiertüchern umwickelt und über Nacht auf -80 °C heruntergekühlt. Zur längerfristigen Konservierung wurden am Folgetag die Kryoröhrchen auf Trockeneis zum Stickstofflager transportiert und in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.8.2 Messung des „oxidativen bursts“ mit Hilfe der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz in Assoziation mit der ADCC-Reaktion neutrophiler Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen

Dieser Versuchblock erfolgte analog zu dem in Kapitel 2.2.8.3 beschriebenen Versuchsaufbau.

In diesem Versuchsblock soll unter ADCC-Reaktionsbedingungen (3h, 37 °C), untersucht werden, ob ROS überhaupt eine Bedeutung im Rahmen der ADCC-Reaktion zukommt. Für „normale“ Antikörper war das bereits bekannt. Jedoch war die Frage, ob sich Antikörper ohne Komplementbindungsstelle analog verhalten. Um die Produktion von ROS im Rahmen dieser Untersuchungen zu verifizieren, erfolgte eine Messung der Biolumineszenz.

Durchführung

Die Gewinnung und Markierung der Neuroblastomzellen (Targetzellen) und die Gewinnung und Vorbereitung der neutrophilen Granulozyten als Effektorzellen erfolgte wie in Kapitel 2.2.2 und im Vorkapitel beschrieben. Der Testansatz wurde in einer nichttransluminenten 96-Well-Platte untersucht.

Als Effektorzellen dienten neutrophile Granulozyten (200.000 Zellen /75 μl), die wie oben genannt in G-/bzw. GM-CSF (1000 U/ml Zellsuspension) zwei Stunden vorinkubiert waren. Mit jedem Ansatz wurden immer drei Wells wie folgt beschickt:

- a) In 3 Wells wurden jeweils 100 µl der zuvor markierten Neuroblastomzellen (5000 Zellen) pipettiert. Hierzu wurden in jedes Well zusätzlich 10 µl AK⁺ bzw. AK⁻ zugegeben.
- b) In 3 Wells wurden jeweils 100 µl der zuvor markierten Neuroblastomzellen pipettiert und 10 µl RPMI-Medium als Volumenausgleich zugegeben.

Die beschickte 96-Well-Platte wurde nun für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, damit die Antikörper an die Neuroblastomzellen binden können.

Nach der Inkubationszeit von 30 Minuten wurden den mit Neuroblastomzellen (5000 Zellen/100 µl) und 10 µl AK⁺/AK⁻ bzw. Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) beschickten Wells jeweils 200.000 Granulozyten in 75 µl PBS⁺⁺ mit Glukose (5 mmol/l) bzw. RPMI-Medium in der benötigten Konzentration (E:T-Verhältnis 40:1) zugegeben.

In einem weiteren Versuch sollte der Frage nachgegangen werden, ob Biobran® bei Zugabe der beiden Antikörpern (AK⁺ bzw. AK⁻) einen Einfluss auf die Zellyse von Neuroblastomzellen hat (siehe Kapitel 2.2.8.3). Eine Messung der Chemilumineszenz erfolgte, um die Effekte der ADCC-Reaktion auf die Produktion von ROS zu verifizieren. Hierzu wurden den entsprechend bestückten Wells 10 µl des Zuckers (f.c. 0,5 mg/ml) zugegeben.

War die 96-Well-Platte wie oben beschrieben vollständig beschickt, erfolgte die automatische Zugabe von 25 µl Luminol (f.c. 4 µg/ml) über den P-Injektor des Tropix TR717 vor dem ersten Messzyklus. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25 µl opson. Zymosan (1:10-verdünnt: f.c. 250 µg/ml; 1:5-verdünnt: f.c. 500 µg/ml) zum Reaktionsansatz, um zu zeigen, dass das „Testsystem Granulozyten“ fähig ist relevante Mengen an ROS zu bilden. Auf einen Volumenausgleich mit PBS⁺⁺ mit 5 mmol/l Glukose bzw. RPMI-Medium wurde geachtet. Das Messprinzip erfolgte wie bereits in Kapitel 2.2.7 beschrieben.

2.2.8.3 ADCC

Die ADCC ist ein zellulär-humoraler Abwehrmechanismus des Immunsystems. Es gibt drei wesentliche Komponenten hierfür: eine Zielzelle (Target), die im Rahmen dieses Geschehens zerstört wird, eine Effektorzelle, welche die Lyse der Zielzelle induziert und einem Antikörper, über den der Lysemechanismus ausgelöst wird. Zur ADCC fähig sind NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, sowie Granulozyten.

Die Spezifität der ADCC erfolgt über den Antikörper, der an das Antigen der Zielzelle bindet. Zytotoxizität entsteht dadurch, dass der Fc-Rezeptor der Effektorzelle das Fc-Stück des Membran-gebundenen Antikörpers der Zielzelle bindet. Diese Vernetzung von Fc-Rezeptoren signalisiert der Effektorzelle die Zielzelle durch Schädigung ihrer Membran (z.B. durch Perforin und Granzyme) zu lysieren. Zytokine haben Einfluss auf die Effektivität der ADCC. So steigern IL-2, IL-12, IF- α und IFN- γ die Zelllyse der ADCC, währenddessen Zytokine wie IL-4, IL-6 die Effektivität senken.

2.2.8.3.1 BATDA-Release-Assay („Europium-Assay“) im Rahmen der ADCC-Reaktion neutrophiler Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen

Grundlagen

Die Methode des Europium-Assay ist eine Alternative zum klassischen $^{51}\text{Chrom}$ -Assay und dient der quantitativen Bestimmung der Zytotoxizität von Effektorzellen (Natürliche Killerzellen, Monozyten, Granulozyten) gegenüber verschiedenen Targetzellen. Im Vergleich zum $^{51}\text{Chrom}$ -Assay ist der Europium-Assay ein nicht-radioaktiver Zytotoxizitätstest.

Um die Zytotoxizität feststellen zu können, wurden zunächst die Targetzellen (in unserem Fall Neuroblastomzellen) mit dem fluoreszendierenden Liganden Bis-Acetoxymethyl-2,2':6'2"-Terpyridine-6,6"-Dicarboxylid Acid (BATDA) inkubiert, der aufgrund seiner Hydrophobität die Zellwand leicht penetrieren kann. Die

Esterbindungen des Liganden werden intrazellulär hydrolysiert, sodass eine hydrophile Verbindung „TDA“ entsteht, die die Zellwand nicht mehr passieren kann (Abb. 18 und 19). Der Ligand wirkt so intrazellulär fluoreszenzverstärkend. Der Ligand kann nur von lysierten Zellen freigesetzt und so im Zellüberstand nachgewiesen werden. Hierzu folgt eine Inkubation der Targetzellen mit den Effektorzellen.

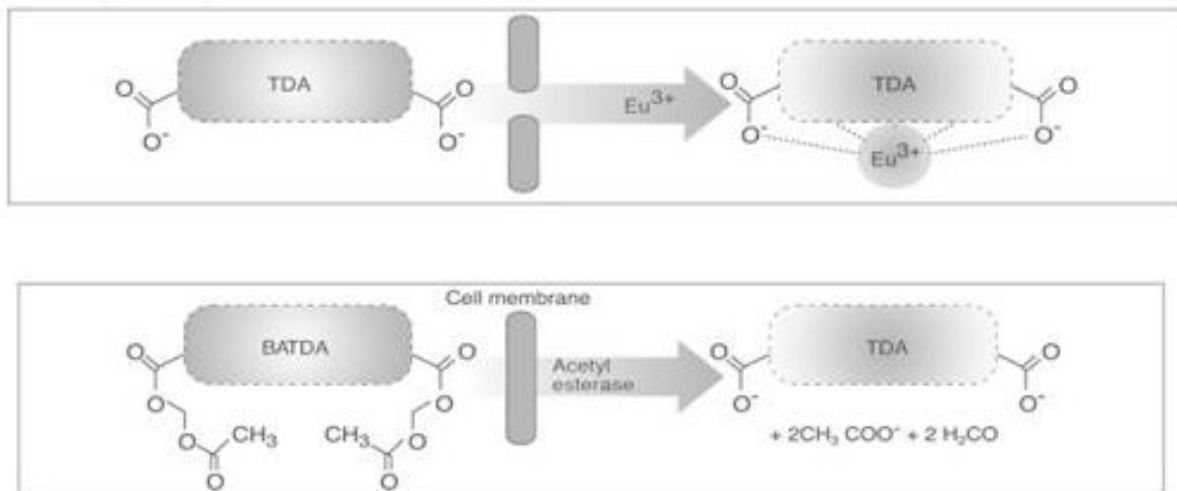


Abb. 18: Prinzip der Zellmarkierung mit BATDA (aus Perkin Elmer Produktinfo: Cell Cytotoxicity Assay).

Anmerkung: Nachdem der Ligand die Zellmembran passiert hat, hydrolysiert er durch die Acetyl-esterase in der Zelle zu TDA. Bei der Lyse von Targetzellen wird TDA freigesetzt. Nach Zugabe von Europium-Lösung im Überstand bildet sich ein fluoreszierender Chelat-Komplex.

Haben die Effektorzellen auf die Targetzellen zytotoxischen Einfluss, so setzen die lysierten Zellen den hydrophilen Liganden TDA wieder frei. Nach Zugabe von Europiumlösung verbindet sich dieser mit dem im Überstand vorhandenen Liganden zu einem stark fluoreszierenden, stabilen Chelatkomplex (EuTDA), dessen Menge sich mittels einem Fluorometer zeitversetzt bestimmen lässt (Abb. 19).

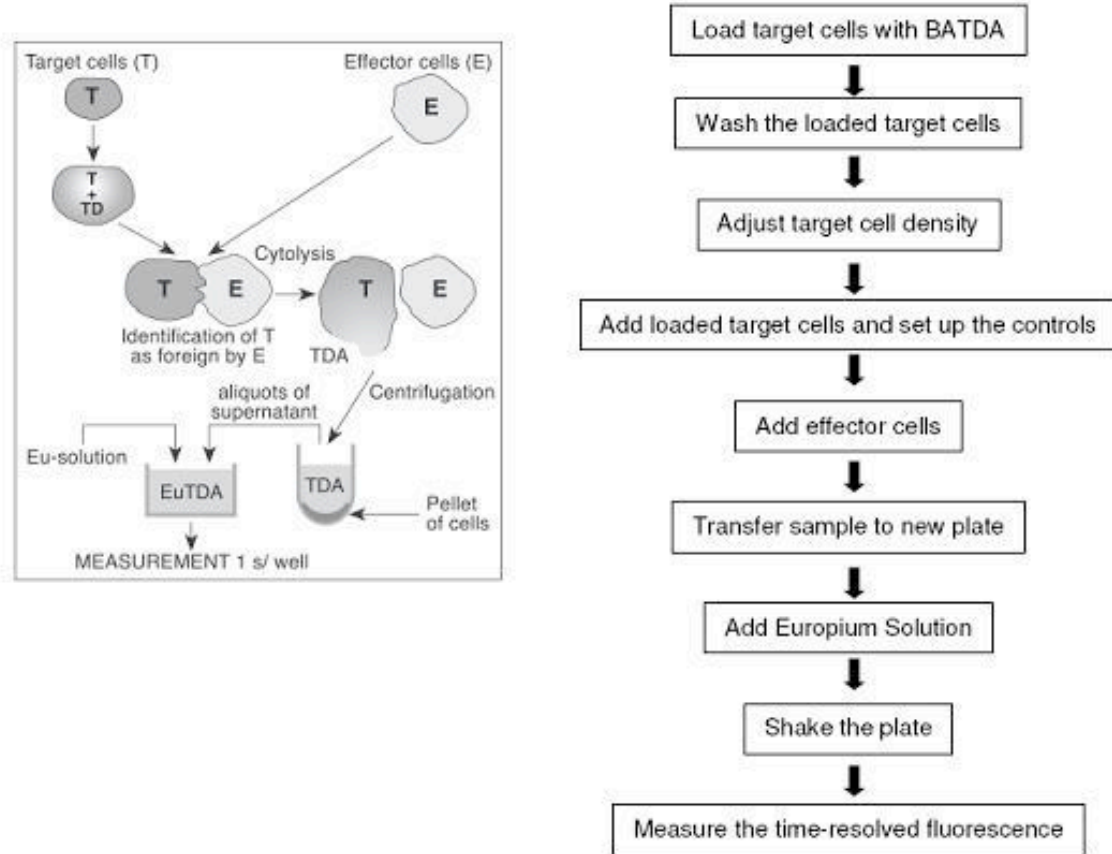


Abb. 19: Prinzip des EuTDA-Assays (aus Perkin Elmer Produktinfo: Cell Cytotoxicity Assay).

Um nun die Zytotoxizität der Effektorzellen, ausgedrückt in einem prozentualen Anteil an lysierten Targetzellen errechnen zu können, muss das Ergebnis auf die Anzahl der maximal lysierbaren Zellen bezogen werden. Daher mussten im Versuch sowohl die Spontanlyse, als auch die Maximallyse, sowie der Background zusätzlich berechnet werden:

- Spontanlyse ist der Wert, der durch spontanen Zellerfall ohne Einfluss von Effektorzellen erreicht wird
- Maximallyse ist der Wert, der erreicht ist, wenn alle Targetzellen lysiert sind

- Background ist der Wert, der gemessen wird, wenn für den Ansatz nur der Überstand einer geringen Menge der zuvor zentrifugierten Zellsuspension genutzt wird
- die spezifische Lyse wird mit folgender Formel berechnet:
Spezifische Lyse in % = ((Messwert – Spontanlyse) / (Maximallyse – Spontanlyse)) x 100

Gewinnung und Markierung der Neuroblastomzellen (Targetzellen)

Für die Zytotoxizitätstests wurden die Zelllinien NB1 und NB2 als Targetzellen verwendet. Für den gesamten Versuchsablauf wurde stets auf 37°C angewärmtes Medium verwendet.

Die im Brutschrank herangewachsenen NB-Zellen wurden vom Zellkulturmedium (Medium 1; RPMI⁺/FCS_i) befreit und mit ca. 2,5 ml Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abtrypsinisiert. Die NB-Zellen wurden mit Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) aufgefüllt und zentrifugiert (5 Min, 400g).

Anschließend wurde das Medium abgesaugt, das Zellpellet in Medium 1 vorsichtig resuspendiert und auf eine Zellzahl von 1x10⁶ Zellen/ml eingestellt. Hiernach wurde der Zellsuspension 4µl pro ml Zellsuspension BATDA Lösung zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C.

Nach dem Inkubieren wurde die Zellsuspension gewaschen. Dazu wurden sie zunächst erneut bei 400 g für 5 Min zentrifugiert, das Medium abgesaugt, das Pellet mit Medium 1 aufgefüllt und vorsichtig resuspendiert. Dieser Vorgang wurde viermalig wiederholt.

Anschließend wurde das Zellpellet erneut mit frischem Medium aufgefüllt, resuspendiert und in der Neubauerzählkammer ausgezählt und auf eine Zellzahl von 50.000 Neuroblastomzellen pro ml eingestellt.

Gewinnung und Vorbereitung der neutrophilen Granulozyten als Effektorzellen

Die Zellisolierung neutrophiler Granulozyten als Effektorzellen wie auch die Präparation der Neuroblastomzellen als Targetzellen erfolgte stets am selben Tag.

Die neutrophilen Granulozyten wurden wie im vorherigen Kapitel beschrieben isoliert, das Zellpellet in RPMI⁺-Medium resuspendiert und die Zellzahl im ADVIA 120 ausgezählt.

Die für die Versuche auf eine Zellzahl von 200.000 Zellen/100 µl eingestellte Granulozytensuspension wurde vor Inkubation mit den Targetzellen für 2 Stunden mit unterschiedlichen Zusätzen (GM-CSF; 1000 U/ml Zellsuspension, G-CSF 1000 U/ml Zellsuspension) im Brutschrank bei 37° und gestanztem Deckel vorinkubiert, um deren Einfluss auf die Effektivität der Lyse zu untersuchen. Das Effektor-Target-Verhältnis (E:T-Verhältnis) lag hierbei – sofern nicht anders vermerkt – bei E:T 40:1.

ADCC-Testansatz

Die Methode entspricht weitgehend bereits publizierten Protokollen (Blomberg et al, 1996). Der Test wurde in einer Rundboden-Mikrotiterplatte (U-Form, 96 Kavitäten) angesetzt.

In allen Europium-Versuchen wurden der Background, die Spontanlyse und die Maximallyse vierfach mit Ultraschall bestimmt. Von jedem dieser 4 Testansätze wurden 4 Wells beschickt.

Background:

Um den Background zu bestimmen, wurden 600-1000 µl der markierten und auf 50.000 Zellen/ml eingestellten Neuroblastomzellen in einem Eppendorfcup 2 Minuten bei ca. 1000 g zentrifugiert und der Überstand (500 µl) abgehoben. Von

diesem wurden je 100 µl in 4 Wells verteilt und 100 µl Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) zugegeben.

Spontanlyse:

Von den markierten und auf 50.000 Zellen/ml eingestellten Neuroblastomzellen wurden je 100 µl in 4 Wells pipettiert. Alle 4 Wells wurden dann mit 100 µl Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) aufgefüllt.

Maximallyse mit Lysepuffer:

Von den markierten und auf 50.000 Zellen/ml eingestellten Neuroblastomzellen wurden je 100 µl in 4 Wells pipettiert. Diesen wurden jeweils 20 µl Lysepuffer und 80 µl Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) zugegeben.

Maximallyse mit Ultraschall:

Von den markierten und auf 50.000 Zellen/ml eingestellten Neuroblastomzellen wurden 1000 µl in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) überführt und mit Ultraschall zertrümmert. Davon wurden je 100 µl in 4 Wells gegeben und mit 100 µl Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) aufgefüllt.

Als Effektorzellen dienten isolierte Granulozyten, die wie oben genannt auch in G- bzw. GM-CSF (1000 U/ml Zellsuspension) 2 Stunden vorinkubiert waren. Mit jedem Ansatz wurden immer 3 Wells wie folgt beschickt:

- a) In 3 Wells wurden jeweils 100 µl der zuvor markierten Neuroblastomzellen (5000 Zellen) pipettiert. Hierzu wurden in jedes Well zusätzlich 10 µl AK⁺ bzw. AK⁻ zugegeben.
- b) In 3 Wells wurden jeweils 100 µl der zuvor markierten Neuroblastomzellen pipettiert und 10 µl RPMI-Medium als Volumenausgleich zugegeben.

Die beschickte 96-Well-Platte wurde nun für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, damit die Antikörper an die Neuroblastomzellen binden können.

Nach der Inkubationszeit von 30 Minuten wurden den mit Neuroblastomzellen (5000 Zellen) und AK⁺/AK⁻ bzw. Medium 1 (RPMI⁺/FCS_i) beschickten Wells jeweils 100 µl Effektorzellen (200.000 Granulozyten) in der benötigten Konzentration (soweit nicht anders vermerkt; E:T-Verhältnis 40:1) zugegeben.

Ist die 96-Well-Platte wie oben beschrieben vollständig beschickt, wird sie für 2 Minuten bei 400 g anzentrifugiert und für 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wird bei 37°C, 200g für 5 min erneut zentrifugiert, da für den Nachweis des Liganden nur der aus den lysierten Zellen freigesetzte Überstand benötigt wird.

In einer Flachbodenplatte wird nun die entsprechende Anzahl an Wells mit je 200 µl Europium-Lösung und je 20 µl Überstand beschickt und der Ansatz unter Lichtabschluss für 20 min auf den Schüttler gestellt. Anschließend kann das Ergebnis am Multilabel-Counter gemessen und ausgewertet werden.

Um die Qualität des Tests abschätzen zu können, muss die Spontanlyse des Versuchs in Prozent errechnet werden mit der Formel:

$$\text{Spontanlyse in \%} = (\text{Spontanlyse} - \text{Background} / \text{Maximallyse} - \text{Background}) \times 100.$$

Die Spontanlyse sollte nicht mehr als 25 – max. 30% betragen.

Um zu beschreiben, ob und wie viel ROS bei den jeweiligen Ansätzen gebildet werden, erfolgte eine parallel zu diesem Versuchsblock laufende Messung der Biolumineszenz (siehe Kapitel 2.2.8.2).

2.2.8.3.2 Einfluss einer Granulozyten-Vorinkubation mit Biobran® auf den BATDA-Release-Assay („Europium-Assay“) im Rahmen der ADCC-Reaktion neutrophiler Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen

Vorbemerkung zu Biobran®

Biobran® wurde 1992 in Japan entwickelt. Bei dem generischen Namen MGN-3 handelt es sich um die Anfangsbuchstaben der Entdecker (Maeda, Ghoneum und Ninomiya).

Es ist bekannt, dass viele Polysaccharide das Immunsystem stimulieren können und so im Sinne eines „biological response modifiers“ wirken. Einige davon – unter anderem Biobran® – werden sogar als Immunmodulatoren in der Tumorbehandlung eingesetzt.

Polysaccharide aus Pflanzenfasern können aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes nicht über den Darm resorbiert werden. Werden sie jedoch in kleinere Komponenten gespalten, können sie unverdaut über den Dünndarm aufgenommen werden und über den Blutkreislauf ihre Wirkung entfalten. Solche kleinere Komponenten nennt man Hemizellulosen. An dieser Stelle setzt Biobran® an. Reiskleie enthält Zellulose, Hemizellulose, Pektin und Lingin. Hemizellulose – ein Heteroglykan – enthält viele Monosaccharide. Ein spezieller Typ der Hemizellulose ist Hemizellulose B, dessen Molekulargewicht viel kleiner ist als bei anderen Hemizellulosen. Hemizellulose selbst besitzt keine immunmodulatorische Wirkung. Jedoch kann durch partielle Hydrolysierung von Hemizellulose B aus Reiskleie das Reiskleie-Hemizellulose-Derivat Biobran® hergestellt werden, dessen Hauptbestandteil das auch als beta-1,4-Xylophyronase-Hemizellulose bezeichnete Arabinoxylan ist.

ADCC-Testansatz

Um den Einfluss von Biobran® auf die Zellyse bei Zugabe der Antikörper AK^+ und AK^- gegen das Gangliosid GD_2 der Neuroblastomzellen aufzuzeigen (ADCC-Reaktion), erfolgte in einem Testansatz die Zugabe bzw. Inkubation neutrophiler Granulozyten mit Biobran®.

Hierzu wurden die – wie bereits im Vorkapitel beschrieben – isolierten neutrophilen Granulozyten für 2h mit Biobran® (0,1 mg/ml Zellsuspension) vorinkubiert bevor sie den Targetzellen hinzugegeben worden sind. Die weiteren methodischen Schritte erfolgten analog zu Kapitel 2.2.8.3.1.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der isolierten Granulozyten

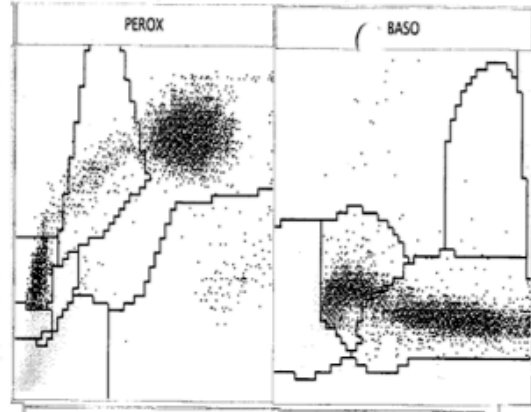
3.1.1 Analyse des Differentialblutbildes im Vollblut und nach Histopaque-Isolierung der Granulozyten mit Hilfe des ADVIA 120 der Fa. Siemens

Die Messanalytik erfolgte – wie bereits in Kapitel 2.2.3 beschrieben – nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgt aufgrund der Messung ihrer Größe, ihrer Peroxidaseaktivität und ihrer Zellkernmorphologie. Im Peroxidasekanal des Leukogramms wird die Peroxidaseaktivität (x-Achse) gegen die Größe und Granulierung der Zellen (Streulichtintensität; y-Achse) aufgetragen. Das bedeutet, je weiter rechts eine Zelle („Punkt“) eines Zellclusters auf der x-Achse liegt, desto mehr Peroxidase enthält die betreffende Zelle. Hierbei fallen bei der Analyse des Vollbluts im Differentialblutbild die Monozyten als große, schwach-peroxidasepositive Zellen auf. Im Gegensatz hierzu grenzen sich die Granulozyten als durchschnittlich höher peroxidasepositive Zellen und durch eine größere Streulichtaktivität ab (siehe Abb. 15 in Material und Methoden).

Auffällig ist, dass im Peroxidasekanal im Gegensatz zu der Vollblutprobe, bei der die Neutrophile-Granulozyten-Wolke klar von der Monozyten-Wolke abgegrenzt ist, nach erfolgter Histopaque-Isolierung diese Wolke in das Monozytenfeld streut (siehe Abb. 16). Dies ist die Folge einer Degranulation der neutrophilen Granulozyten während des Aufarbeitungsprozesses, in der sie bedingt durch mechanischen Stress einen Teil ihrer Granulainhalte – u.a. die Myeloperoxidase – in die Umgebung ausschütten, wodurch die Granulozyten zumindest teilweise in das Monozytenfeld verschoben werden. Der ADVIA 120 ordnet in Folge dessen diese degranulierten Granulozyten den Monozyten zu, wodurch sich der numerische Monozytenwert fälschlicherweise erhöht und der Neutrophilenwert sich erniedrigt. Dass es sich hierbei nicht um Monozyten handelt, erkennt man u.a. im

a)

| TEST | ERGEBNIS | ABN | NORMALBEREICH | EINHEITEN |
|--------|----------|-----|-----------------|------------|
| LEUKO | 6,03 | | (4,4 - 11,3) | x10.e3 /uL |
| ERY * | 4,86 | | (4,1 - 5,9) | x10.e6 /uL |
| HB * | 14,4 | | (12,3 - 17,5) | g/dL |
| HKT * | 41,3 | | (35 - 52) | % |
| MCV * | 84,9 | | (72 - 100) | fL |
| MCH * | 29,6 | | (25 - 34) | pg |
| MCHC * | 34,9 | | (30 - 36) | g/dL |
| %HYPO | 0 | | (0 - 5) | % |
| THROM | 143 | | (139 - 409) | x10.e3 /uL |
| | | | | |
| %NEUT | 66,0 | | (41,2 - 70,1) | % |
| %LYMP | 24,6 | | (22,4 - 47,9) | % |
| %MONO | 5,4 | | (0,7 - 9,3) | % |
| %EOS | 2,0 | | (0,8 - 6,2) | % |
| %BASO | 0,5 | | (0,2 - 1,3) | % |
| %LUC | 1,5 | | (0, - 4,7) | % |
| #NEUT | 3,98 | | (1,92 - 6,17) | x10.e3 /uL |
| #LYMP | 1,49 | | (1,32 - 3,24) | x10.e3 /uL |
| #MONO | 0,33 | | (0,04 - 0,63) | x10.e3 /uL |
| #EOS | 0,12 | | (0,05 - 0,38) | x10.e3 /uL |
| #BASO | 0,03 | | (0,01 - 0,07) | x10.e3 /uL |
| #LUC | 0,09 | | (0,03 - 0,35) | x10.e3 /uL |



b)

| TEST | ERGEBNIS | ABN | NORMALBEREICH | EINHEITEN |
|---------|----------|-----|-----------------|------------|
| LEUKO | 5,41 | | (4,4 - 11,3) | x10.e3 /uL |
| ERY * | 0,02 | | (4,1 - 5,9) | x10.e6 /uL |
| HB * | 0 | | (12,3 - 17,5) | g/dL |
| HKT * | 0,2 | | (35 - 52) | % |
| MCV * | 89,2 | | (72 - 100) | fL |
| MCH * | 0 | | (25 - 34) | pg |
| MCHC * | 0 | | (30 - 36) | g/dL |
| %HYPO | 1,6 | | (0 - 5) | % |
| THROM | 2 | | (139 - 409) | x10.e3 /uL |
| | | | | |
| %NEUT * | 48,1 | | (41,2 - 70,1) | % |
| %LYMP * | 0,2 | | (22,4 - 47,9) | % |
| %MONO * | 50,9 | | (0,7 - 9,3) | % |
| %EOS * | 0,8 | | (0,8 - 6,2) | % |
| %BASO | 0 | | (0,2 - 1,3) | % |
| %LUC * | 0 | | (0, - 4,7) | % |
| #NEUT * | 2,60 | | (1,92 - 6,17) | x10.e3 /uL |
| #LYMP * | 0,01 | | (1,32 - 3,24) | x10.e3 /uL |
| #MONO * | 2,75 | | (0,04 - 0,63) | x10.e3 /uL |
| #EOS * | 0,04 | | (0,05 - 0,38) | x10.e3 /uL |
| #BASO | 0 | | (0,01 - 0,07) | x10.e3 /uL |
| #LUC * | 0 | | (0,03 - 0,35) | x10.e3 /uL |

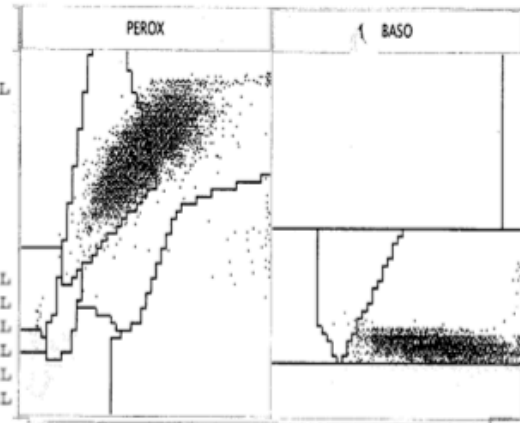


Abb. 20: Darstellung eines Vollblutleukogramms (a) und eines Leukogramms nach erfolgter Histopaqueisolierung (b).

Anmerkung: Die Zellzahlbestimmung wurde mit entsprechendem Peroxidase- und Basokanalbild am ADVIA 120 durchgeführt.

dazugehörigen Basokanalbild (siehe Abb. 16 und Abb. 20), in dem das Feld der mononukleären Zellen fast leer ist, das Feld der polymorphkernigen Zellen hingegen deutlich die Anwesenheit von Zellen zeigt. Dass es sich bei den vom ADVIA 120 numerisch zu den Monozyten zugehörigen Zellen definitiv um Granulozyten handelt, erkennt man durch eine mikroskopische Analyse.

Um die Fraktion der isolierten Granulozyten zu ermitteln, kann die Leukozytenzellzahl annähernd mit der Granulozytenzellzahl gleichgesetzt werden, da nach erfolgter Histopaque-Isolierung ca. 95-98% der Leukozyten tatsächlich Granulozyten sind (Abb. 20).

3.1.2 Charakterisierung der isolierten, nicht aktivierten Granulozyten während 0 bis 24-stündiger Lagerung

3.1.2.1 Verlauf der Degranulation

Granulozyten besitzen Granula mit Enzymen wie z.B. der MPO, die im Falle einer Infektion ins Außenmedium abgegeben werden können. Der Advia 120 misst die in den Granulozyten enthaltene MPO. Bei Entleerung der Granula kommt es so zu einer messbaren Linksverschiebung der Granulozytenwolke, die ausgemessen und somit in willkürlich gewählter Einheit („mm“) charakterisiert werden kann.

Untersucht wurde einerseits der Einfluss der Lagerung bei verschiedenen langen Inkubationszeiten, als auch der Einfluss einer Lagerung in verschiedenen Inkubationsmedien wie PBS⁺⁺ (+/- Glukose (5 mmol/l)). Ferner wurde der Einfluss einer Inkubation mit GM-CSF (1000 U/ml Granulozytensuspension bei einer Zellzahl von 200.000/ 75 µl) auf den Vorgang der Degranulation untersucht (siehe hierzu Kapitel 3.1.2.6.5).

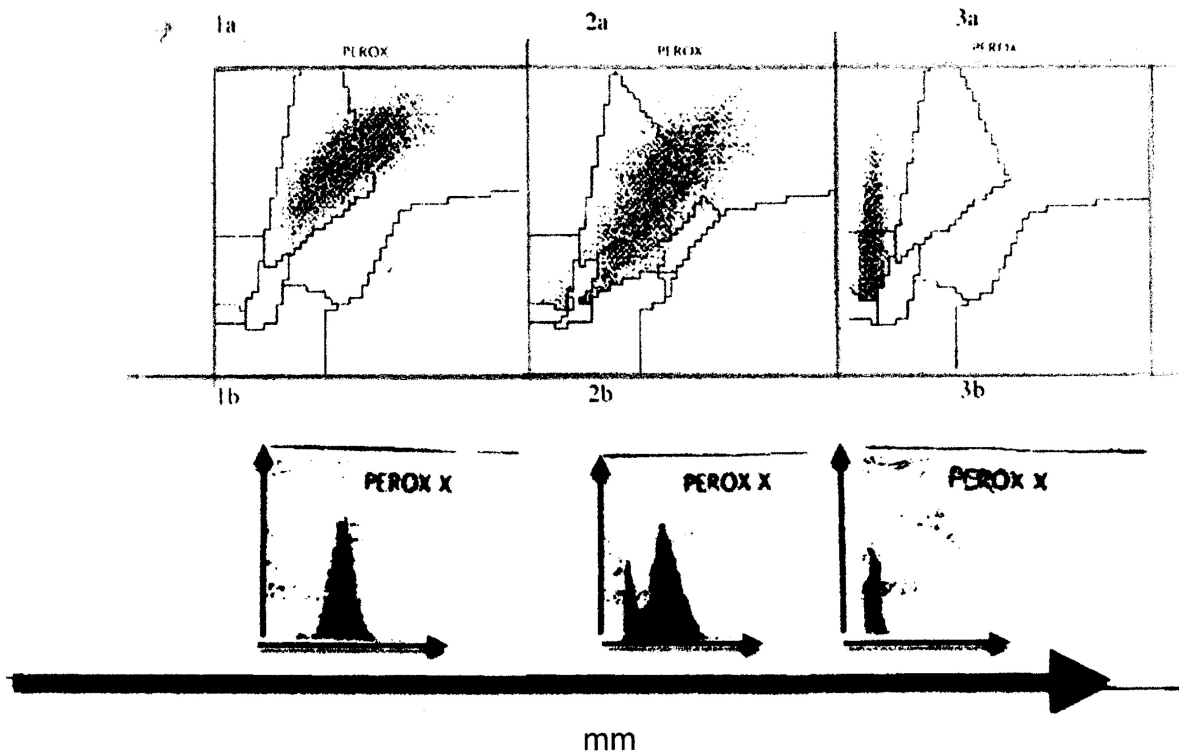


Abb. 21: Beispiel für den Verlauf der Degranulation isolierter Granulozyten nach erfolgter Histopaque-Isolierung.

1a): ADVIA Perox-Kanal; Messung zum Startzeitpunkt t_0 der Lagerung der isolierten Granulozyten in PBS⁺⁺; 1b): zugehöriges Perox X-Histogramm.

2a): ADVIA Perox-Kanal; Messung nach 14-stündiger Lagerung der isolierten Granulozyten in PBS⁺⁺ im Wasserbad bei 37°C; 2b): zugehöriges Perox X-Histogramm.

3a): ADVIA Perox-Kanal; Messung nach 22-stündiger Lagerung der isolierten Granulozyten in PBS⁺⁺ im Wasserbad bei 37°C; 3b): zugehöriges Perox X-Histogramm

Anmerkung: Die MPO-reichen Granulozyten befinden sich auf der Peroxidase-Achse (x-Achse) im Perox-Kanal weit rechts (Graphik oben); ebenso im zugehörigen Perox-X-Histogramm. Eine „Linksverschiebung“ durch Degranulation kann im Perox-X-Histogramm graphisch erfasst werden, indem die Lage des Peaks ausgemessen wird. So können Testansätze zum Zeitpunkt t_0 mit einem späteren Zeitpunkt verglichen werden.

In Abb. 21 ist ein Beispiel für den zeitlichen Verlauf der Degranulation isolierter Granulozyten nach erfolgter Histopaque-Isolierung zu sehen. Die Granulozytenwolke nach erfolgter Histopaque-Isolierung zum Zeitpunkt t_0 ist im Vergleich zur Vollblutprobe (siehe auch Abb. 16) durch den mechanisch bedingten Stress während der Histopaque-Isolierung schon deutlich nach links verschoben. Nach 14-stündiger Lagerung bei 37°C in PBS⁺⁺ kommt es zu einer weiteren Linksverschiebung und nach 22-stündiger Lagerungszeit ist praktisch keine MPO-Aktivität mehr nachweisbar (siehe Abb. 21-22). Abbildung 22 zeigt durch Ausmessung der Lage des Histogramms (0 mm bedeutet vollständige Degranulation) den Verlauf der Degranulation isolierter Granulozyten bei Inkubation der Zellen in PBS⁺⁺ bzw. PBS⁺⁺ mit Glukose über 22 Stunden. Dabei sind überraschenderweise keine auffälligen Unterschiede zwischen den Ansätzen mit und ohne Glukose zu erkennen. Bis zu 4 Stunden nach der Isolierung wurde keine weitere Degranulation festgestellt. Erst bei längerer Lagerungsdauer stellten sich messbare Effekte ein. Allerdings wurde gelegentlich auch beobachtet, dass die Degranulation auch nach 22-stündiger Lagerung gering ausfiel (Daten nicht gezeigt).

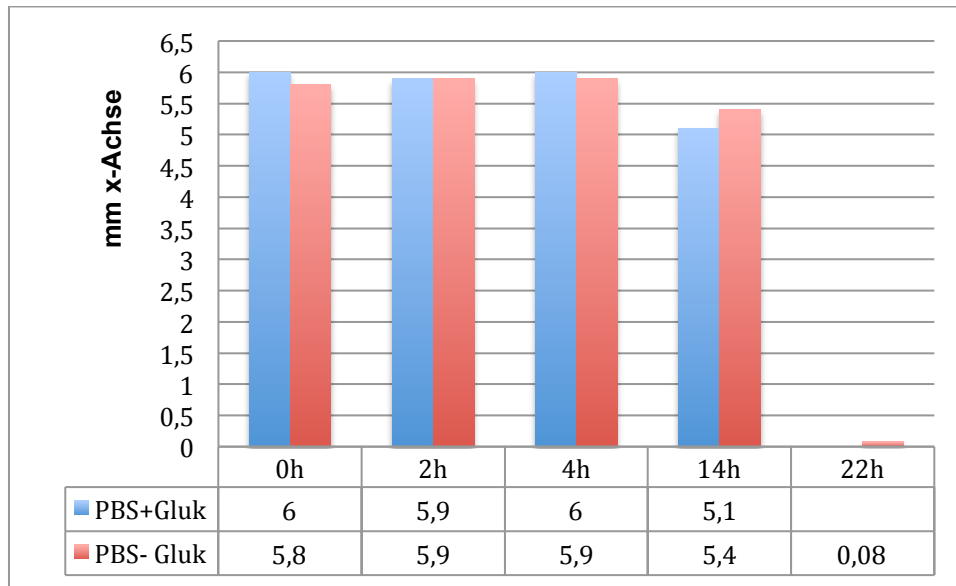


Abb. 22: Verlauf der Degranulation isolierter Granulozyten bei Lagerung in glukose- bzw. nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ (= PBS + Ca⁺⁺ + Mg⁺⁺) und nach verschieden langen Lagerungszeiten.

Anmerkung: Exemplarischer Einzelversuch. Untersucht wurde der Einfluss auf die Degranulation isolierter Granulozyten (200.000 Zellen/ 75 µl PBS⁺⁺ +/- 5mM Glukose) bei Lagerung in glukosehaltiger (5mmolar) PBS⁺⁺ im Vergleich zur Lagerung in nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ bei verschieden langen Lagerungszeiten in einem Wasserbad bei 37°C. Die Zeitachse variierte von einem Nullwert (t₀-Wert) bis zu 22 Stunden. Ein 22h-Wert der in glukosehaltiger PBS⁺⁺ gelagerten Granulozyten fehlt. Die Linksverschiebung (Degranulation) wurde im Perox-X-Histogramm im ADVIA 120 ausgemessen. Charakteristisch hierfür ist eine Verschiebung im Perox-X-Diagramm, bei dem auf der x-Achse der Gehalt an MPO angegeben ist. So kann in den zugehörigen Perox-X-Histogrammen eine Verschiebung graphisch erfasst werden, indem die Lage des Peaks auf der x-Achse ausgemessen wird.

3.1.2.2 Veränderungen des Glykogengehaltes in neutrophilen Granulozyten nach verschieden langen Lagerungszeiten

Die Versuche wurden nach der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Methode durchgeführt.

Neutrophile Granulozyten gewinnen ihre Energie in Form von ATP fast ausschließlich über bereits angelegte Glykogenreserven und über die anaerobe Glykolyse. Obwohl neutrophile Granulozyten Mitochondrien besitzen, nützen sie die

Möglichkeit der oxidativen Phosphorylierung nicht für die ATP-Gewinnung, so dass ATP fast ausschließlich über die Glykolyse und den Abbau von Glukose zu Pyruvat und Laktat gewonnen wird, währenddessen O_2 für die Bildung von ROS eingespart werden kann (siehe auch Abb. 7).

Ziel dieses Versuchsblocks war es, den Glykogengehalt neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Lagerung (Zeitachse: t_0 -Wert, 2h, 4h, 23h) und in Bezug auf eine Inkubation in glukosehaltiger (5 mmolar) bzw. nichtglukosehaltiger PBS^{++} zu bestimmen. So sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich Granulozyten bezüglich des Glykogengehaltes stabiler zeigen, wenn sie die Möglichkeit haben, sich der Glukose direkt aus dem Inkubationsvolumen bedienen zu können. Parallel zu diesem Versuchsblock wurden immer auch die Überstände der Ansätze auf den Gehalt an Glukose und Laktat untersucht (siehe Kapitel 3.1.2.3).

Es wurde auch der Frage nachgegangen, welchen Einfluss Differenzierungsfaktoren auf den lagerungsabhängigen Verlauf des Glykogengehalts neutrophiler Granulozyten ausüben können (siehe Kapitel 3.1.2.6).

In Abb. 23 ist in einem exemplarischen Einzelversuch ($n=13$) der Glykogengehalt während einer 24-stündigen Lagerung der Granulozyten gezeigt. So zeigt sich sowohl bei einer Lagerung in glukosehaltiger (5 mmol/l), als auch in nichtglukosehaltiger PBS^{++} im Zeitverlauf eine deutliche Abnahme des Glykogengehalts. Ein wesentlicher Einfluss einer Lagerung in glukosehaltiger (5 mmol/l) PBS^{++} konnte im Vergleich zum glukosefreien Medium nicht festgestellt werden. Diese Beobachtung war auch in weiteren Versuchen erkennbar ($n=13$; Daten nicht gezeigt).

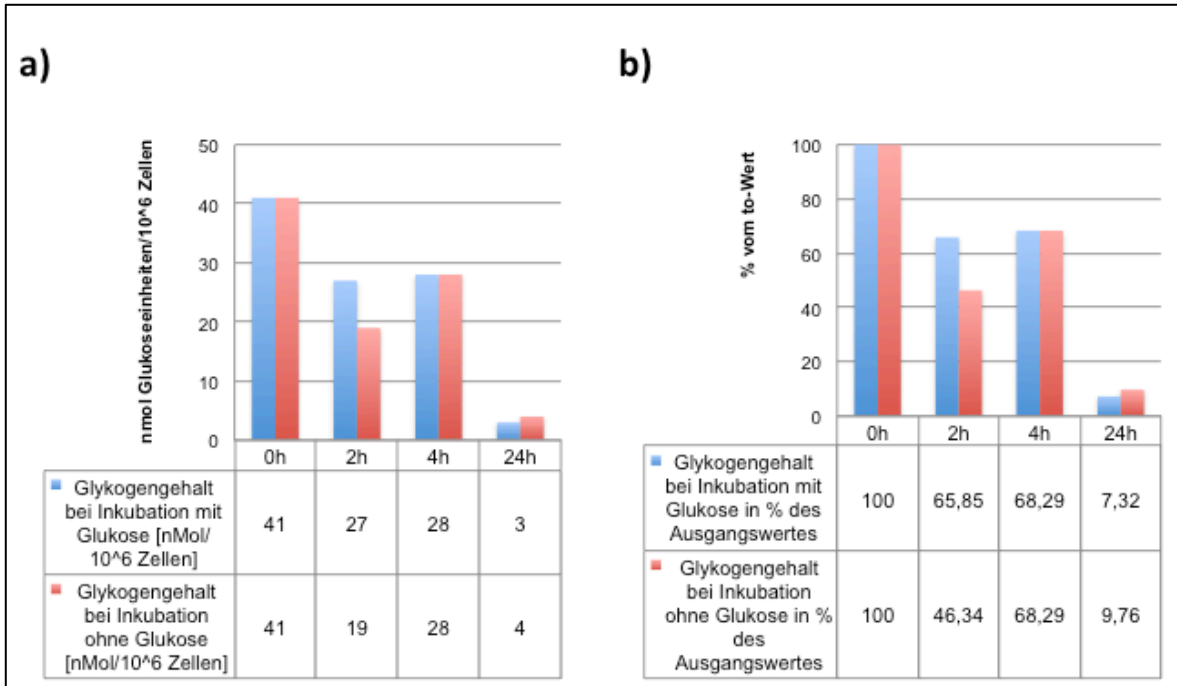


Abb. 23: Bestimmung des Glykogengehalts neutrophiler Granulozyten nach verschiedenen langen Lagerungszeiten unter Einfluss einer glukosehaltigen (5 mmol/l) bzw. nichtglukosehaltigen Inkubation in PBS⁺⁺.

a) Angabe des Glykogengehalts in nmol Glukoseeinheiten/10⁶ Zellen

b) Angabe des Glykogengehalts in % des Ausgangswertes t_0 (41 nmol Glukoseeinheiten/10⁶ Zellen entspricht 100%)

Anmerkung: Exemplarischer Einzelversuch (n=13). Es erfolgte eine Inkubation neutrophiler Granulozyten in glukosehaltiger (5 mmolarer) PBS⁺⁺ und nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ bei 37°C. Der Glykogengehalt wurde direkt im Anschluss der Inkubationszeit bestimmt.

3.1.2.3 Glukoseverbrauch und Laktatproduktion während der Lagerung

Die Versuche wurden nach der in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Methode und die Granulozytenisolation in Analogie zu Kapitel 2.2.2 durchgeführt.

Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurde die Granulozytensuspension in PBS⁺⁺ mit bzw. ohne Glukose (5 mmol/l) gewaschen und das Zellpellet anschließend in PBS⁺⁺ mit bzw. ohne Glukose resuspendiert.

In diesen Experimenten wurden immer die Überstände der Ansätze auf den Gehalt an Glukose und Laktat untersucht. Es wurden stets die Überstände der Ansätze vermessen, bei denen analog der Glykogengehalt der Zelle bestimmt wurde (siehe Vorkapitel).

In diesem Versuchsblock sollte der Frage nachgegangen werden, wieviel Glukose während der Lagerung in glukosehaltiger (5 mmolar) PBS⁺⁺ verwertet und wieviel Laktat hierbei während des Inkubationsprozesses gebildet wird. Im Gegensatz zu der Lagerung in glukosehaltiger PBS⁺⁺, wo Glukose aus dem Inkubationsvolumen durch die Zelle aufgenommen und direkt in die Glykolyse eingeschleust werden kann, stammt das Laktat bei der Granulozytenlagerung in nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ rein aus dem Abbau der bereits angelegten Glykogenreserven.

Wie erwartet konnte festgestellt werden, dass die Laktatproduktion isolierter Granulozyten in glukosehaltiger Lagerung einen im Zeitverlauf (insbesondere im Langzeitwert nach ca. 24 Stunden) deutlich höheren Wert erreicht, als bei nichtglukosehaltiger Lagerung (siehe Abb. 24). Die Laktatbildung in glukosehaltiger PBS⁺⁺ kann einerseits über die bereits angelegten Glykogenreserven, andererseits auch über direkt aus dem Inkubationsvolumen über die Zelle verstoffwechelte Glukose stattfinden (siehe Abb. 25).

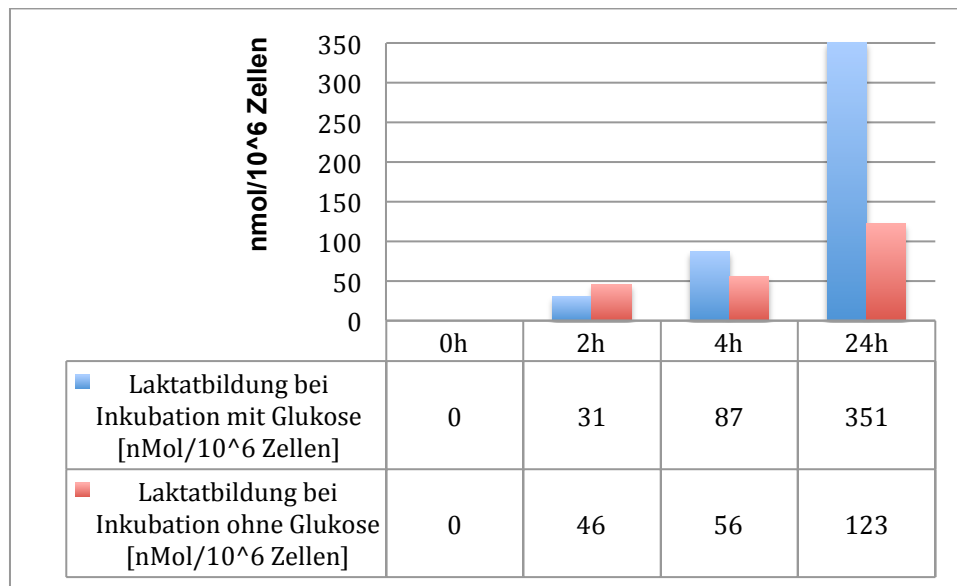


Abb. 24: Untersuchung der Laktatproduktion isolierter Granulozyten in Gegenwart und Abwesenheit von Glukose und nach verschiedenen langen Lagerungszeiten.

Anmerkung: Exemplarischer Einzelversuch (n=4). Zur Bestimmung der Laktatproduktion isolierter Granulozyten erfolgte eine Lagerung der Granulozyten in glukosehaltiger (5 mmol/l) und nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ bei 37°C. Die Laktatproduktion wird in nmol/10⁶ Zellen angegeben.

Unter der Annahme, dass in Gegenwart von freier Glukose im Inkubationsmedium diese zuerst vollständig verstoffwechselt wird, bevor die Glykogenreserven „angetastet“ werden, kann man davon ausgehen, dass die aus dem Inkubationsvolumen aufgenommene Glukose praktisch zu 100% in Laktat umgesetzt wird (siehe Abb. 25; bei der anaeroben Glykolyse werden 1 mol Glukose zu 2 mol Laktat umgesetzt). Währenddessen findet die Laktatbildung der isolierten Granulozyten bei Lagerung in nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ rein über bereits angelegte Glykogenreserven statt.

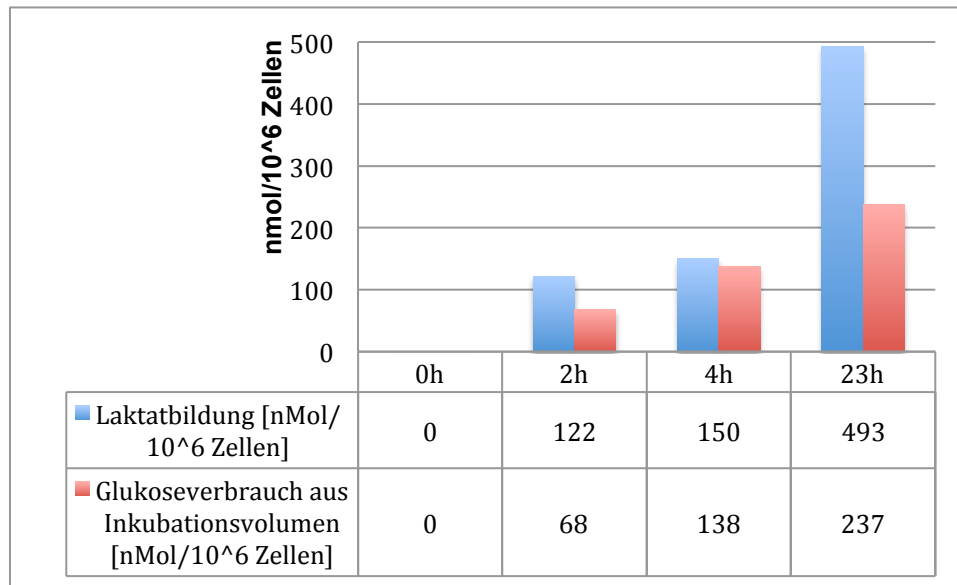


Abb. 25: Bestimmung des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion im Überstand bei isolierten neutrophilen Granulozyten nach verschiedenen langen Lagerungszeiten bei Inkubation in glukosehaltiger (5 mmol/l) PBS⁺⁺.

Anmerkung: Exemplarischer Einzelversuch (n=4). Es erfolgte eine Inkubation der isolierten Granulozyten in glukosehaltiger (5 mmolarer) PBS⁺⁺ bei 37°C. Die Laktatproduktion wird in nmol/10⁶ Zellen angegeben. Der Glukoseverbrauch ist die Differenz des Gehalts an Glukose vor (5 mM) und nach der Inkubation.

3.1.2.4 Veränderung des ATP-Gehaltes isolierter Granulozyten unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Neutrophile Granulozyten gewinnen ihre Energie fast ausschließlich durch anaerobe Glykolyse aus freier Glukose bzw. über angelegte Glykogenreserven (anaerobe Glykolyse: aus dem Abbau von 1 mol Glukose zu 2 mol Laktat werden 2 mol ATP gewonnen). Obwohl Granulozyten Mitochondrien besitzen, nützen sie die Möglichkeit der oxidativen Phosphorylierung nicht für die ATP-Gewinnung (aerobe Glykolyse: $1 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2 \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + \text{ca. } 32 \text{ ATP}$; Strieter, 2003).

Die Bestimmung des ATP-Gehalts der Granulozyten wurde nach der in Kapitel 2.2.6 beschriebenen Methode durchgeführt.

Ziel dieses Versuchsblocks war die Bestimmung des ATP-Gehalts sowohl unstimulierter Granulozyten (d.h. ohne Stimulation der Granulozyten durch opson. Zymosan), als auch die Änderung des ATP-Gehalts nach Phagozytose von opson. Zymosan während der Lagerung bei 37°C in RPMI-Medium nach verschiedenen langen Lagerungszeiten (Zeitachse: t_0 -Wert bis ca. 22-25-h) zu bestimmen.

Analog hierzu wurde der ATP-Gehalt in Abhängigkeit einer Vorinkubation mit Differenzierungsfaktoren wie G- bzw. GM-CSF während der Lagerung bei 37°C in RPMI-Medium nach verschiedenen langen Vorinkubationszeiten bestimmt (siehe Kapitel 3.1.2.6).

3.1.2.4.1 Die zeitabhängige Änderung der ATP-Konzentration in unstimulierten Granulozyten

Abbildung 26 zeigt die lagerungsabhängige ATP-Konzentration unstimulierter Granulozyten. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben isoliert. Für die Darstellung der Werte in den folgenden Diagrammen wurden die Werte als prozentualer Anteil der ATP-Konzentration zum Mittelwert des t_0 -Wertes unstimulierter Granulozyten angegeben, da die Ausgangswerte nach der Granulozytenisolierung recht unterschiedlich waren. Durch die Darstellung in % ist so eine bessere Vergleichbarkeit gewährleistet.

In dem Diagramm Abb. 26 ist zu entnehmen, dass der ATP-Gehalt der Granulozyten während der Inkubation vorübergehend erst zunimmt und sich über Stunden stabil zeigt, um dann nach circa 22-25 Stunden deutlich abzunehmen.

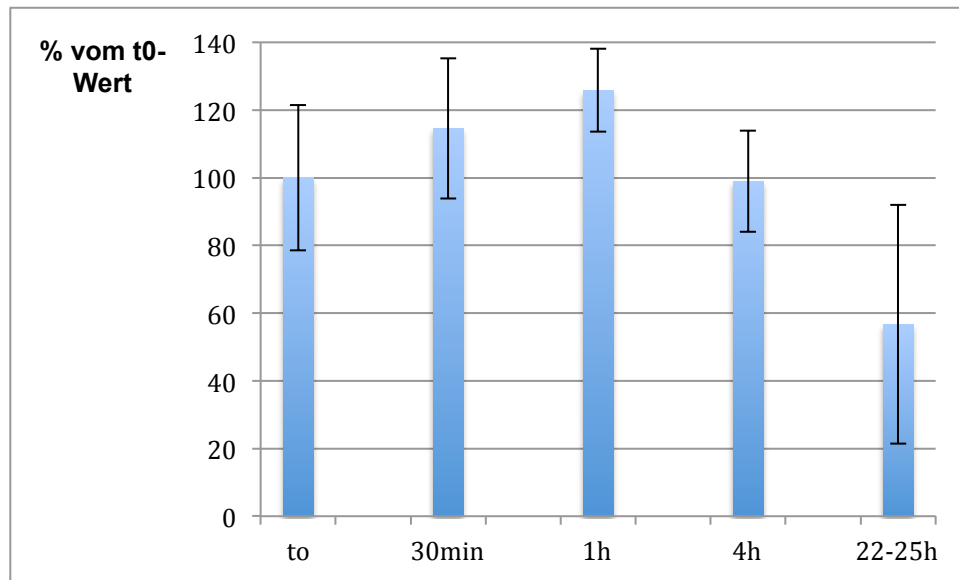


Abb. 26: Lagerungsabhängiger ATP-Gehalt isolierter Granulozyten nach Inkubation in RPMI-Medium bei 37°C im Brutschrank.

Anmerkung: Die Werte sind angegeben als Anteile in Prozent (%) in Bezug zum Mittelwert des t₀-Wertes. Der ATP-Gehalt wurde als pmol/10⁶ Zellen berechnet. T₀= 100% entspricht 295 pmol/10⁶ Zellen (+/- SD von 63,38 pmol/10⁶ Zellen; n=5 für t₀, 30 min, 1h, 4h; n=4 für 22-25h).

3.1.2.4.2 Die zeitabhängige Änderung der ATP-Konzentration isolierter Granulozyten nach Phagozytose von opsonisiertem Zymosan

Für diese Versuchsreihe wurden die Granulozyten einerseits mit G- bzw. GM-CSF (f.c. 1000 units/ml; siehe Kapitel 2.2.6 und 3.1.2.6), als auch mit opson. Zymosan inkubiert (0,1 mg/ml Granulozytensuspension und 200.000 Zellen/75 µl). Ziel dieses Versuchblockes war es, die isolierten neutrophilen Granulozyten zu aktivieren und den „oxidativen burst“ auszulösen, um so deren Einfluss auf die lagerungsabhängige ATP-Konzentration eruieren zu können.

Abbildung 27 zeigt die lagerungsabhängige ATP-Konzentration stimulierter Granulozyten. Für die Darstellung der Werte in den folgenden Diagrammen wurden die Werte als prozentualer Anteil der ATP-Konzentration zum Mittelwert des t₀-Wertes stimulierter Granulozyten angegeben.

Hieraus ist zu entnehmen, dass der ATP-Gehalt der Granulozyten während der Inkubation langsam, aber kontinuierlich abnimmt. Die bei unstimulierten Zellen initial festgestellte Zunahme entfällt nach Stimulation mit opson. Zymosan (0,1 mg/ml Granulozytensuspension und 200.000 Zellen/75 μ l); der Langzeitwert nach 22-25h zeigt relativ ähnliche Werte wie bei den unstimulierten Zellen (Vergleich Abb. 27 mit Abb. 26: ca. 55% des Ausgangswertes).

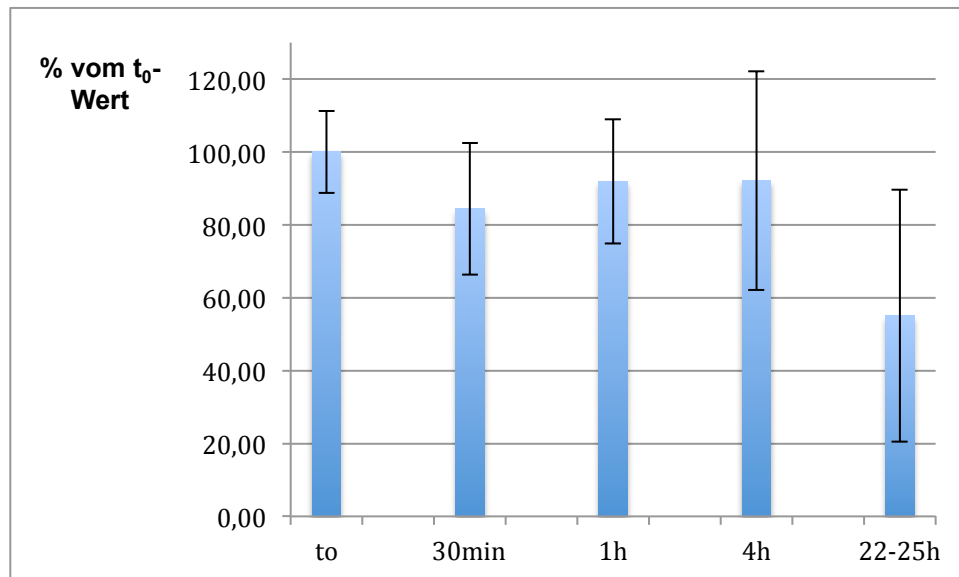


Abb. 27: Lagerungsabhängiger ATP-Gehalt isolierter Granulozyten nach Phagozytose von opson. Zymosan (Inkubation in RPMI-Medium bei 37°C im Brutschrank).

Anmerkung: Die Werte sind angegeben als Anteile in Prozent (%) in Bezug zum Mittelwert des t₀-wertes. Der ATP-Gehalt wurde als pmol/10⁶ Zellen berechnet. T₀= 100% entspricht 312,6 pmol/10⁶ Zellen (+/- SD von 35,13 pmol/10⁶ Zellen; n=4 für t₀-Wert und 22-25h-Wert; n=5 für Werte nach Lagerung 30 min, 1h, 4h). Die Granulozyten-Stimulation erfolgte mit opson. Zymosan (0,1 mg/ml Granulozytensuspension) und bei einer Zellzahl von 200.000/75 μ l.

3.1.2.5 Die lagerungsabhängige Bildung von ROS in isolierten Granulozyten nach Phagozytose von opsonisiertem Zymosan

In diesem Versuchsblock wurde die Fähigkeit isolierter neutrophiler Granulozyten zum „oxidativen burst“ nach verschiedenen langen Lagerungszeiten überprüft und die Luminol-abhängige Chemilumineszenz gemessen. Untersucht wurde der Einfluss der Lagerung isolierter Granulozyten auf den Funktionszustand hinsichtlich der Produktion von ROS. Hierzu wurden die Granulozyten nach der in Kapitel 2.2.2 und 2.2.7 beschriebenen Methode isoliert.

Untersucht wurde sowohl der Einfluss bei der Wahl des Inkubationsmediums (5 mmolare glukosehaltige PBS⁺⁺ bzw. nichtglukosehaltige PBS⁺⁺), als auch der Einfluss von GM-CSF (Endkonzentration 1000 U/ml Zellsuspension). Zuletzt erfolgte zudem eine Untersuchung des Einflusses einer Glukosezugabe (5 mmolar) unmittelbar vor Beginn der Messung des „oxidativen burst“. Die Stimulation des „oxidativen burst“ erfolgte mit opson. Zymosan (f.c. 250 µg/ml). Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Versuchsanordnung.

Tab. 3: Überblick der Versuchsanordnung bei der Bestimmung der lagerungsabhängigen Bildung von ROS in isolierten Granulozyten.

| |
|---|
| PBS ⁺⁺ + 5 mmol/l Glukose |
| PBS ⁺⁺ ohne Glukose |
| PBS ⁺⁺ + 5 mmol/l Glukose + GM-CSF (Endkonzentration 1000 U/ml Zellsuspension) |
| PBS ⁺⁺ ohne Glukose + GM-CSF (Endkonzentration 1000 U/ml Zellsuspension) |
| PBS ⁺⁺ ohne Glukose + GM-CSF (Endkonzentration 1000 U/ml Zellsuspension) + 5 mmol/l Glukose-Zugabe unmittelbar vor Bestimmung der Chemilumineszenz |
| PBS ⁺⁺ ohne Glukose + 5 mmol/l Glukose-Zugabe unmittelbar vor Bestimmung der Chemilumineszenz |

Für die Auswertung wurde die Emission von Licht 30 min lang gemessen und die Durchschnittswerte aus 3 gleichen Proben als Kurve aufgezeichnet. Die Fläche unter der Kurve wird als Integral berechnet und in relativen Lichteinheiten (relative light

units, RLU) gemessen. Zu sehen sind die Ergebnisse aus drei Versuchen, die als Mittelwert mit Standardabweichung aufgetragen sind.

3.1.2.5.1 Einfluss der Lagerung isolierter Granulozyten in glukosehaltigem PBS⁺⁺ auf die Bildung von ROS

Der Einfluss einer Lagerung isolierter Granulozyten in glukosehaltiger (5mmol/l) PBS⁺⁺ auf die Bildung von ROS wurde mit einer Messung der Biolumineszenz untersucht.

Die Inkubation von neutrophilen Granulozyten in glukosehaltigem (5mmolar) PBS⁺⁺ führte zu einer Steigerung der ROS-Produktion im Vergleich zur Inkubation der Granulozyten in glukosefreiem Medium. Wurden die Granulozyten nicht in Glukose gelagert, führte dies beispielsweise zu einer Verringerung der ROS-Bildung um ca. 40% nach 4-stündiger Inkubation bzw. um ca. 30% nach 22-stündiger Inkubation (siehe Abb. 28).

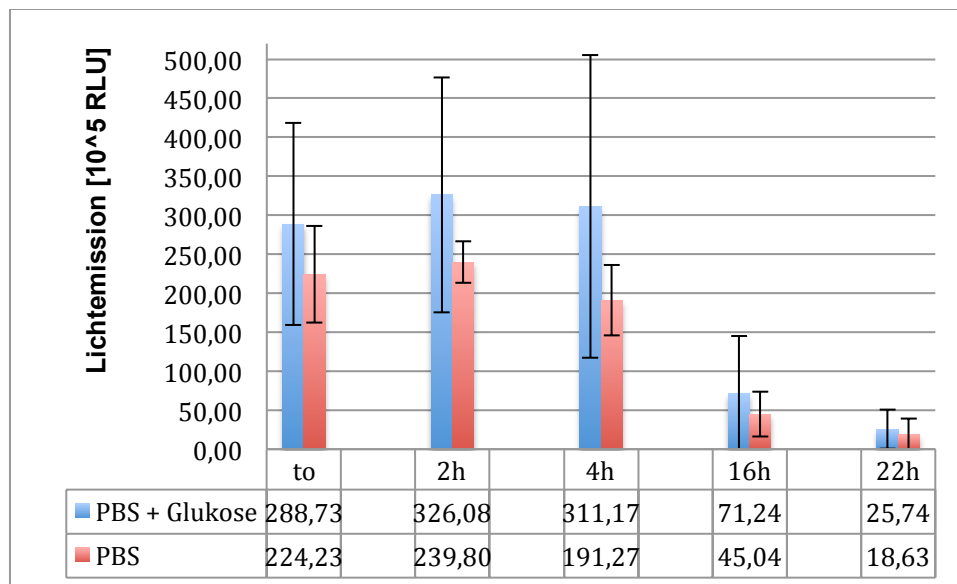


Abb. 28: Einfluss einer glukosehaltigen Vorinkubation isolierter Granulozyten in PBS⁺⁺ auf die Bildung von ROS nach verschiedenen langen Vorinkubationszeiten bei Stimulation mit opson. Zymosan.

Anmerkung: Es erfolgte eine Vorinkubation neutrophiler Granulozyten in glukosehaltiger PBS⁺⁺ (5 mmol/l Glukose) in einem Wasserbad bei 37°C. Als Kontrolle dienten in PBS⁺⁺ inkubierte Granulozyten. Für die luminolabhängige Chemilumineszenz wurden 100.000 neutrophile Granulozyten in 100 µl PBS⁺⁺ +/- Glukose (5 mmol/l) in einer nichttransluminenten 96-Well-Platte für 30 min untersucht. 25 µl Luminol (f.c. 4 µg/ml pro Well) wurden zugegeben. Die Granulozyten wurden mit 25 µl opson. Zymosan (f.c. 250 µg/ml) stimuliert. Die Chemilumineszenz-Messung erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C im Luminometer. Als Einheit diente Relative Lights Units (RLU). Insgesamt wurden 3 Versuche durchgeführt.

Analog zu Abb. 28 zeigt auch die kurzfristige Glukosezugabe nach Vorinkubation in glukosefreier PBS⁺⁺ eine tendenziell höhere ROS-Bildung, als bei Nichtzugabe von Glukose. Dieser Unterschied zeigt sich insbesondere nach 4-stündiger Lagerung. Nach 22-stündiger Vorinkubation zeigt sich – analog zur oben gezeigten Dauerinkubation in glukosehaltiger PBS⁺⁺ – ebenfalls noch eine Zunahme der ROS-Bildung um ca. 30% (versus ca. 40% bei dauerhafter Inkubation in Glukose).

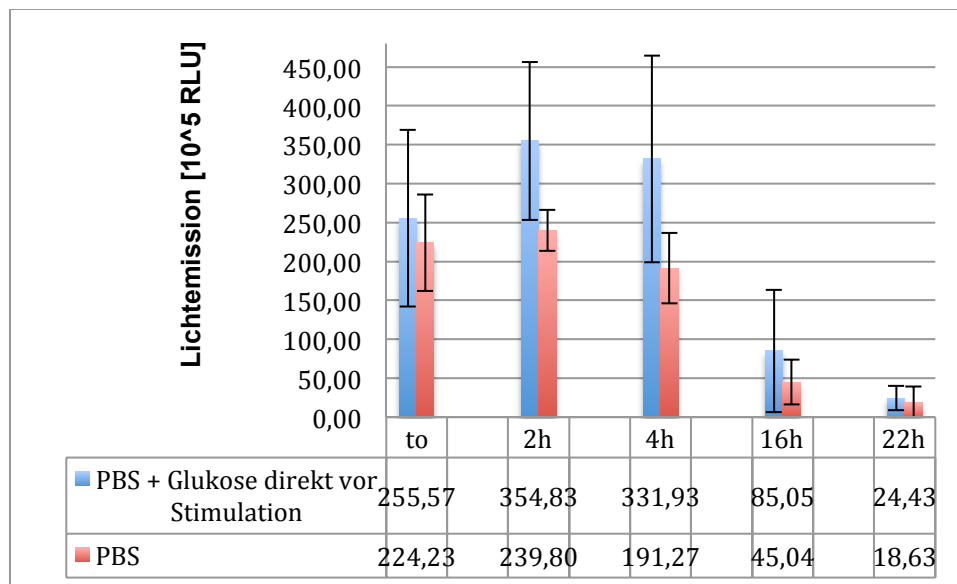


Abb. 29: Einfluss einer Glukosezugabe direkt vor Stimulation des „oxidativen burst“ mit opson. Zymosan auf die Bildung von ROS isolierter Granulozyten nach verschiedenen langen Vorinkubationszeiten und Lagerung in nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺.

Anmerkung: Es erfolgte eine Vorinkubation neutrophiler Granulozyten in PBS⁺⁺ in einem Wasserbad bei 37°C. Für die luminolabhängige Chemilumineszenz wurden 100.000 neutrophile Granulozyten in 100 µl PBS⁺⁺ in einer nichttransluminenten 96-Well-Platte für 30 min untersucht. 25 µl Luminol (f.c. 4 µg/ml pro Well) wurden zugegeben. Kurz vor Beginn der Stimulation mit opson. Zymosan wurden den entsprechenden Wells 10 µl 5 mmolarer Glukose (in PBS⁺⁺) zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Die Granulozyten wurden mit 25 µl opson. Zymosan (f.c. 250 µg/ml) stimuliert. Die Chemilumineszenz-Messung erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C im Luminometer. Als Einheit diente Relative Lights Units (RLU). Insgesamt wurden 3 Versuche durchgeführt.

3.1.2.6 Einfluss von G-CSF und GM-CSF auf verschiedene Parameter isolierter Granulozyten während der Lagerung

3.1.2.6.1 Einfluss von GM-CSF auf den Glykogengehalt isolierter Granulozyten während der Lagerung

Die Granulozytenisolation und die Versuche wurden nach der in Kapitel 2.2.2 und 2.2.4 beschriebenen Methode durchgeführt.

Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurde die Granulozytensuspension in PBS⁺⁺ mit bzw. ohne Glukose (5 mmol/l) gewaschen und das Zellpellet anschließend in PBS⁺⁺ mit bzw. ohne Glukose resuspendiert.

Ziel dieses Versuchsblocks war es den Einfluss von Differenzierungsfaktoren wie GM-CSF auf den Glykogengehalt isolierter neutrophiler Granulozyten während der Lagerung zu bestimmen, einmal in Abwesenheit, einmal in Anwesenheit von Glukose. So soll der Verlauf des Glykogengehaltes in Abhängigkeit von der Lagerung (Zeitachse: t₀-Wert, 2h, 4h, 23h), in Abhängigkeit einer Inkubation in glukosehaltiger PBS⁺⁺ (5 mmol/l) und nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺, als auch in Abhängigkeit einer Inkubation mit GM-CSF (1000 U/ml Granulozytensuspension) bestimmt werden. Hierbei sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich Neutrophile bezüglich des Glykogengehaltes stabiler zeigen, wenn sie mit GM-CSF inkubiert werden und ferner die Möglichkeit haben, sich der Glukose direkt aus dem Inkubationsvolumen bedienen zu können.

Exemplarisch wurde so in einem Einzelversuch der Einfluss von GM-CSF (1000 U/ml Granulozytensuspension) auf den Glykogengehalt neutrophiler Granulozyten aufgezeigt. Hierbei zeigt sich – wie in Abb. 30 zu sehen – erneut eine deutliche Abnahme (Abnahme um circa 45-65%) des Glykogengehaltes nach 14-stündiger Inkubation, sowohl in glukose- bzw. nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺, als auch bei (Nicht-)Zugabe von GM-CSF. Hierbei konnte kein wesentlicher Einfluss von GM-CSF auf den Glykogengehalt festgemacht werden, sodass auf weitere Versuche verzichtet wurde.

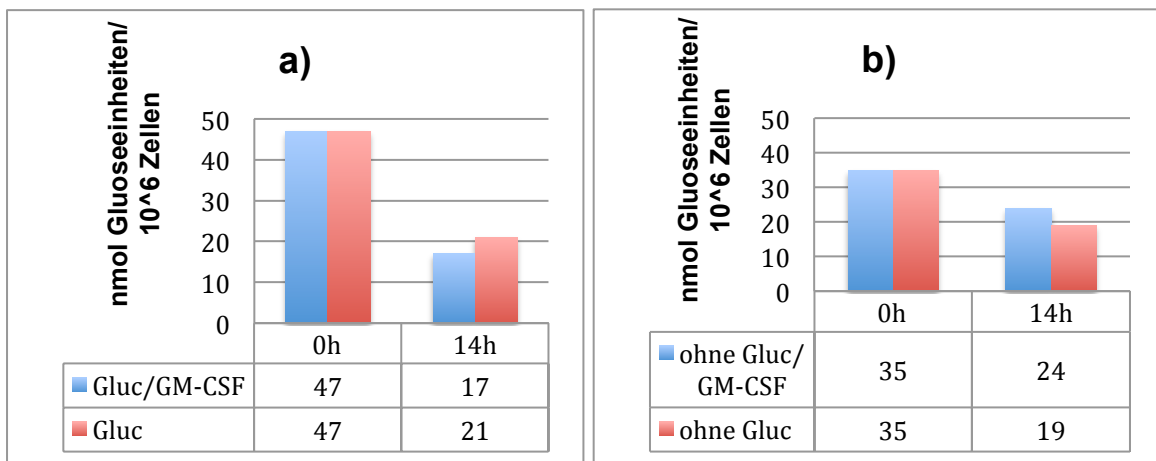


Abb. 30: Lagerungsabhängiger Glykogengehalt isolierter Granulozyten nach 0- und 14-stündiger Inkubationszeit bei Lagerung in a) glukosehaltiger PBS⁺⁺ und b) in nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ und Coinkubation mit GM-CSF bei 37 °C Wasserbad.

Anmerkung: Exemplarischer Einzelversuch. Es erfolgte eine 14-stündige Inkubation isolierter Granulozyten in a) glukosehaltiger (5 mmolarer) PBS⁺⁺ und b) nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ in einem Wasserbad bei 37°C. Es erfolgte zudem eine Coinkubation mit GM-CSF (1000 U/ml Granulozytensuspension). Der Glykogengehalt wird in nmol Glukoseeinheiten/10⁶ Zellen angegeben. Als Referenzpunkt dient ein t₀-Wert.

3.1.2.6.2 Einfluss von G-CSF und GM-CSF auf den ATP-Gehalt während der Lagerung in unstimulierten Granulozyten

Ziel dieses Versuchsblocks war die Untersuchung des Einflusses von G- und GM-CSF auf den ATP-Gehalt isolierter und unstimulierter (ohne Zymosan-Stimulation) Granulozyten während der Lagerung bei 37 °C (Zeitachse: t₀-Wert bis 22-25-h).

Einen genauen Einblick auf die Veränderung des lagerungsabhängigen ATP-Gehalts isolierter Granulozyten gibt Kapitel 3.1.2.4.

Die Zellen wurden wie vorherbeschrieben isoliert. Für die Darstellung der Werte in den folgenden Diagrammen wurden die Werte als prozentualer Anteil der ATP-Konzentration zum Mittelwert des t_0 -Wertes der isolierten Granulozyten angegeben.

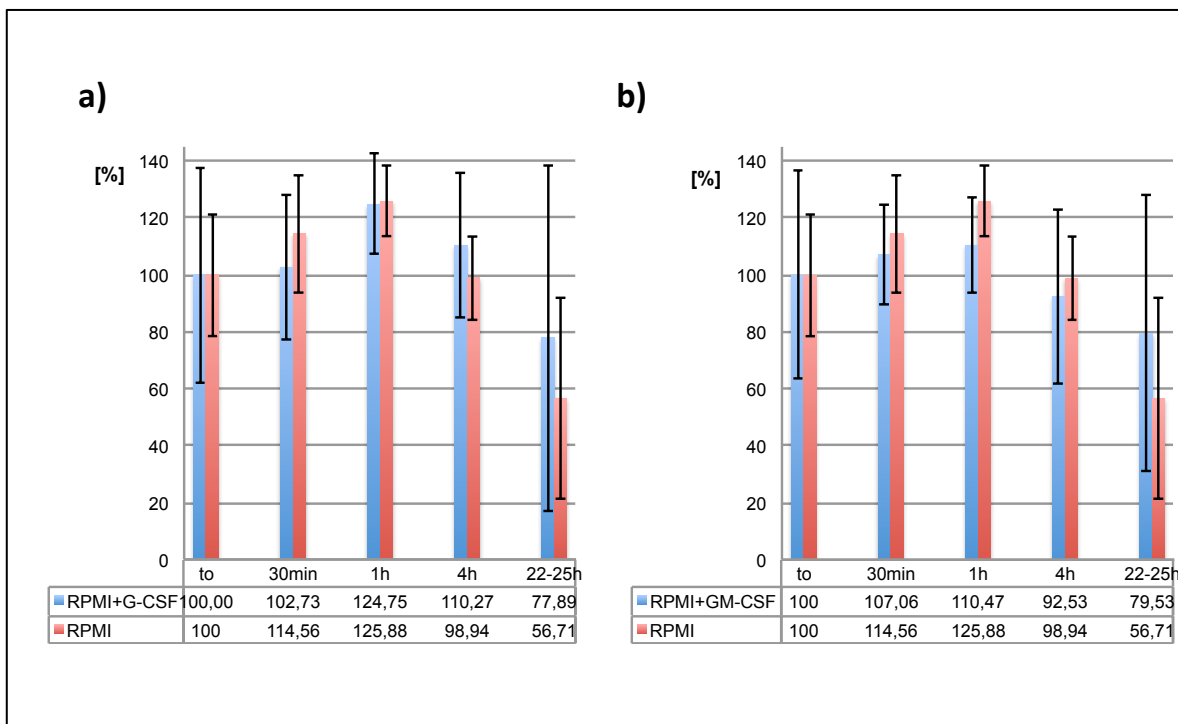


Abb. 31: Lagerungsabhängiger ATP-Gehalt isolierter und unstimulierter Granulozyten nach verschieden langen Inkubationszeiten bei Lagerung in RPMI-Medium und Inkubation mit G-CSF (a) und GM-CSF (b) bei 37 °C im Brutschrank.

Anmerkung: Die Werte sind angegeben als Anteile in Prozent (%) in Bezug zum Mittelwert des t_0 -Wertes. Der ATP-Gehalt wurde als $\text{pmol}/10^6$ Zellen berechnet. $T_0 = 100\%$ entspricht $295 \text{ pmol}/10^6$ Zellen (+/- SD von 63,38; n=5) bei reiner Inkubation in RPMI-Medium; entspricht $253,16 \text{ pmol}/10^6$ Zellen (+/- SD von 95,91; n=5) bei Inkubation in RPMI-Medium mit G-CSF und entspricht $269,92 \text{ pmol}/10^6$ Zellen (+/- SD von 98,01; n=5) bei Inkubation in RPMI-Medium mit GM-CSF. Die Inkubation erfolgte hierbei unter Zugabe von G- bzw. GM-CSF mit f.c. 1000 units/ml.

Um den Einfluss von Differenzierungsfaktoren auf die Stabilität des zeitabhängigen ATP-Gehaltes neutrophiler Granulozyten zu eruieren, erfolgte die Inkubation in G-CSF bzw. GM-CSF (f.c. 1000 units/ml Granulozytensuspension). Die Inkubation wurde jeweils wiederum nach 30 min, 1h, 4h und nach 22-25h beendet und der ATP-Gehalt bestimmt.

In Abbildung 31a und 31b ist zu entnehmen, dass der ATP-Gehalt der Granulozyten während der Inkubation vorübergehend zunimmt, um dann nach circa 22-25h deutlich abzunehmen. So ist zu erkennen, dass sowohl G-CSF wie auch GM-CSF erst nach 22-25-stündiger Inkubation einen Einfluss auf den ATP-Gehalt ausüben. Nach 22-25-stündiger Inkubationszeit lässt sich somit feststellen, dass Granulozyten, die mit G-CSF bzw. GM-CSF inkubiert wurden, einen tendenziell höheren ATP-Gehalt aufweisen, verglichen mit Granulozyten nach Inkubation in RPMI-Medium (siehe Abb. 32). Dieser Effekt zeigte sich jedoch statistisch nicht signifikant, was vermutlich durch die geringe Anzahl an Versuchen bedingt ist.

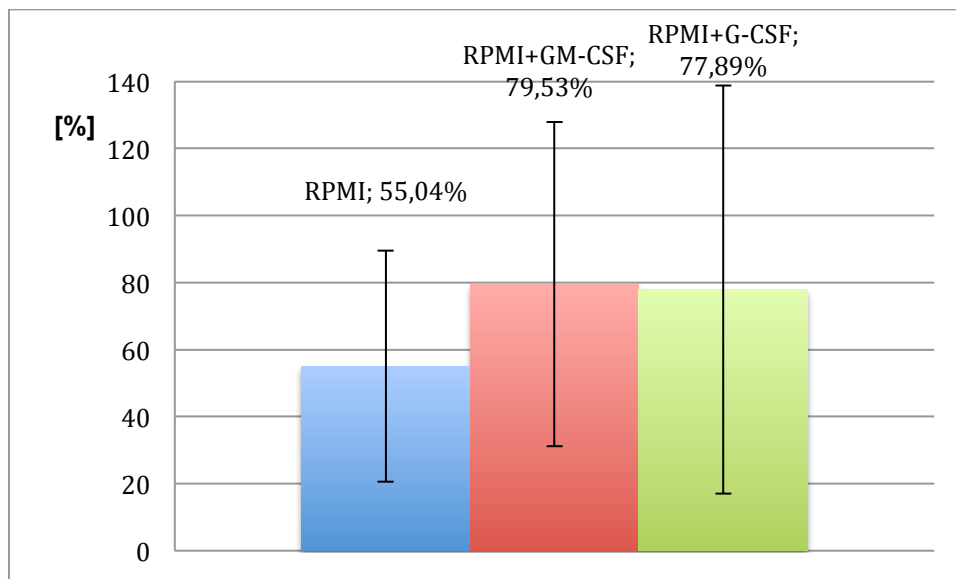


Abb. 32: Lagerungsabhängiger ATP-Gehalt unstimulierter Granulozyten nach 22-25 stündiger Inkubation in RPMI-Medium und Coinkubation mit G- bzw. GM-CSF im Brutschrank bei 37 °C.

Anmerkung: Die Werte sind angegeben als Anteile in Prozent (%) in Bezug zum Mittelwert des t_0 -Wertes. Der ATP-Gehalt wurde als $\text{pmol}/10^6$ Zellen berechnet. $T_0 = 100\%$ entspricht $295 \text{ pmol}/10^6$ Zellen (\pm SD von 63,38; $n=5$) bei reiner Inkubation in RPMI-Medium, entspricht $253,16 \text{ pmol}/10^6$ Zellen (\pm SD von 95,91; $n=5$) bei Inkubation in RPMI-Medium mit G-CSF und entspricht $269,92 \text{ pmol}/10^6$ Zellen (\pm SD von 98,01; $n=5$) bei Inkubation in RPMI-Medium mit GM-CSF. Die Inkubation erfolgte hierbei unter Zugabe von G- bzw. GM-CSF mit f.c. 1000 units/ml. Signifikanz-Test Abweichung Mittelwert: Gr.+ GM-CSF vs. Gr. (Kontrollgruppe), $p=0,408$; Gr.+ G-CSF vs. Gr. (Kontrollgruppe), $p=0,636$.

3.1.2.6.3 Der Einfluss von G- und GM-CSF auf den ATP-Gehalt isolierter Granulozyten während der Lagerung nach Phagozytose von opsonisiertem Zymosan

Für diese Versuchsreihe wurden die Granulozyten analog zu den Versuchen mit unstimulierten Granulozyten im Vorkapitel einerseits mit G-CSF bzw. GM-CSF (f.c. 1000 units/ml), als auch mit opson. Zymosan inkubiert (0,1 mg/ml Granulozytensuspension und 200.000 Zellen/75 μ l). Die Inkubation wurde jeweils wiederrum nach 30 min, 1h, 4h und nach 22-25h beendet und der ATP-Gehalt bestimmt. Ziel dieses Versuchblockes war es, zu untersuchen, welchen Einfluss G-CSF bzw. GM-CSF auf den ATP-Gehalt aktivierter Granulozyten nach verschiedenen langen Lagerungszeiten ausübt.

In Abbildung 33 ist sichtbar, dass weder G-CSF noch GM-CSF einen signifikanten Effekt auf die Stabilität der lagerungsabhängigen ATP-Konzentration haben.

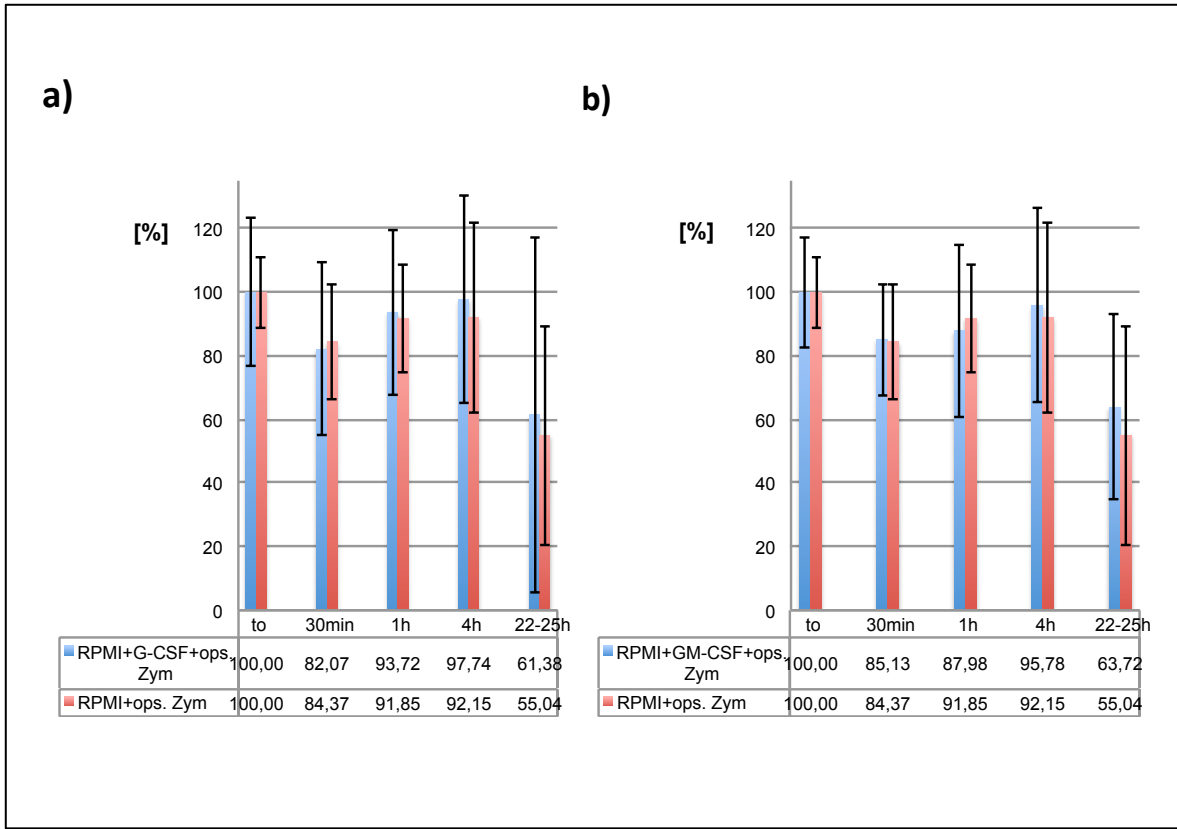


Abb. 33: Lagerungsabhängiger ATP-Gehalt isolierter Granulozyten nach Phagozytose von opson. Zymosan bei Inkubation in RPMI-Medium und Coinkubation mit G-CSF (a) und GM-GSF (b) bei 37°C.

Anmerkung: Die Werte sind angegeben als Anteile in Prozent (%) in Bezug zum Mittelwert des t_0 -wertes. Der ATP-Gehalt wurde als $\text{pmol}/10^6$ Zellen berechnet $T_0 = 100\%$ entspricht $312,6 \text{ pmol}/10^6$ Zellen (+/- SD von $35,13 \text{ pmol}/10^6$ Zellen; $n=4$ für t_0 -Wert und 22-25h-Wert; $n=5$ für restliche Werte) bei reiner Inkubation in RPMI-Medium; entspricht $263,14 \text{ pmol}/10^6$ Zellen (+/- SD von $61,49 \text{ pmol}/10^6$ Zellen; $n=4$ für t_0 -Wert und $n=5$ für alle anderen Zeitwerte) bei Inkubation in RPMI-Medium mit G-CSF und entspricht $287,51 \text{ pmol}/10^6$ Zellen (+/- SD von $50,03 \text{ pmol}/10^6$ Zellen; $n=4$ für t_0 -Wert; $n=5$ für alle anderen Werte) bei Inkubation in RPMI-Medium mit GM-CSF. Die Inkubation erfolgte unter Zugabe von G- bzw. GM-CSF [f.c. 1000 units/ml]. Die Granulozyten-Stimulation erfolgte zu Beginn der Inkubationszeit mit opson. Zymosan (=Zym; 0,1 mg/ml Granulozytensuspension und bei einer Zellzahl von 200.000/75 μl).

3.1.2.6.4 Einfluss einer Inkubation isolierter neutrophiler Granulozyten mit GM-CSF auf die Bildung von ROS

Hier sollte der Frage nachgegangen werden, ob GM-CSF nach verschiedenen langen Lagerungszeiten einen Einfluss auf den „oxidativen burst“ neutrophiler Granulozyten ausüben können. Analog zu den bereits durchgeführten Versuchen wurden Granulozyten wie üblich isoliert, auf eine Zellzahl von 200.000 Zellen pro 75 µl PBS⁺⁺ eingestellt und anschließend – um den Einfluss der Lagerung zu berücksichtigen – im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Ein Teil der isolierten Granulozyten wurde in glukosehaltiger PBS⁺⁺ (5mmol/l), ein anderer Teil in nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ inkubiert. Zudem erfolgte die Zugabe von 1000 U GM-CSF pro ml Granulozytensuspension (200.000 Zellen/75 µl). Einem Ansatz der in nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ gelagerten Granulozyten wurde kurz vor der Stimulation des „oxidativen burst“ mit opson. Zymosan (f.c. 250 µg/ml) 10 µl 5 mmolare Glukose zum Reaktionsansatz (PBS⁺⁺) hinzugegeben. Anschließend wurde die Chemilumineszenz gemessen.

Abbildung 34 zeigt, dass die ROS-Bildung nach bis zu ca. 4-stündiger Lagerung tendenziell noch zunehmen kann, im weiteren Verlauf nimmt deren Produktion jedoch deutlich ab. In Abb. 35 wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau gewählt. Hierbei zeigten die Granulozyten, denen Glukose erst kurz vor Stimulation mit opson. Zymosan zugegeben wurde, in den ersten Stunden der Lagerung (t_0 -Wert, 2h, 4h) ebenso eine tendenziell höhere ROS-Bildung. Auch hier zeigt sich im weiteren Lagerungsverlauf ein deutlicher Aktivitätsverlust in der ROS-Produktion.

Wie in den Abb. 34 und 35 zu sehen, weisen Granulozyten, die mit GM-CSF inkubiert wurden, eine tendenziell höhere ROS-Bildung auf. Jedoch zeigte sich in einzelnen Stichproben keine eindeutige Signifikanz, was an der geringen Gesamtversuchszahl liegen könnte (siehe Abb. 34).

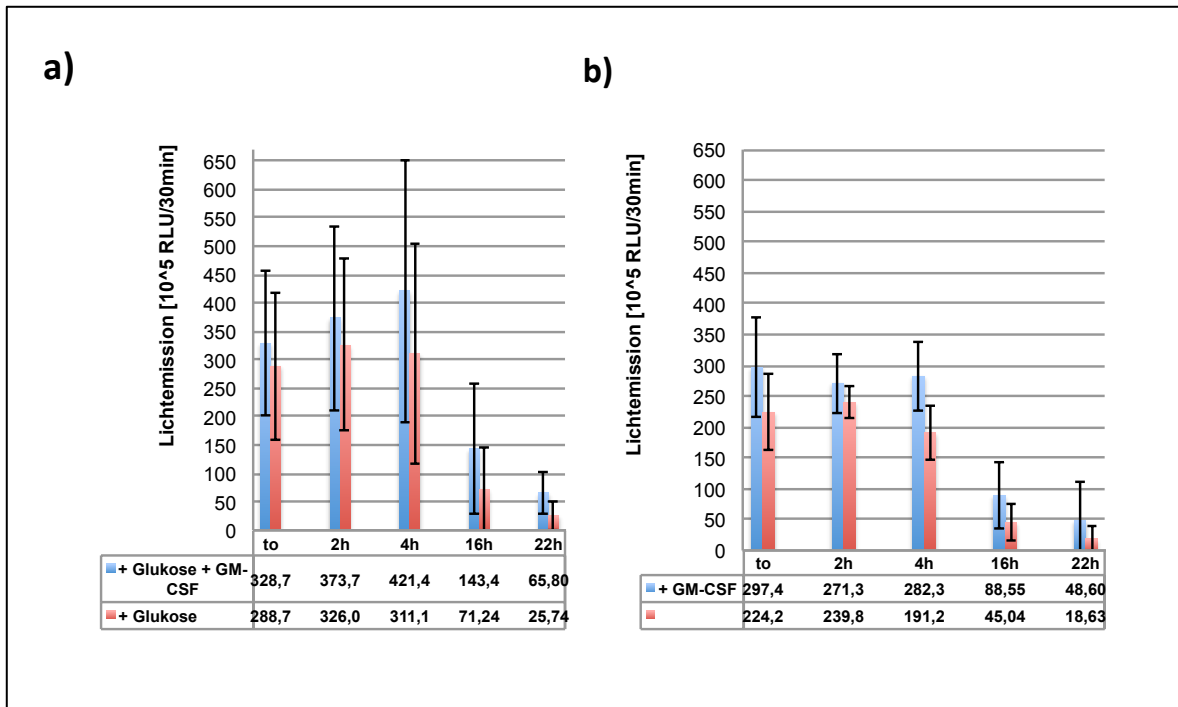


Abb. 34: Einfluss von GM-CSF auf die Bildung von ROS isolierter Granulozyten nach verschiedenen langen Vorinkubationszeiten und Stimulation der Granulozyten mit opson. Zymosan bei

a) einer glukosehaltigen Vorinkubation in PBS⁺⁺,

b) einer nichtglukosehaltigen Vorinkubation isolierter Granulozyten in PBS⁺⁺

Anmerkung: Es erfolgte eine Vorinkubation neutrophiler Granulozyten in (a) glukosehaltiger (5 mmolar) und (b) nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ (200.000 Zellen/75 µl) in Abwesenheit und Anwesenheit von GM-CSF (1000 U/ml Granulozytensuspension) in einem Wasserbad bei 37°C. Für die luminolabhängige Chemilumineszenz wurden 100.000 neutrophile Granulozyten in 100 µl in PBS⁺⁺ in einer nichttransluminenten 96-Well-Platte für 30 min untersucht. 25 µl Luminol (f.c. 4 µg/ml pro Well) wurden zugegeben. Die Granulozyten wurden mit 25 µl opson. Zymosan (f.c. 250 µg/ml) stimuliert. Die Chemilumineszenz-Messung erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C im Luminometer. Als Einheit diente Relative Lights Units (RLU).

Signifikanz-Test mittels Abweichung der Mittelwerte zum Zeitpunkt t= 22h: Gruppe Gr. + Glukose + GM-CSF vs. Gr. + Glukose (Kontrollgruppe), p=0,216; Gruppe Gr. + GM-CSF vs. Gr. (Kontrollgruppe), p=0,708. Insgesamt wurden 3 Versuche durchgeführt.

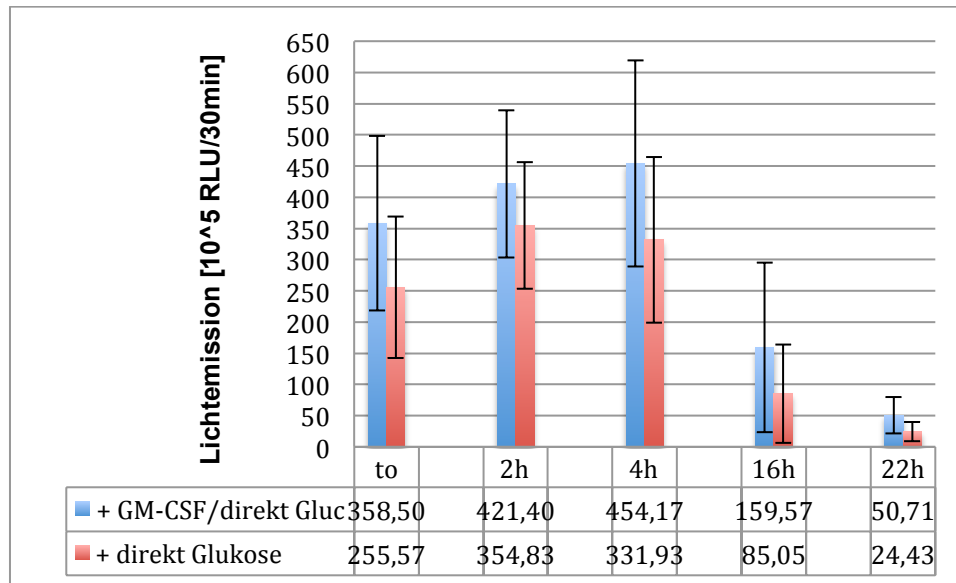


Abb. 35: Einfluss von GM-CSF auf die Bildung von ROS bei einer nichtglukosehaltigen Vorinkubation isolierter Granulozyten in PBS⁺⁺ nach verschieden langen Vorinkubationszeiten und Glukosezugabe direkt vor der Stimulation mit opson. Zymosan.

Anmerkung: Es erfolgte eine Vorinkubation isolierter Granulozyten in nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ (200.000 Zellen/75 µl) in Abwesenheit und Anwesenheit von GM-CSF (1000 U/ml Granulozytensuspension) in einem Wasserbad bei 37°C. Für die luminolabhängige Chemilumineszenz wurden 100.000 neutrophile Granulozyten in 100 µl in PBS⁺⁺ in einer nichttransluminenten 96-Well-Platte für 30 min untersucht. 25 µl Luminol (f.c. 4 µg/ml pro Well) wurden zugegeben. Kurz vor Beginn der Stimulation mit opson. Zymosan wurden einem Teil der Ansätze 10 µl (5 mmol/l) Glukose zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Die Granulozyten wurden mit 25 µl opson. Zymosan (f.c. 250 µg/ml) stimuliert. Die Chemilumineszenz-Messung erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C im Luminometer. Als Einheit diente Relative Lights Units (RLU). Insgesamt wurden 3 Versuche durchgeführt.

3.1.2.6.5 Einfluss von GM-CSF auf den Degranulationszustand neutrophiler Granulozyten (Verlauf der Degranulation)

Dieser Versuchsblock erfolgte in Analogie zu dem in Kapitel 3.1.2.1 beschriebenen Versuch. Durchgeführt wurde er ebenfalls wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben.

Untersucht wurde einerseits der Einfluss der Lagerung bei verschiedenen langen Inkubationszeiten, als auch der Einfluss einer Lagerung in verschiedenen Inkubationsmedien wie PBS⁺⁺ (+/- Glukose (5 mmol/l)). Das Hauptaugenmerk lag in der Bestimmung des Einflusses einer Inkubation mit GM-CSF (1000 U/ml Granulozytensuspension bei einer Zellzahl von 200.000/ 75 µl) auf den Verlauf der Degranulation, und ob dadurch eine Stabilisierung herbeigeführt werden kann (siehe auch Kapitel 3.1.2.1).

Wie in Abb. 16 und 21 zu sehen, zeigt sich nach erfolgtem Isolierungsverfahren bei Granulozyten eine massive Degranulation. Währenddessen zeigt Abb. 36, dass nach erfolgter Isolierung der Granulozyten es nach 14-stündiger Lagerungszeit zu keiner übermäßigen Veränderung des Degranulationszustandes kommt. So zeigt sich – wenn überhaupt – erst spät im Verlauf nach 22-stündiger Lagerungszeit nochmals ein deutlicher Verlust an MPO im Perox-X-Bild (siehe Abb. 36a,b). Ferner zeigt sich bei Inkubation mit GM-CSF sowohl in nichtglukosehaltiger, als auch in glukosehaltiger Lagerung in PBS⁺⁺ (+/- 5 mmol Glukose) eine geringe Tendenz zur Stabilisierung der Zellen in Bezug auf die Degranulation nach dem Isolierungsverfahren.

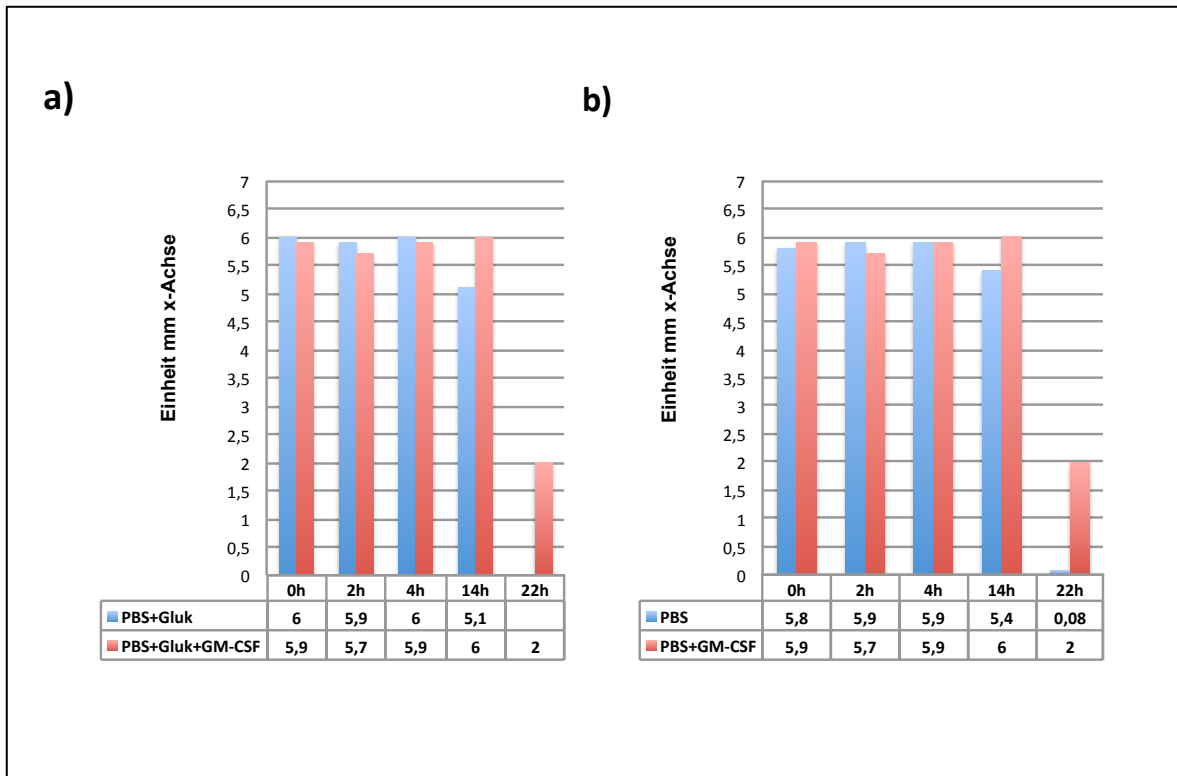


Abb. 36: Verlauf der Degranulation isolierter Granulozyten bei Lagerung in a) glukosehaltiger PBS⁺⁺ und in b) nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ bei verschiedenen langen Lagerungszeiten und in Ab- und Anwesenheit einer Coinkubation mit GM-CSF.

Anmerkung: Exemplarische Einzelversuche. Es erfolgte eine Inkubation neutrophiler Granulozyten in (a) glukosehaltiger (5 mmolar) und (b) nichtglukosehaltiger PBS⁺⁺ (200.000 Zellen/75 µl) in Abwesenheit und Anwesenheit von GM-CSF (1000 U/ml Granulozytensuspension) in einem Wasserbad bei 37°C und bei verschiedenen langen Lagerungszeiten. Die Zeitachse variierte von einem Nullwert (t₀-Wert) bis zu 22 Stunden. Ein 22-Stunden-Wert für den Inkubationsansatz PBS⁺⁺+ Glukose (5 mmolar) fehlt. Die Linksverschiebung (Degranulation) wurde im Perox-X-Histogramm im ADVIA 120 ausgemessen. Charakteristisch hierfür ist eine Verschiebung im Perox-X-Diagramm, bei dem auf der x-Achse der Gehalt an MPO angegeben ist. So kann in den zugehörigen Perox-X-Histogrammen eine Verschiebung graphisch erfasst werden, indem die Lage des Peaks auf der x-Achse ausgemessen wird.

3.1.2.7 Einfluss von G-CSF, GM-CSF und Biobran® auf die ROS-Bildung nach Phagozytose von opsonisiertem Zymosan

In diesem Versuchsblock sollte der Frage nachgegangen werden, ob der Immunmodulator Biobran® im Zusammenwirken mit G-CSF bzw. GM-CSF einen Einfluss auf den „oxidativen burst“ ausübt. Die Versuche wurden wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben durchgeführt (siehe unter Modifikationen).

Anschließend erfolgte die Messung der Chemilumineszenz. Für einen genaueren Einblick auf den Einfluss von Differenzierungsfaktoren auf die Bildung von ROS wird auf das Kapitel 3.1.2.6 verwiesen.

Wie in Abb. 37 zu sehen, produzieren die vorinkubierten Granulozyten, denen kurz vor Beginn der Stimulation mit opson. Zymosan Biobran® zum Reaktionsansatz hinzugegeben wurden (Ansatz e) - f)) weniger ROS als die Kontrollgruppe (Gr. + opson. Zymosan; Ansatz b)). Die mit G- bzw. GM-CSF 2 Stunden vorinkubierten Granulozyten zeigen ebenfalls eine höhere Bildung an ROS verglichen mit dem gleichem Reaktionsansatz, denen zusätzlich Biobran® zugegeben wurde. Die im Vorversuch aufgezeigte deutliche Mehrbildung an ROS bei Zugabe von Differenzierungsfaktoren verglichen ohne Zugabe von Differenzierungsfaktoren konnte in diesem exemplarischen Einzelversuch nicht aufgezeigt werden (siehe Vergleich Abb. 37 Reaktionsansatz b) - d) und siehe Kapitel 3.1.2.6.4).

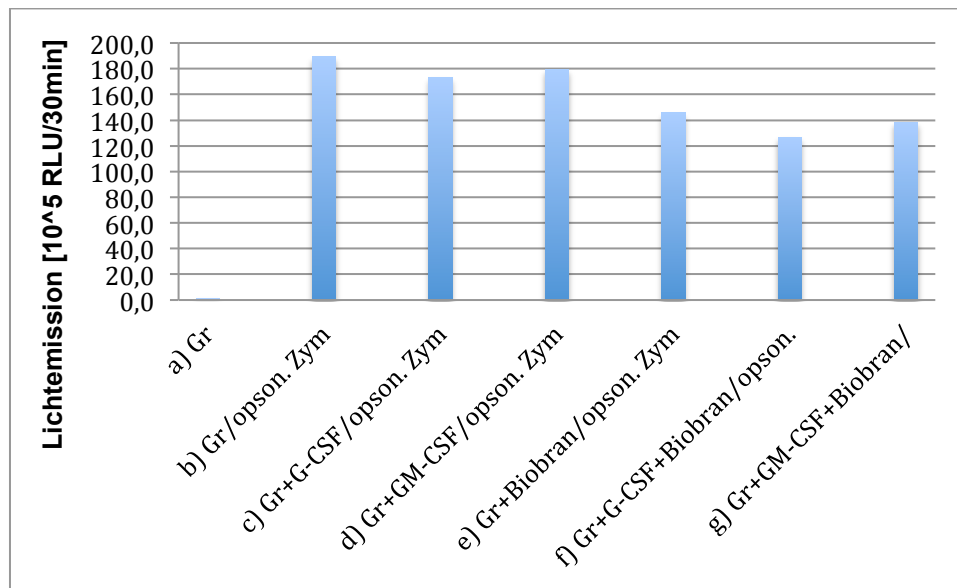


Abb. 37: Einfluss von Biobran® auf die ROS-Bildung bei Inkubation mit opson. Zymosan und Einfluss einer 2-stündigen Vorinkubation mit Differenzierungsfaktoren.

Anmerkung: Exemplarischer Einzelversuch. Es erfolgte eine 2-stündige Vorinkubation der Granulozyten in RPMI plus/minus G-CSF bzw. GM-CSF (1000 U/ml Granulozytensuspension).

Für die luminolabhängige Chemilumineszenz wurden 200.000 Granulozyten in 75 µl RPMI-Medium in einer nichttransluminenten 96-Well-Platte für 30 min untersucht. Den Ansätzen a)-g) wurden 25 µl Luminol (f.c. 4 µg/ml), sowie den Ansätzen e)-g) 10 µl Biobran® (f.c. 500 µg/ml) pro Well zugegeben. Die Granulozyten wurden – bis auf die Probe a) – anschließend mit 25 µl opson. Zymosan (f.c. 250 µg/ml) stimuliert. Die Chemilumineszenz-Messung erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C im Luminometer. Als Einheit diente Relative Lights Units (RLU). Auf ein Volumenausgleich wurde geachtet. Die unstimulierte Granulozytenprobe a) zeigt einen RLU-Wert von $1,5 \cdot 10^5$ an.

3.2 „Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity“ (ADCC) von Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen

Dieser Versuchsblock wurde in Zusammenarbeit mit Jens Neumann durchgeführt (medizinische Doktorarbeit in Präparation, Kinderklinik Tübingen 2014).

Granulozyten sind grundsätzlich in der Lage NB-Zellen in der ADCC-Reaktion abzutöten (Bruchelt et al, 1989). Versuche mit einem gegen das Gangliosid GD₂ gerichteten AK mit Komplementbindungsstelle (AK⁺) haben gezeigt, dass dazu

allerdings recht hohe E:T-Verhältnisse und ebenso eine Voraktivierung der Granulozyten mit G-CSF bzw. GM-CSF erforderlich sind (Bruchelt et al, 1989). Im klinischen Alltag führte der Einsatz von AK^+ zu massiven Nebenwirkungen (u.a. Schmerzen; Yu et al, 1998) bei den Patienten. Deshalb wurde ein Antikörper hergestellt, der diese Komplementbindungsstelle nicht besitzt (AK^-).

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde mit Hilfe des Europium-Assays untersucht, ob auch ein GD_2 -Antikörper ohne Komplementbindungsstelle (AK^-) diese Reaktionen auslösen kann (siehe Kapitel 3.2.1), und welchen Einfluss eine Voraktivierung mit Biobran® (siehe Kapitel 3.2.2) auf diese Reaktion hat. Ferner sollte untersucht werden, ob AK^- seine Wirkung ohne die Bildung von ROS ausübt, wie das für AK^+ bereits bekannt ist (siehe Kapitel 3.2.3).

3.2.1 ADCC in Abwesenheit und Gegenwart von GM-CSF und G-CSF

Ziel dieser Untersuchung war es den Einfluss von Differenzierungsfaktoren im Rahmen einer ADCC-Reaktion von Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen zu eruieren. So sollte untersucht werden, ob insbesondere ein GD_2 -Antikörper ohne Komplementbindungsstelle (AK^-) eine deutliche Zelllyse erreichen kann, und welchen Einfluss eine Voraktivierung mit G-CSF bzw. GM-CSF auf diese Reaktion hat.

So zeigt Abb. 38, dass eine Vorinkubation der Granulozyten mit G-CSF, als auch mit GM-CSF zu einer deutlichen Steigerung der Zelllyse im Rahmen der ADCC-Reaktion auf NB1-Zellen, sowohl bei Einsatz von Antikörper AK^+ als auch bei Einsatz von AK^- , führte. So stieg in beiden Fällen die spezifische Lyse der mit AK^+ bzw. AK^- beladenen NB1- Zellen um ca. 20% an (siehe Abb. 38).

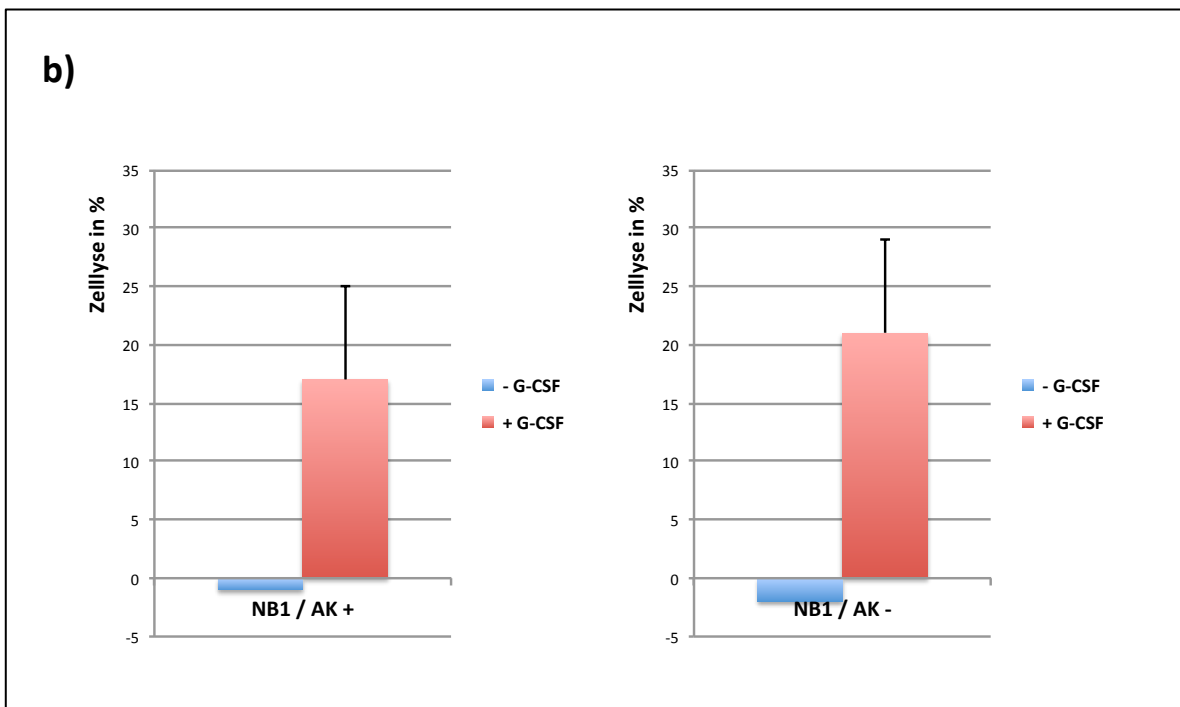
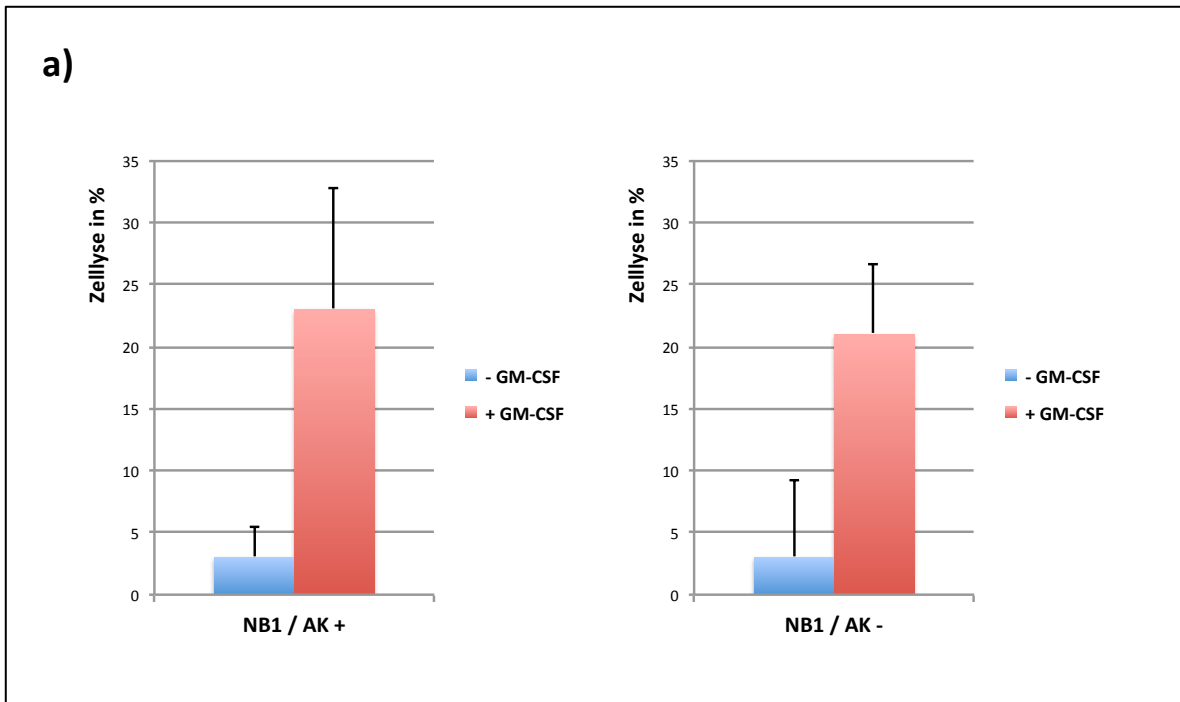


Abb. 38: Vergleich der Zellyse im Rahmen der ADCC-Reaktion von Granulozyten auf Neuroblastomzellen der Zelllinie NB1 nach Vorinkubation mit GM-CSF (a) bzw. G-CSF (b) und Zugabe von Antikörper AK⁺ und AK⁻.

Anmerkung: Die isolierten Granulozyten wurden auf eine Zellzahl von 200.000 Zellen/100 μ l eingestellt. Es erfolgte eine Vorinkubation der Granulozyten für 2 Stunden mit G- bzw. GM-CSF (1000 U/ml Zellsuspension) im Brutschrank bei 37°. Das E:T-Verhältnis lag bei E:T 40:1.

a) Vergleich der lytischen Wirkung von AK^+ und AK^- mit Granulozyten +/- GM-CSF auf NB1 (n=5).

b) Vergleich der lytischen Wirkung von AK^+ und AK^- mit Granulozyten +/- G-CSF auf NB1 (Versuche ohne G-CSF: n=1; mit G-CSF: n=3).

3.2.2 ADCC nach Vorbehandlung der Granulozyten mit Biobran®

In diesem Versuchsblock wurde untersucht, welchen Einfluss eine Voraktivierung isolierter Granulozyten mit Biobran® auf die Zelllyse bei Zugabe von 2 verschiedenen Antikörpern gegen das Gangliosid GD₂ der Neuroblastomzellen (ADCC-Reaktion), ausüben kann. Zu diesem Zweck erfolgte ein Europium-Assay mit durch Biobran® voraktivierten Granulozyten und mit AK^+ und AK^- beladenen GD₂-positiven Neuroblastomzelllinien (NB1 und NB2).

Abb. 39 zeigt, dass die Gegenwart von Biobran® sowohl bei der Zelllinie NB1 als auch bei NB2 Zellen zu einer deutlichen Steigerung der Granulozyten-ADCC, sowohl bei Verwendung von AK^+ als auch von AK^- führt.

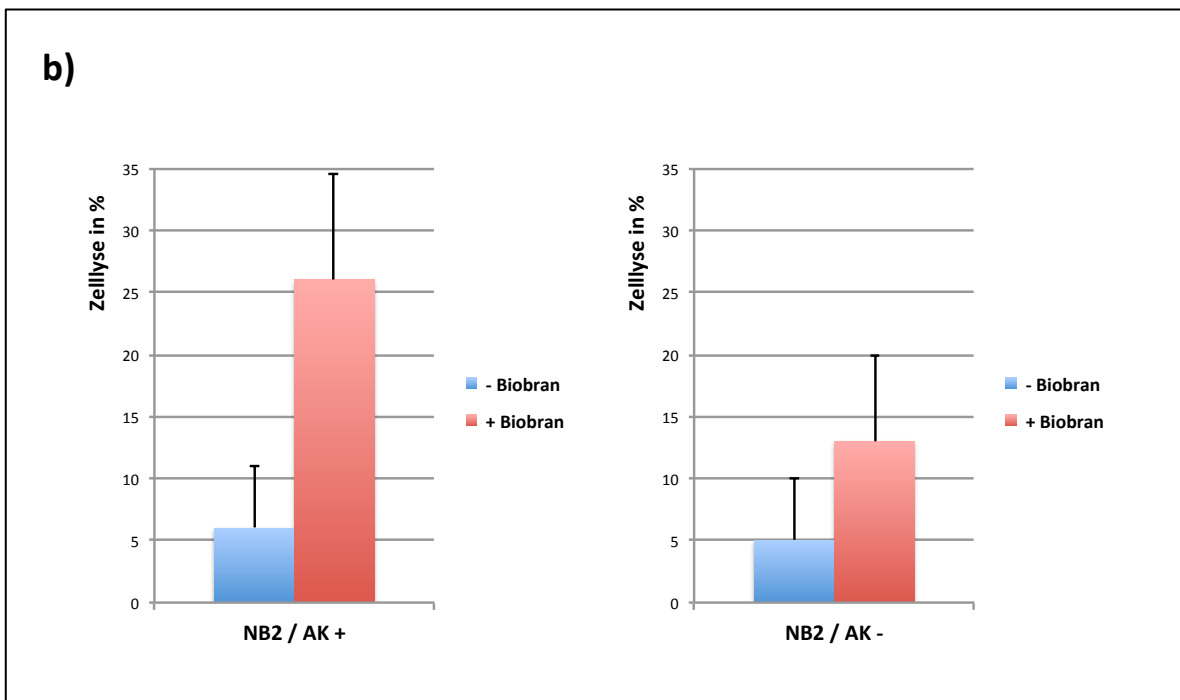
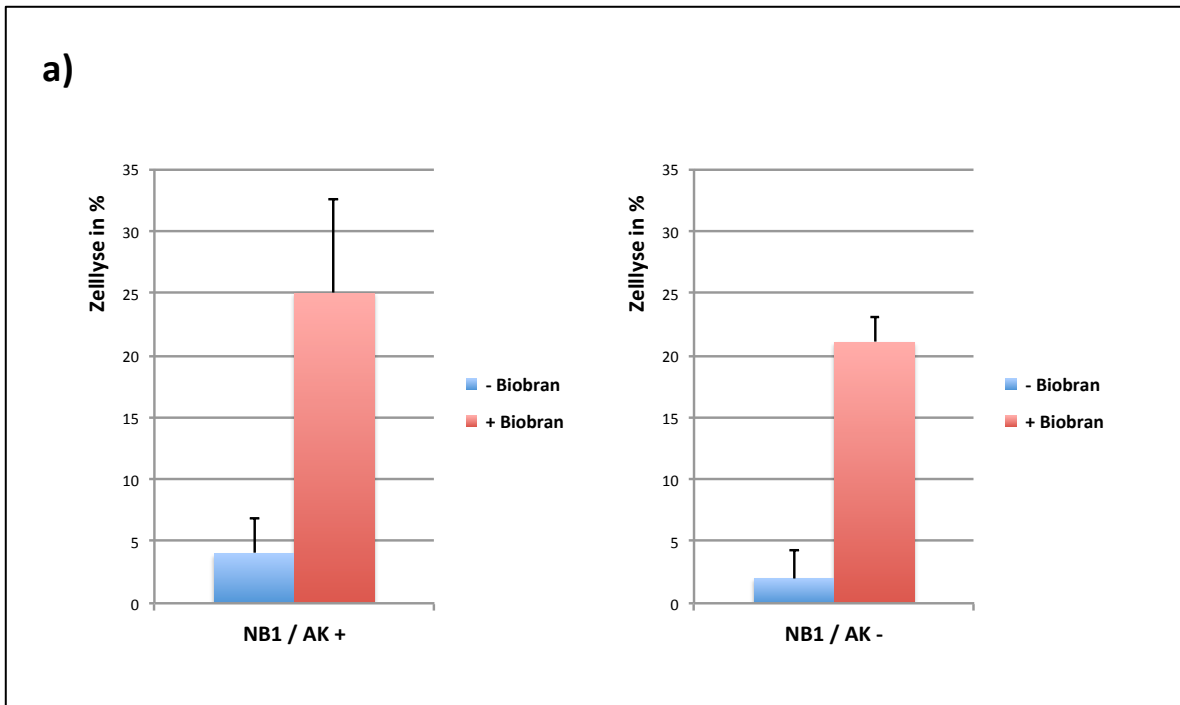


Abb. 39: Einfluss von Biobran® auf die Zellyse bei der Granulozyten-ADCC gegenüber Neuroblastomzellen bei Zugabe von Antikörper AK⁺ und AK⁻.

Anmerkung: Die isolierten Granulozyten wurden auf eine Zellzahl von 200.000 Zellen/100 μ l eingestellt. Es erfolgte eine Vorinkubation der Granulozyten für 2 Stunden mit Biobran[®] (f.c. 0,5 mg/ml) im Brutschrank bei 37°. Das E:T-Verhältnis lag bei 40:1.

a) Vergleich der lytischen Wirkung von AK⁺/AK⁻ und Granulozyten +/- Biobran[®] auf NB1 (n = 2).

b) Vergleich der lytischen Wirkung von AK⁺/AK⁻ und Granulozyten +/- Biobran[®] auf NB2 (n = 2).

Die Werte der Ansätze ohne Biobran[®] und ohne AK (nur NB + GR) wurde „0“ gesetzt und als Bezug genommen.

3.2.3 Rolle der ROS bei der ADCC-Reaktion

Aus vorherigen Untersuchungen war bekannt, dass ROS offensichtlich – im Gegensatz zu ihrer essentiellen Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen – keine Rolle auf die Aktivität der neutrophilen Granulozyten bei der immunologischen Tumorlyse (ADCC) bei Verwendung des Antikörpers AK⁺ gegenüber Neuroblastomzellen haben (Bruchelt et al, 1989).

Ziel des nachfolgenden Versuchsblocks war es zu untersuchen, ob auch der Antikörper AK⁻ seine Wirkung in der ADCC-Reaktion ohne die Bildung von ROS ausübt. Zu diesem Zweck wurden Chemilumineszenz-Untersuchungen mit diesem Antikörper (AK⁻) im Vergleich zu AK⁺ an zwei GD₂-positiven Neuroblastomzelllinien (NB1 und NB2) durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.8.2).

3.2.3.1 Rolle von ROS bei der ADCC-Reaktion in Abwesenheit und Gegenwart von G-CSF und GM-CSF

Es zeigte sich, dass auch der Antikörper AK⁻ ohne Komplementbindungsstelle in der ADCC-Reaktion, ebenso wie der Antikörper AK⁺, keine ROS bildet (siehe Abb. 40a-d). In Gegenwart von G-CSF bzw. GM-CSF kam es zwar zu einer leichten Steigerung der Chemilumineszenzsignale, die jedoch äußerst schwach im Gegensatz zur positiven Kontrolle (Granulozyten + opson. Zymosan; siehe Abb. 40a-d) ausfiel.

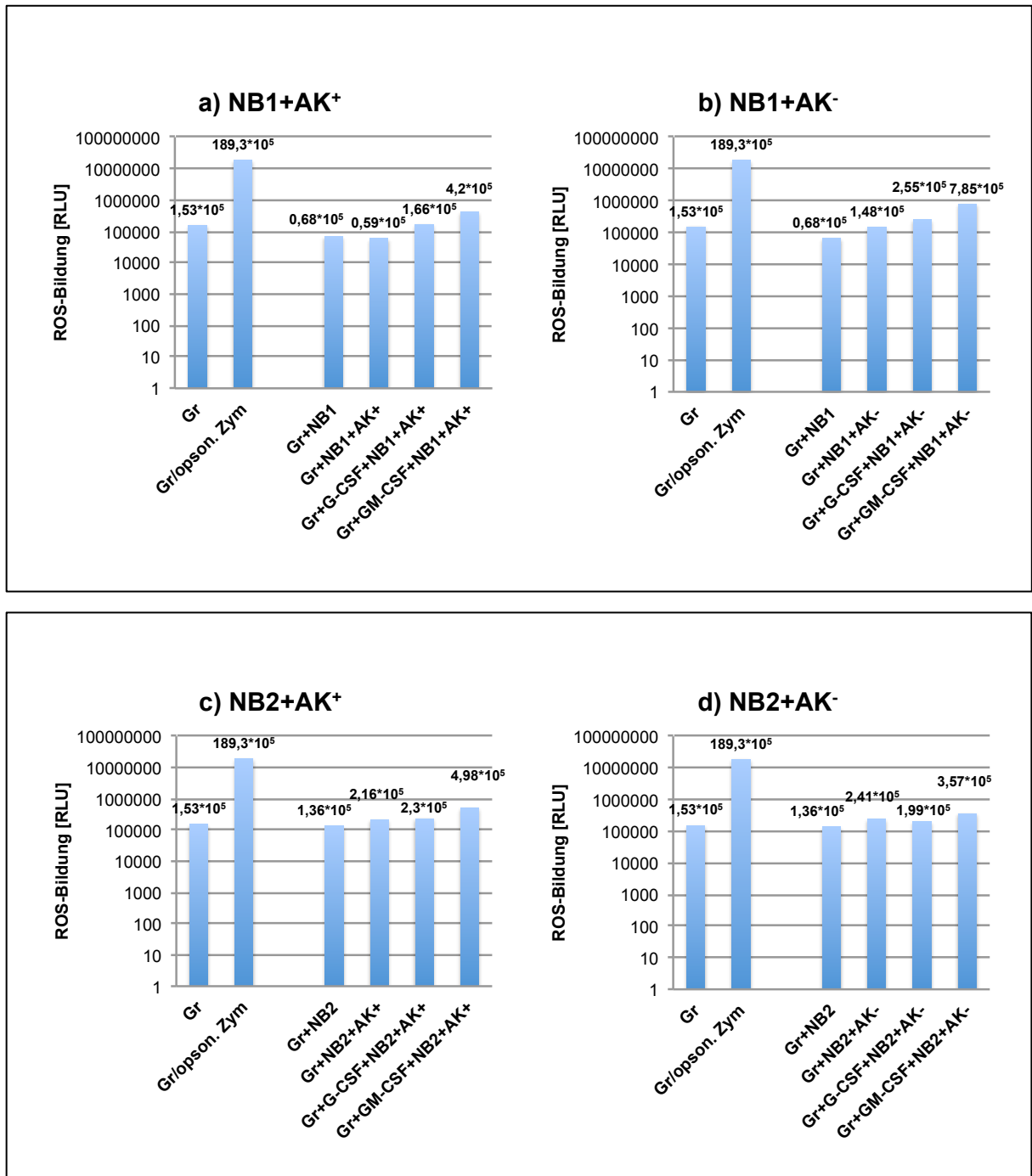


Abb. 40: Prüfung auf Bildung von ROS im Rahmen der ADCC-Reaktion neutrophiler Granulozyten auf Neuroblastomzellen der Zelllinie NB1 und NB2 bei Inkubation mit AK⁺ und AK⁻.

Anmerkung: Exemplarischer Einzelversuch (von n=3). Für die luminolabhängige Chemilumineszenz wurden 200.000 Granulozyten als Effektorzellen in 75 µl RPMI-Medium in einer nichttransluminenten 96-Well-Platte für 30 min untersucht. Dem Ansatz wurden 5000 Neuroblastomzellen der Zelllinien NB1 und NB2 (E:T-Verhältnis 40:1) in 100 µl RPMI-Medium, plus/minus 10 µl Antikörper AK⁺ bzw. AK⁻ zugegeben. Zudem wurden die Granulozyten teils mit G-CSF bzw. GM-CSF (1000 U/ml Granulozytensuspension) 2 Stunden vorinkubiert. Ferner Zugabe von 25 µl Luminol (f.c. 4 µg/ml pro Well). Die Chemilumineszenz-Messung erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C im Luminometer. Als Einheit diente Relative Lights Units (RLU). Als Kontrolle dienten sowohl ein Reaktionsansatz von Granulozyten, als auch ein Reaktionsansatz mit Granulozyten und NB1 bzw. NB2, jedoch ohne Zugabe von Antikörpern. Die Granulozyten wurden anschließend mit 25 µl opson. Zymosan (f.c. 250 µg/ml) stimuliert, um zu zeigen, dass die Granulozyten grundsätzlich in der Lage sind ROS zu erzeugen. Dies wird in dieser Graphik zur besseren Übersicht nur für den Granulozyten-Ansatz gezeigt (Gr/opson. Zym).

3.2.3.2 Rolle von ROS bei der ADCC-Reaktion in Gegenwart und Abwesenheit von Biobran®

Im Vorkapitel (Abb. 40) zeigte sich, dass es im Rahmen der ADCC-Reaktion sowohl bei Verwendung des Antikörpers AK⁺, als auch bei Verwendung von AK⁻ eine ROS-Bildung ausbleibt. Selbst in Gegenwart von G-CSF bzw. GM-CSF kam es zu keiner Steigerung der ROS-Bildung. In diesem Versuchsblock sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Zugabe von Biobran® (f.c. 500 µg/ml) zum Reaktionsansatz auf die ROS-Bildung im Rahmen der ADCC-Reaktion ausübt.

In Gegenwart von Biobran® kam es hierbei weder zu einer Steigerung noch zu einer Reduktion der ROS-Bildung im Rahmen der ADCC-Reaktion (siehe Abb. 41a-b).

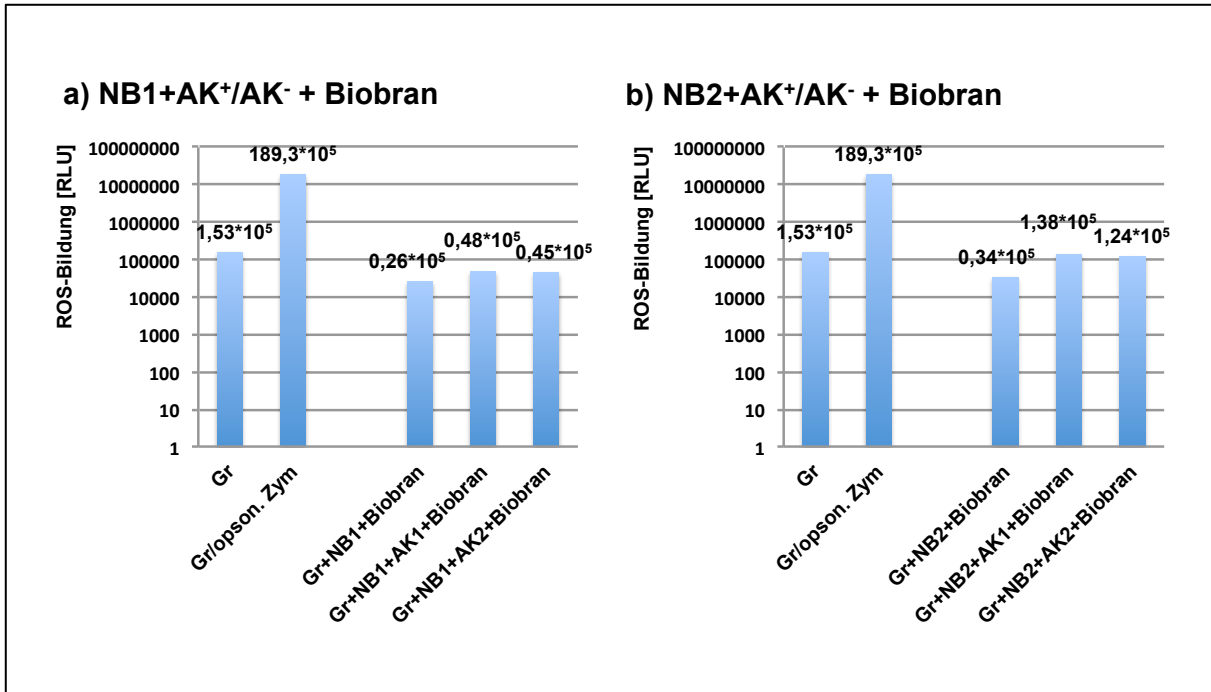


Abb. 41: Prüfung auf Bildung von ROS bei Zugabe von Biobran® im Rahmen der ADCC-Reaktion neutrophiler Granulozyten auf Neuroblastomzellen der Zelllinie NB1 und NB2 bei Inkubation mit AK⁺ und AK⁻.

Anmerkung: Exemplarischer Einzelversuch. Für die luminolabhängige Chemilumineszenz wurden 200.000 Granulozyten als Effektorzellen in 75 µl RPMI-Medium (2h Vorinkubation in RPMI-Medium) in einer nichttransluminenten 96-Well-Platte für 30 min untersucht. Dem Ansatz wurden 5000 Neuroblastomzellen der Zelllinie NB1 (a)/NB2 (b) (E:T-Verhältnis 40:1) in 100 µl RPMI-Medium, plus/minus 10 µl Antikörper AK⁺/AK⁻ zugegeben. Ferner Zugabe von 10 µl Biobran® (f.c. 500 µg/ml), 25 µl Luminol (f.c. 4 µg/ml pro Well).

Die Chemilumineszenz-Messung erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C im Luminometer. Als Einheit diente Relative Lights Units (RLU). Als Kontrolle dienten sowohl ein Reaktionsansatz von Granulozyten, als auch ein Reaktionsansatz mit Granulozyten, Biobran® und NB1/NB2, jedoch ohne Zugabe von Antikörpern. Die Granulozyten wurden anschließend mit 25 µl opson. Zymosan (f.c. 250 µg/ml) stimuliert, um zu zeigen, dass die Granulozyten grundsätzlich in der Lage sind ROS zu erzeugen. Dies wird in dieser Graphik zur besseren Übersicht nur für den Granulozyten-Ansatz gezeigt (Gr/opson. Zym).

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Teile gegliedert: Im ersten Teil wurde versucht, das gegenwärtige Wissen über neutrophile Granulozyten, das gerade in den letzten Jahren einige fast revolutionäre neue Erkenntnisse hervorbrachte, zusammenzufassen, um ein besseres Verständnis für ihre Funktionen und ihre Rolle im Körper bei der Immunabwehr zu entwickeln. Da dieser Aspekt bereits in der Einleitung intensiv bearbeitet wurde, wird hier auf eine nochmalige Behandlung verzichtet.

Im zweiten Teil wurden einige zentrale Aspekte des Stoffwechsels der neutrophilen Granulozyten experimentell untersucht. Dabei ging es vor allem darum, herauszufinden, welchen Einfluss die Isolierung dieser Zellen aus dem Vollblut hat, und welchen Einfluss die Lagerung der isolierten Zellen bis zur Durchführung der experimentellen Untersuchungen auf dieselben hat. Es ist bekannt, dass neutrophile Granulozyten im Vergleich zu den anderen Leukozyten des Blutes eine nur geringe Lebensdauer haben: Nach der Freisetzung aus dem Knochenmark zirkulieren die Granulozyten einige Stunden im Blut (Borregaard, 2010). Diese Zeitspanne wurde aber durch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit (Pillay et al, 2010) revidiert, die zu dem Ergebnis gelangte, dass die Granulozyten ca 5,4 Tage in der Blut-Zirkulation bleiben. Allerdings wurden anschließend auch Zweifel an diesen Werten geäußert (Tofts et al, 2011). Anschließend wandern sie in das Gewebe aus und verbleiben dort maximal einige wenige Tage, um ihre Funktion (Phagozytose und Abtötung von Mikroorganismen) zu erfüllen. Der gelappte Zellkern und die Präsenz vieler Granula mit ihren potentiell aggressiven Inhaltsstoffen lässt ihre Fragilität bereits intuitiv erahnen.

Probleme bei der Isolierung der Granulozyten

Um experimentelle Untersuchungen mit den Granulozyten durchzuführen, müssen diese zuvor aus dem Blut isoliert werden. Verschiedene Isolier-/Anreicherungsverfahren sind in der Literatur beschrieben und im Einsatz, die mehr oder weniger stressvoll für die Zellen sind. Aufgrund langjähriger Erfahrungen in unserem Labor hat sich die Isolierung durch eine 2-stufige Dichtegradientenzentrifugation mit Histopaque[®] 1119 und 1077 (Sigma) am besten bewährt: Bei dieser Methode wird in aller Regel eine Granulozytenanreicherung (neutrophile + eosinophile) von ca. 95-98% erreicht (mikroskopischer Nachweis). Die nach der Isolierung und zweimaligen Waschen in Puffer erhaltenen Granulozyten sind zwar in aller Regel noch mit Erythrozyten verunreinigt, die aber bei den meisten Untersuchungen nicht stören (Ausgangslage im Vollblut: ca. 5×10^6 Granulozyten/ml und 5000×10^6 Erythrozyten/ml, Verhältnis 1:1000; Verhältnis nach der Isolierung: 1:2-1:5). Man könnte nun die Erythrozyten lysieren. Darauf wurde aber bewusst verzichtet, da einerseits das Lysemedium partiell auch die Granulozyten schädigt, und andererseits zwei zusätzlich nötige Waschschriffe (Zentrifugationen) erforderlich wären, die die Fragilität der Neutrophilen weiter erhöhen würde. Welchen Einfluss die Entfernung der Granulozyten aus dem Vollblutmilieu und der mechanische Stress durch die Zentrifugation hat, kann sehr anschaulich an der graphischen Darstellung des Blutbildes am ADVIA-120 erläutert werden (siehe Abb. 16). Der ADVIA-120 ist ein Blutzellanalysator (Durchflusszytometrie), der im Labor der Kinderklinik Tübingen eingesetzt wird. Er differenziert die Leukozyten einerseits über die Messung der Kernform (Baso-Kanal; Zone mit polymorphem Kern: Neutrophile und Eosinophile; und mehr oder weniger rundem Kern: Lymphozyten und Monozyten) und andererseits über die Messung der Peroxidase-Aktivität (Perox-Kanal). Peroxidase-positive Zellen sind Neutrophile (MPO), Eosinophile (eosinophile Peroxidase) und Monozyten (MPO), während Lymphozyten und Basophile Peroxidase-negativ sind. Während im Vollblut die Neutrophilen-Wolke eine klare Abgrenzung von den Monozyten auf

Grund ihrer höheren MPO-Aktivität zeigt, verschiebt sich nach der Isolierung die Neutrophilenwolke nach links, teilweise in das Monozytenfeld hinein. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch den mechanischen Stress der Isolationsprozedur die fragilen Neutrophilen teilweise degranulieren und deshalb fälschlicherweise numerisch teilweise den Monozyten zugeordnet werden. Dass es sich aber eindeutig um Neutrophile handelt, erkennt man am Baso-Kanal, an dem nur die Kernform gemessen wird oder durch eine mikroskopische Analyse der Zellen. Obwohl dieses Messprinzip des ADVIA-120 für den Routinebetrieb (Vollblutmessungen) im Vergleich zu anderen Analyseautomaten, die nach anderen Kriterien eine Leukozytendifferenzierung vornehmen, von Nachteil ist (da ca. jede 4000. Person einen MPO-Mangel hat), ergibt sich dadurch für experimentelle Untersuchungen an isolierten Leukozyten eine gute Möglichkeit, Degranulationsprozesse zu studieren (Zipfel et al, 1997) und ggf. Aussagen über die Qualität der Präparation zu erhalten. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die isolierten Granulozyten einen Teil ihrer granulozytären Enzyme bereits verloren haben, wenn man sie für experimentelle Untersuchungen einsetzt. Wenn auch bei vielen vergleichenden Untersuchungen innerhalb einer Versuchsreihe mit den isolierten Zellen der ein und derselben Versuchsperson dieser Aspekt der gleiche ist, ergibt sich doch eine hohe Variabilität, wenn man Untersuchungen mit den Granulozyten verschiedener Personen vergleicht, was sich an teilweise großen Unterschieden der Messergebnisse bemerkbar macht (hohe Standardabweichungen). Darüber hinaus sollte dieser Aspekt auch berücksichtigt werden, wenn man isolierte Granulozyten zur Transfusionszwecken einsetzt (was allerdings nicht häufig vorkommt). Neben dem mechanischen Stress bei der Isolierung der Granulozyten sollte die Zeitspanne von der Gewinnung der Zellen bis zur Verabreichung an den Patienten möglichst kurz gehalten werden (siehe im Folgenden).

Probleme bei der Lagerung der isolierten Granulozyten

Physiologisch besteht die Aufgabe der neutrophilen Granulozyten in erster Linie darin, Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) im Rahmen der „unspezifischen“ Immunabwehr abzutöten. Dazu müssen sie, angezogen durch chemotaktische Faktoren, die Blutbahn verlassen, im Gewebe zum Herd der Infektion wandern, dort die Mikroorganismen (zumindest teilweise) phagozytieren und sie abtöten. Diese Prozesse sind stark Energie (ATP-) abhängig. Der Ort der Phagozytose befindet sich in aller Regel in Gewebereichen, die im Vergleich zum maximalen Sauerstoff- und Glukoseangebot der Blutbahn, weitaus schlechter mit Sauerstoff bzw. Glukose versorgt sind. Sauerstoff ist für den Granulozyten essentiell für die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (primär Superoxidanion \rightarrow $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ HOCl) zur Abtötung der Mikroorganismen. Andererseits ist er im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung für eine effektive Bildung von ATP aus Glukose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2 \rightarrow 6 \text{CO}_2 + 6 \text{H}_2\text{O} + \text{ca. } 32 \text{ ATP}$) nötig. Der Granulozyt löst diesen Konflikt, in dem der nur limitiert zur Verfügung stehende Sauerstoff ausschließlich zur Bildung von Superoxidanion verwendet wird ($\text{O}_2 + \text{NADPH} \rightarrow \text{O}_2^- + \text{NADP}^+$), wobei das NADPH in der Glukose-6-Phosphat-Reaktion gebildet wird. Obwohl der Granulozyt über Mitochondrien verfügt und deshalb die ATP Gewinnung über die oxidative Phosphorylierung durchführen könnte, wählt er den weit weniger effektiven Weg der anaeroben Glykolyse ($\text{Glukose} \rightarrow 2 \text{ Laktat} \sim 2 \text{ ATP}$). Hierbei benötigt der Granulozyt zur Herstellung einer gleichen Menge an ATP mehr Glukose als bei der oxidativen Phosphorylierung. Dieses Problem löst er dadurch, dass er zuvor große Mengen der Glukose-Speicherform Glykogen synthetisierte, um unabhängig vom Glukoseangebot in seiner Umgebung zu sein. Wahrscheinlich synthetisiert der Granulozyt das Glykogen während seiner mehrstündigen Zirkulation im Blut – wo Glukose reichlichst vorhanden ist – und wo er sonst „nichts zu tun hat“, bis das er ins Gewebe auswandert.

Auf Grund dieser physiologischen Zusammenhänge wurde in dieser Arbeit untersucht, wie sich der Energiestoffwechsel isolierter Granulozyten (Glykogengehalt, Glukoseverbrauch, Laktat- und ATP-Produktion) während der Lagerung verändert.

Es stellt sich also die Frage, wie lange dürfen bzw. können Granulozyten nach der Isolierung gelagert werden, um vergleichbare, standardisierte Messergebnisse zu erhalten. Diese Versuche wurden mehrfach mit den Granulozyten verschiedener Spender durchgeführt ($n > 3$). Trotzdem wurde in vielen Fällen darauf verzichtet, die Mittelwerte aller Versuche in den Graphiken zu zeigen, da der Ausgangszustand der Granulozyten verschiedener Spender häufig recht unterschiedlich war. Keine Probleme bereiten diesbezüglich natürlich die Beurteilung der Verlaufskontrollen individueller Ansätze. In der Regel wurden die isolierten Granulozyten bis zu 24 Stunden unter verschiedenen Bedingungen (Medium mit bzw. ohne Glukose; Inkubation in Abwesenheit und Gegenwart von G-CSF bzw. GM-CSF usw.) inkubiert und die zeitliche Veränderung nach verschiedenen Inkubationszeiten (zu Beginn, und z.B. nach 2, 4, 16 und 24 Stunden) registriert. Ziel dieser Untersuchungen war es, herauszufinden, wie lange die Granulozyten nach der Isolierung noch plausible Resultate zeigten. Untersucht wurde der Glykogengehalt, der Glukoseverbrauch und die Laktatbildung, sowie der ATP-Status und die Neigung zu weiterer Degranulation. Ohne hier auf einzelne Ansätze im Detail einzugehen, zeigte sich generell, dass praktisch bei allen untersuchten Parametern ein drastischer Abfall nach 24 stündiger Inkubation zu verzeichnen war. Im Gegensatz zu vielen anderen Zellen müssen die entsprechenden Untersuchungen bei Granulozyten also sehr bald nach der Isolierung aus dem Vollblut durchgeführt werden, um vernünftige Resultate zu erhalten.

Zu den Standardtestsystemen bei der Überprüfung der Funktionalität isolierter Granulozyten zählt die Messung des „oxidativen burst“ mit Hilfe der Luminol-

verstärkten Chemilumineszenz nach Aktivierung mit opson. Zymosan. Hier zeigte sich, dass innerhalb von 4 Stunden nach der Isolierung vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Aktivität der ROS-Bildung erhalten werden können.

Die Rolle reaktiver Sauerstoffverbindungen bei der Granulozyten-ADCC

Neutrophile Granulozyten spielen bei der Abwehr von Mikroorganismen eine wichtige Rolle, wobei die Bildung von ROS von ausschlaggebender Bedeutung ist: Wenn Granulozyten durch einen Defekt der NADPH-Oxidase (NOX-2) nicht in der Lage sind, Superoxid-Anion zu bilden (von dem sich alle weiteren ROS der Granulozyten ableiten), kommt es zum Krankheitsbild der septischen Granulomatose (engl.: chronic granulomatous disease) mit immer wiederkehrenden, lebensbedrohlichen Infektionen.

Neben der Infektabwehr könnten die Granulozyten auch eine Rolle bei der Abwehr von Tumorzellen spielen. Allerdings ist die Rolle von ins Tumorgewebe infiltrierenden Granulozyten nicht ganz klar. Die Tatsache, dass man Granulozyten im Tumorgewebe gefunden hat, sagt noch nicht aus, ob sie auch an der Abwehr (Zerstörung) der malignen Zellen beteiligt sind. Es könnten durch ins Tumorgewebe infiltrierende Granulozyten auch gerade umgekehrte Wirkungen erst erzeugt werden (Auslösung weiterer Mutationen durch die Bildung von ROS bzw. Schwächung anderer immunkompetenter Zellen).

In vitro konnte gezeigt werden, dass Granulozyten grundsätzlich in der Lage sind, Tumorzellen abzutöten, allerdings in weitaus schwächerem Maße als das z.B. durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) der Fall ist. In aller Regel ist dabei aber eine zusätzliche Aktivierung durch G-CSF bzw. GM-CSF und die Gegenwart von Antikörpern, die gegen Strukturmerkmale der Targetzelle gerichtet sind, erforderlich. Im Falle von Neuroblastomzellen konnte gezeigt werden, dass Antikörper, die gegen das Gangliosid GD₂ gerichtet sind, welches in hoher Konzentration in der Zellmembran der meisten Neuroblastomzellen vorhanden ist,

geeignet sind, Granulozyten-ADCC-Reaktionen auszulösen (Bruchelt et al, 1989). Diese Antikörper werden bereits seit vielen Jahren in mehreren Varianten erfolgreich in der Therapie des Neuroblastoms eingesetzt. Allerdings ist die Rolle der Granulozyten in vivo dabei unklar. In vitro zeigte sich, dass die zytotoxische Wirkung der Granulozyten überraschenderweise ohne die Bildung von ROS zustande kommt. So konnte im Rahmen der Granulozyten-ADCC trotz der toxischen Wirkung keine Bildung von ROS in der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz-Reaktion beobachtet werden. Ferner sind Granulozyten von Patienten mit septischer Granulomatose sogar besser in der Lage, Neuroblastomzellen abzutöten (Bruchelt et al, 1989). Neben der ADCC-Wirkung können diese Antikörper ihre Anti-Tumoreffekte auch über die Komplementlyse, zumindest in vitro, sehr effektiv gestalten. Allerdings sind gerade diese Effekte mit starken klinischen Nebenwirkungen verbunden (v.a. Schmerzen; Yu et al, 1998). Daher wurde eine Variation dieses Anti-GD₂ Antikörpers konstruiert, die diese Bindungsstelle nicht besitzen (MoAb Hu 14.18, = AK⁻). Diese Antikörper zeigten in vitro keine Komplementlyse gegenüber Neuroblastomzellen, waren aber genauso gut wie die entsprechenden Antikörper mit Komplementbindungsstelle in der Lage, Neuroblastomzellen in der Granulozyten-ADCC abzutöten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch diese veränderten Antikörper ihre Wirkung nicht über die Bildung von ROS entfalten.

In abschließenden Pilotversuchen wurde noch untersucht, ob Biobran®, ein Amyloglycan, das als „biological response modifier“ angesehen wird, die Granulozyten-ADCC positiv beeinflussen kann. Dies konnte in vergleichbarem Maße, wie bei der Vorbehandlung der Granulozyten mit G-CSF bzw. GM-CSF, bestätigt werden. Auch hierbei kam es zu keiner vermehrten Bildung von ROS.

Abschließend bleibt festzustellen, dass die Rolle der Granulozyten bei der Abtötung von malignen Zellen in vivo nicht eindeutig ist: Im Gegensatz zu anderen zytotoxischen Immunzellen bedarf es auch in vitro eines hohen Effektor-

(Granulozyten) zu Targetzell- (Neuroblastomzellen) Verhältnisses und einer zusätzlichen Aktivierung durch G-CSF und ähnlicher Wirkstoffe, um ADCC-Reaktionen auszulösen, wodurch es fraglich ist, ob sie in vivo signifikant an der Abtötung der malignen Zellen in Rahmen der ADCC-Reaktion beteiligt sind. Andererseits zeigte gerade eine relativ neue Studie im Maus-Modell, dass neurophile Granulozyten eine zentrale Rolle bei der ADCC von Melanom- und Mammakarzinomen spielen (Albanesi et al, 2013; Beers and Glennie, 2013).

5 Zusammenfassung

Die hier vorliegende medizinische Doktorarbeit über neutrophile Granulozyten ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil wird eine eingehende Charakterisierung der neutrophilen Granulozyten vorgenommen. Dabei wird – neben der Beschreibung der klassischen Funktionen der Granulozyten (Mechanismen der Chemotaxis, der Phagozytose und der Abtötungsmechanismen von Mikroorganismen) – auf verschiedene neue Aspekte eingegangen, die in den letzten Jahren das Bild dieser Zellen der unspezifischen Immunabwehr entscheidend erweitert haben (alternative Interpretationen der Rolle von ROS bei der Abtötung der Mikroorganismen; extrazelluläres killing durch NETs; Präsenz von T-Zell-Rezeptoren bei einer Subpopulation der Neutrophilen; Rolle der Neutrophilen als Supressorzellen).

Im zweiten, dem experimentellen Teil der Arbeit, wird insbesondere der Frage nachgegangen, welchen Einfluss die Isolierung und anschließende kurzzeitige Lagerung der Granulozyten auf ihre Eigenschaften und Funktionen aufweist. In Gegensatz zu anderen Blutzellen sind neutrophile Granulozyten recht labile, kurzlebige Zellen, eine Tatsache, die bei experimentellen Arbeiten, aber auch hinsichtlich der klinischen Anwendungen (Granulozyten-Transfusionen) zu berücksichtigen ist. Untersuchungen am Blutbildanalysator ADVIA120, der die Leukozyten u.a. über die lysosomale Myeloperoxidase (MPO) der neutrophilen Granulozyten charakterisiert, haben gezeigt, dass es bereits während ihrer Isolierung aus dem Vollblut zu einer massiven Degranulation kommt. Da Neutrophile ihren Energiestoffwechsel (ATP-Produktion aus Glukose) praktisch ausschließlich über die anaerobe Glykolyse durchführen, wurden der Glykogenstatus, der Glukoseumsatz, die Laktatproduktion sowie der ATP-Satus nach bis zu 24-stündiger Lagerung untersucht: Während innerhalb der ersten Stunden kaum Abweichungen im Vergleich zur direkten Bestimmung nach der Isolierung zu verzeichnen waren, sind nach 24 Stunden gravierende Abnahmen zu verzeichnen. Ähnlich stellt sich die Situation bei Funktionsprozessen (Messung des

„oxidativen bursts“ nach Aktivierung mit opsonisiertem Zymosan) dar. Die Lagerung in Gegenwart von G-CSF bzw. GM-CSF führte nur zu einer geringfügigen Stabilisierung der meisten untersuchten Parameter über die Lagerungsdauer. Insgesamt kann aus diesen Untersuchungen abgeleitet werden, dass a) die Entfernung der Granulozyten aus dem Vollblut trotz der relativ schonenden Isolierung (Histopaque®-Gradientenzentrifugation) bereits zu einer Beeinträchtigung der Stabilität (Degranulation) führt, und b) die isolierten Granulozyten in den ersten Stunden danach relativ stabil bleiben und erst bei längerer Inkubationszeit (> 4 - 24 Stunden) massive Funktionsverluste zeigen. Untersuchungen mit Granulozyten sollten somit so schnell wie möglich nach ihrer Isolierung durchgeführt werden.

In einem weiteren Versuchsblock wurde abschließend der Frage nachgegangen, ob und wie die nach obigen Schema gewonnenen Granulozyten in der Lage sind, in der ADCC-Reaktion (engl.: „antibody dependent cellular cytotoxicity“) Neuroblastomzellen abzutöten. Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass der bereits klinisch angewandte Antikörper „CHIMERIC Antibody CH 14.18“ (= AK⁺), der gegen das Gangliosid GD₂ gerichtet ist, in Gegenwart von G-CSF bzw. GM-CSF Neuroblastomzellen im Rahmen der Granulozyten-ADCC abtöten kann, wobei dieser Prozess ohne die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen abläuft. Versuche mit diesem gegen das Gangliosid GD₂ gerichteten AK mit Komplementbindungsstelle (AK⁺) haben jedoch gezeigt, dass dazu allerdings recht hohe E:T-Verhältnisse und ebenso eine Voraktivierung der Granulozyten mit G-CSF bzw. GM-CSF erforderlich sind (Bruchelt et al, 1989). Im klinischen Alltag führte der Einsatz von AK⁺ zu massiven Nebenwirkungen (u.a. Schmerzen; Yu et al, 1998) bei den Patienten. Deshalb wurde ein Antikörper hergestellt, der diese Komplementbindungsstelle nicht besitzt (MoAb Hu 14.18, = AK⁻).

In den durchgeführten Untersuchungen wurde mit Hilfe des Europium-Assays untersucht, ob nun auch AK⁻ diese ADCC-Reaktionen auslösen kann, und welchen

Einfluss eine Voraktivierung mit Biobran® auf diese Reaktion hat. Ferner wurde untersucht, ob AK^- seine Wirkung ohne die Bildung von ROS ausübt, wie das für AK^+ bereits bekannt ist. Hierbei zeigte sich, dass sowohl das Ausmaß der ADCC als auch der Wirkungsmechanismus (keine Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen) ähnlich wie bei Einsatz des Antikörpers AK^+ waren.

6 Literaturverzeichnis

Albanesi M, Mancardi DA, Jönsson F, Iannascoli B, Fiette L, Di Santo JP, Lowell CA and Bruhns P (2013) Neutrophils mediate antibody-induced antitumor effects in mice. *Blood* 122: 3160-3164.

Allen RC (1982) Chemiluminescence and the study of phagocyte redox metabolism. *Adv Exp Med Biol* 141: 411-421.

Ammon, HPT (1975) Methoden der enzymatischen Analyse, aus Bergmeyer HU, 3. neu bearb. und erw. Aufl., 2 Bde., Verlag Chemie GmbH Weinheim/Bergstr., 92–93.

Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology* 113: 548-555.

Anderson SI, Hotchin NA and Nash GB (2000) Role of the cytoskeleton in rapid activation of cd11b/cd18 function and its subsequent downregulation in neutrophils. *J Cell Sci* 113: 2737–2745.

Andina N, Conus S, Schneider EM, Fey MF and Simon HU (2009) Induction of Bim limits cytokine-mediated prolonged survival of neutrophils. *Cell Death Differ* 16: 1248-1255.

Assari T (2006) Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med Immunol* 5: 4.

Babior BM (1978) Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med* 298: 659-668.

Babior BM (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93: 1464-1476.

Babior BM, Lanbeth JD and Nauseef W (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397: 342-344.

Baniyash M (2004) TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol* 4: 675-687.

Beers SA and Glennie MJ (2013) Neutrophils: "neu players" in antibody therapy? *Blood* 122: 3093-3094.

Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A and Henriques-Normark B (2006) An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16: 401-407.

Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A and Reichenbach J (2009) Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 114: 2619-2622.

Björgvinsdóttir H, Zhen L and Dinauer MC (1996) Cloning of murine gp91phox cDNA and functional expression in a human X-linked chronic granulomatous disease cell line. *Blood* 87: 2005-2010.

Blomberg K, Hautala R, Lövgren J, Mukkala VM, Lindqvist C and Akerman K (1996) Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand *J Immunol Methods* 193: 199-206.

Borissoff JI and ten Cate H (2011) From neutrophil extracellular traps release to thrombosis: an overshooting host-defense mechanism? *J Thromb Haemost* 9: 1791-1794.

Borregaard N (2010) Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33: 657-670.

Brill A, Fuchs TA, Savchenko A, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, Bhandari AA and Wagner DD (2011) Neutrophil Extracellular Traps Promote Deep Vein Thrombosis in Mice. *J Thromb Haemost* 10: 136-144.

Brinkmann V and Zychlinsky A (2007) Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 5: 577-582.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y and Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.

Bruchelt G, Handgretinger R, Fierlbeck G, Kimmig A, Dopfer R, Reisfeld RA, Treuner J and Niethammer D (1989) Lysis of neuroblastoma cells by the ADCC-reaction: granulocytes of patients with chronic granulomatous disease are more effective than those of healthy donors. *Immunol Lett* 22: 217-220.

Bruchelt G and Schmidt KH (1984) Comparative studies on the oxidative process during phagocytosis measured by luminol-dependent chemiluminescence. *J Clin Chem Clin Biochem* 22: 1-13.

Bruchelt G, Handgretinger R, Weckenmann M and Hahn T (2014) Glucose metabolism and the antioxidative defense system in cancer cells: Options for the

application of ROS-based anticancer drugs. In: Tumor Metabolome Targeting and Drug Development: pp 109-130. Editor: Steven Kanner. Humana press, Springer New York.

Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, Feramisco J and Nizet V (2006) DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16:396-400.

Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthel G and Schulte-Hermann R (1990) Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 11: 847-853.

Carman CV and Springer TA (2004) A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 167: 377-388.

Carrigan SO, Pink DBS and Stadnyk AW (2007) Neutrophil transepithelial migration in response to the chemoattractant fMLP but not C5a is phospholipase D-dependent and related to the use of CD11b/CD18. *J Leukoc Biol* 82: 1575-1584.

Chen ML, Wang FH, Lee PK and Lin CM (2001) Interleukin-10-induced T cell unresponsiveness can be reversed by dendritic cell stimulation. *Immunol Lett* 75: 91-96.

Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, Ortiz M, Nacken W, Sorg C, Vogl T, Roth J and Gabrilovich DI (2008) Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med* 205: 2235-2249.

Cohen JJ (1993) Apoptosis. *Immunol Today* 14: 126–130.

Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, Bourdeau F, Kuberski P and Ferri L (2013) Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest* 123: 3446-3458.

Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N and Johnson RS (2003) HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112: 645-657.

Dancey JT (1976) Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest* 58: 705-715.

Degterev A, Boyce M and Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene* 22: 8543-8567.

Denk H and Zatloukal K: Zell- und Gewebsreaktionen. In: Böcker W, Denk H, Heitz PhU and Moch H: Pathologie. 4. Aufl., 64, Urban & Fischer, München, 2008.

Deubzer JE (2010) Der Einfluss von Ascorbat, 2-Deoxy-D-Glukose und Dichlorazetat auf das Wachstum und den Glukosestoffwechsel von Neuroblastomzellen mit und ohne N-myc-Amplifikation. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen.

Di Cioccio V, Strippoli R, Bizzarri C, Troiani G, Cervellera MN, Gloaguen I, Colagrande A, Cattozzo EM, Pagliei S, Santoni A, Colotta F, Mainiero F and Bertini R (2004) Key role of proline-rich tyrosine kinase 2 in interleukin-8 (CXCL8/IL-8)-mediated human neutrophil chemotaxis. *Immunology* 111: 407-415.

Dransfield I, Rossi AG, Brown SB and Hart SP (2005) Neutrophils: dead or effete? Cell surface phenotype and implications for phagocytic clearance. *Cell Death Differ* 12: 1363–1367.

Durr MC, Kristian SA, Otto M, Matteoli G, Margolis PS, Trias J, van Kessel KP, van Strijp JA, Bohn E, Landmann R and Peschel A (2006) Neutrophil chemotaxis by pathogen-associated molecular patterns--formylated peptides are crucial but not the sole neutrophil attractants produced by *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol* 8: 207-217.

Edwards SW, Moulding DA, Derouet M and Moots RJ (2003) Regulation of neutrophil apoptosis. *Chem Immunol Allergy* 83: 204-224.

Elsässer D, Valerius T, Repp R, Weiner GJ, Deo Y, Kalden JR, van de Winkel JG, Stevenson GT, Glennie MJ and Gramatzki M (1996) HLA class II as potential target antigen on malignant B cells for therapy with bispecific antibodies in combination with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 87: 3803-3812.

Essin K, Gollasch M, Rolle S, Weissgerber P, Sausbier M, Bohn E, Autenrieth IB, Ruth P, Luft FC, Nauseef WM and Kettritz R (2009) BK channels in innate immune functions of neutrophils and macrophages. *Blood* 113: 1326-1331.

Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF and Dvorak AM (1998) Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med* 187: 903–915.

Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, Castelli C, Mariani L, Parmiani G and Rivoltini L (2007) Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol* 25: 2546-2553.

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V and Zychlinsky A (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176: 231-241.

Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH and Wagner DD (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107: 15880–15885.

Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, Basso G, Brombacher F, Borrello I, Zanovello P, Biccato S and Bronte V (2006) Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest* 116: 2777-2790.

Ganz T (1999) Oxygen-independent microbicidal mechanisms of phagocytes. *Proc Assoc Am Physicians* 111: 390-395.

Geering B, Gurzeler U, Federzoni E, Kaufmann T and Simon HU (2011) A novel TNFR1-triggered apoptosis pathway mediated by class IA PI3Ks in neutrophils. *Blood* 117: 5953-5962.

Ghoneum M and Abedi S (2004) Enhancement of natural killer cell activity of aged mice by modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran®). *J Pharm Pharmacol* 56: 1581-1588.

Ghoneum M and Gollapudi S (2005) Synergistic role of arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran®) in *S. cerevisiae*-induced apoptosis of monolayer breast cancer MCF-7 cells. *Anticancer Res* 25: 4187-4196.

Ghoneum M and Jewett A (2000) Production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma from human peripheral blood lymphocytes by MGN-3, a modified arabinoxylan from rice bran, and its synergy with interleukin-2 in vitro. *Cancer Detect Prev* 24: 314-324.

Glücksmann A (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 26: 59-86.

Gold R, Stadelmann C, Brück W and Lassmann H (2001) Apoptotischer Zelltod bei neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen. *Akt Neurol* 28: 17-25.

Graham SH and Chen J (2001) Programmed Cell Death in Cerebral Ischemia. *J Cerebr Blood Flow & Metab* 21: 99-109.

Greenwood J, Amos CL, Walters CE, Couraud PO, Lyck R, Engelhardt B and Adamson P (2003) Intracellular domain of brain endothelial intercellular adhesion

molecule-1 ist essential für T-lymphocyte-mediated signaling and migration. *J Immunol* 171: 2099-2108.

Griendling KK and Lyle AN (2006) Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology* 21: 269-280.

Griffith OW (1985) Glutathione and glutathione disulphide. In: Bernt E and Bergmeyer HU (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 522-529.

Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE and Zychlinsky A (2010) Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 9813–9818.

Hampson P, Hazeldine J and Lord JM (2013) Neutrophil apoptosis and its induction as a potential treatment for chronic inflammatory disease. *Curr Opin Hematol* 20: 10-15.

Hampton MB, Kettle AJ and Winterbourn CC (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007–3017.

Haslett C (1999) Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 5–11.

Hauert AB, Martinelli S, Marone C and Niggli V (2002) Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 838-854.

Heit B, Tavener S, Raharjo E and Kubes P (2002) An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol* 159: 91–102.

Henderson LM, Chappell JB and Jones OTG (1987) The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H⁺ channel. *Biochem J* 246: 325-329.

Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D and Frenette PS (2007). Complete identification of E-Selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* 26: 477-489.

Houghton AN and Lloyd KO (1998) Stuck in the MUC on the long and winding road. *Nat Med* 4: 270-271.

Hughes BJ, Hollers JC, Crockett-Torabi E and Smith CW (1992) Recruitment of cd11b/cd18 to the neutrophil surface and adherence-dependent cell locomotion. *J Clin Invest* 90: 1687–1696.

Iverson D, DeChatelet LR, Spitznagel JK and Wang P (1977) Comparison of NADH and NADPH oxidase activities in granules isolated from human polymorphonuclear leukocytes with a fluorometric assay. *J Clin Invest* 59: 282-290.

Iverson DB, Wang-Iverson P, Spitznagel JK, DeChatelet LR (1978) Subcellular localization of NAD(P)H oxidase(s) in human neutrophilic polymorphonuclear leucocytes. *Biochem J* Oct 176: 175-178.

Iyer GYN, Islam DMF and Quastel JH (1961) Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature* 192: 535-541.

Jacobson MD, Weil M and Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354.

Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Frémaux I, Doni A, Moalli F, Garlanda C, Romani L, Gascan H, Bellocchio S, Bozza S, Cassatella MA, Jeannin P and Mantovani A (2007) The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med* 204: 793-804.

Janeway CA Jr and Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-202.

Kang T, Yi J, Guo A, Wang X, Overall CM, Jiang W, Elde R, Borregaard N and Pei D (2001) Subcellular distribution and cytokine-and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J Biol Chem* 276: 21960-21968.

Kemmler N (2012). Die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Sepsis und Zystischer Fibrose. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen.

Keppler D and Decker K, Glykogen determination with amyloglucosidase, in *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed., Bergmeyer HU, Ed., Academic press, New York, NY, 1974, 1201.

Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.

Kim HJ, Hawke N and Baldwin AS (2006) NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 13: 738-747.

Kolaczowska E, Grzybek W, van Rooijen N, Piccard H, Plytycz B, Arnold B and Opdenakker G (2009) Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis. *J Leukoc Biol* 85: 374-381.

Kuschinski W and Gillardon F (2000) Apoptosis and Cerebral ischaemia. *Cerebrovasc Dis* 110: 165-169.

Kuwano Y, Spelten O, Zhang H, Ley K and Zarbock A (2010) Rolling on E- or P-selectin induces the extended, but not high affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood* 116: 617-624.

Lapidot T and Kollet O (2002) The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia* 16: 1992-2003.

Lassègue B and Clempus RE (2003) Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R277–R297.

Leitch AE, Lucas CD, Marwick JA, Duffin R, Haslett C and Rossi AG (2012) Cyclin-dependent kinases 7 and 9 specifically regulate neutrophil transcription and their inhibition drives apoptosis to promote resolution of inflammation. *Cell Death Differ* 19: 1950-1961.

Lewen A, Matz P and Chan PH (2000) Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotraum* 17: 871-890.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI and Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678-689.

Ley K, Smith E and Stark MA (2006) IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res* 34: 229-242.

Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N and Wang Y (2010) PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 207: 1853-1862.

Li Q, Pan PY, Gu P, Xu D and Chen SH (2004) Role of immature myeloid Gr-1+ cells in the development of antitumor immunity. *Cancer Res* 64: 1130-1139.

Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV and Wu D (2000) Roles of $\text{plc-}\beta\text{2}$ and $\text{-}\beta\text{3}$ and $\text{pi3k}\gamma$ in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* 287: 1046–1049.

Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF and Dunn AR (1994) Micelacking granulocyte colony stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 84: 1737-1746.

Lockshin RA and Williams CM (1964) Programmed cell death. *J Insect physiol* 10: 643-649.

Löffler G (2005) *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, Springer, 6. Auflage, 2005.

Marcos V, Zhou Z, Yildirim AO, Bohla A, Hector A, Vitkov L, Wiedenbauer EM, Krautgartner WD, Stoiber W, Belohradsky BH, Rieber N, Kormann M, Koller B, Roscher A, Roos D, Griese M, Eickelberg O, Döring G, Mall MA and Hartl D (2011) CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med* 17: 899.

Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P and Bronte V (2008) Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev* 222: 162-179.

Marshall BT, Long M, Piper JW, Yago T, McEver RP and Zhu C (2003) Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature* 423: 190-193

Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhekov K, Khandagale AB, Konrad I, Kennerknecht E, Reges K, Holdenrieder S, Braun S, Reinhardt C, Spannagl M, Preissner KT and Engelmann B (2010) Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 16: 887-896.

Maturana A, Krause KH and Demaurex N (2002) NOX family NADPH oxidases: Do they have built-in proton channels? *J Gen Physiol* 120: 781-786.

Mayer-Scholl A, Hurwitz R, Brinkmann V, Schmid M, Jungblut P, Weinrauch Y and Zychlinsky A (2005) Human neutrophils kill *Bacillus anthracis*. *PLoS Pathog* 1: e23.

McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, Heesemann J and Ebel F (2010) NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect* 12: 928-936.

Melani C, Chiodoni C, Forni G and Colombo MP (2003) Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity. *Blood* 102: 2138-2145.

Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, Wahn V, Papayannopoulos V and Zychlinsky A (2011) Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: Implications for innate immunity. *Blood* 117: 953-959.

Miller LS, O'Connell RM, Gutierrez MA, Pietras EM, Shahangian A, Gross CE, Thirumala A, Cheung AL, Cheng G and Modlin RL (2006) MyD88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against *Staphylococcus aureus*. *Immunity* 24: 79-91.

Mitchison TJ and Cramer LP (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84: 371-379.

Muller WA (2003) Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 24: 327-334.

Muller WA (2003) Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 24: 327-334.

Müller-Peddinghaus R (1984) In Vitro Determination of Phagocyte Activity by Luminol- and Lucigenin-Amplified Chemiluminescence. *Int J Immunopharmac* 6: 455-466.

Murthy ARK, Lehrer RI, Harwig SSL and Miyasaki KT (1993) In vitro candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex. *J. Immunol* 151: 6291-6301.

Nauseef WM (1988) Myeloperoxidase deficiency. *Hematol Oncol Clin N Am* 2: 135-158.

Niggli V (2003) Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 1619-1638.

Nobes CD and Hall A (1999) Rho gtpases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 144:1235-1244.

Ostrand-Rosenberg S and Sinha P (2009) Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182: 4499-4506.

Pan PY, Wang GX, Yin B, Ozao J, Ku T, Divino CM and Chen SH (2008) Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* 111: 219-228.

Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A and Zychlinsky A (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 191: 677-691.

Paraskevas F (1999) Phagocytosis. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, editors. *Wintrobe's clinical hematology*. 10th ed. Baltimore, Maryland USA: Williams & Wilkins; p. 415-29.

Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM and Kubes P (2006) Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med* 203: 2569–2575.

Phillipson M, Kaur J, Colarusso P, Ballantyne CM and Kubes P (2008) Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PLoS One* 3: e1649.

Phillipson M and Kubes P (2011) The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 17: 1381-1390.

Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K and Koenderman L (2010) In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116: 625-627.

Preis PN, Saya H, Nádasdi L, Hochhaus G, Levin V and Sadée W (1988) Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A. *Cancer Res* 48: 6530-6534.

Puellmann K, Kaminski WE, Vogel M, Nebe CT, Schroeder J, Wolf H and Beham AW (2006) A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14441-14446.

Puri KD, Doggett TA, Huang CY, Douangpanya J, Hayflick JS, Turner M, Penninger J and Diacovo TG (2005) The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. *Blood* 106: 150-157.

Rabinovich GA, Gabrilovich D and Sotomayor EM (2007) Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25: 267-296.

Raza K, Scheel-Toellner D, Lee C-Y, Pilling D, Curnow SJ, Falciani F, Trevino V, Kumar K, Assi LK, Lord JM, Gordon C, Buckley CD and Salmon M (2006) Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 8: R120.

Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J and Segal AW (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by k⁺ influx. *Nature* 416: 291-297.

Reiss M and Roos D (1978) Differences in oxygen metabolism of phagocytosing monocytes and neutrophils. *J Clin Invest* 61: 480-488.

Ren Y, Xie Y, Jiang G, Fan J, Yeung J, Li W, Tam PK and Savill J (2008) Apoptotic cells protect mice against lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol* 180: 4978-4985.

Rieber N, Gille C, Köstlin N, Schäfer I, Spring B, Ost M, Spieles H, Kugel HA, Pfeiffer M, Heininger V, Alkhaled M, Hector A, Mays L, Kormann M, Zundel S, Fuchs J, Handgretinger R, Poets CF and Hartl D (2013) Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. *Clin Exp Immunol* 174: 45-52.

Roos D, van Bruggen R and Meischl C (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect* 5: 1307-1315.

Saffarzadeh M and Preissner KT (2013) Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. *Curr Opin Hematol* 20: 3-9.

Sawanobori Y, Ueha S, Kurachi M, Shimaoka T, Talmadge JE, Abe J, Shono Y, Kitabatake M, Kakimi K, Mukaida N and Matsushima K (2008) Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood* 111: 5457-5466.

Scannell M, Flanagan MB, deStefani A, Wynne KJ, Cagney G, Godson C and Maderna P (2007) Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol* 178: 4595-4605.

Schreiber, H and Rowley DA (2008) Cancer. Quo vadis, specificity? *Science* 319: 164-165.

Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23: 197-223.
Sekine C, Sugihara T, Miyake S, Hirai H, Yoshida M, Miyasaka N and Kohsaka H (2008) Successful treatment of animal models of rheumatoid arthritis with small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Immunol* 180: 1954-1961.

Semenza G (2002) Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 64: 993-998.

Serafini P, Meckel K, Kelso M, Noonan K, Califano J, Koch W, Dolcetti L, Bronte V and Borrello I (2006) Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous

antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* 203: 2691-2702.

Sercan O, Hammerling GJ, Arnold B and Schuler T (2006) Innate immune cells contribute to the IFN-gamma-dependent regulation of antigen-specific CD8⁺ T cell homeostasis. *J Immunol* 176: 735-739.

Shaw SK, Bamba PS, Perkins BN and Luscinskas FW (2001) Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol* 167: 2323-2330.

Sinha P, Clements VK, Fulton AM and Ostrand-Rosenberg S (2007) Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67: 4507-4513.

Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S and Srikrishna G (2008) Proinflammatory s100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 181: 4666-4675.

Smith JA (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56: 672-686.

Steller H (1995) Mechanisms genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449.

Strieter RM (2003) Mastering innate immunity. *Nat Med* 9: 512-513.

Strobel S (2005) Bestimmung von sphingolipidabbauenden Enzymen in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zur Optimierung der Labordiagnostik bei Sphingolipid-Speichererkrankungen. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen.

Stuart LM and Ezekowitz RA (2005) Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* 22: 539-550.

Summers C and Ranking SM (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trend Immunol* 31: 318-324.

Takenawa T and Miki H (2001) Wasp and wave family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* 114:1801-1809.

Tata JR (1966) Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of tadpole tail in organ culture. *Dev Biol* 13: 77-94.

Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, Letterio JJ, Paul WE and Berzofsky JA (2003)

Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence *J Exp Med* 198: 1741-1752.

Terabe M, Park JM and Berzofsky JA (2004) Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. *Cancer Immunol Immunother* 53: 79-85.

Theilgaard-Mönch K, Porse BT and Borregaard N (2006) Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr Opin Immunol* 18: 54-60.

Thorén FB, Riise RE, Ousbäck J, Della Chiesa M, Alsterholm M, Marcenaro E, Pesce S, Prato C, Cantoni C, Bylund J, Moretta L and Moretta A (2012) Human NK Cells induce neutrophil apoptosis via an NKp46- and Fas-dependent mechanism. *J Immunol* 188: 1668-1674.

Tofts PS, Chevassut T, Cutajar M, Dowell NG and Peters AM (2011) Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 117: 6050-6052.

Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M and Yodoi J (2002) Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal* 4: 405-414.

Umemura N, Saio M, Suwa T, Kitoh Y, Bai J, Nonaka K, Ouyang GF, Okada M, Balazs M, Adany R, Shibata T and Takami T (2008) Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *J Leukoc Biol* 83: 1136-44.

Urban C F, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR and Zychlinsky A (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 5: e1000639.

Urban CF, Reichard U, Brinkmann V and Zychlinsky A (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8: 668-676.

Vestweber D and Blanks JE (1999) Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 79: 181-213.

Vieweg J, Su Z, Dahm P and Kusmartsev S (2007) Reversal of tumor-mediated immunosuppression. *Clin Cancer Res* 13: 727-732.

Vilim V and Wilhelm J (1989) What Do We Measure by a Luminol-Dependent Chemiluminescence of Phagocytes? *Free Rad Biol Med* 6: 623-629.

Von Vietinghoff S and Ley K (2009) IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J Immunol* 183: 865-873.

Wang K, Hampson P, Hazeldine J, Krystof V, Strnad M and Pechan PMJ (2012) Cyclin-dependent kinase 9 activity regulates neutrophil spontaneous apoptosis. *PLoS One* 7: e30128.

Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD and Coonrod SA (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination. *Science* 306: 279-283.

Warren MC, Bump EA, Medeiros D and Braunhut SJ (2000) Oxidative stress-induced apoptosis of endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 29: 537-547.

Weiss SJ (1989) Tissue Destruction by Neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365-376.

Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs H, Quie P, Buckley RH, Foster CB, Chanock SJ and Dickler H (2000) Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 79:155-169.

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P and Halbwachs-Mecarelli L (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80: 617-653.

Woodfin A, Voisin MB and Nourshargh S (2010) Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol* 17: 9-17.

Wyllie AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556.

Xu J, Wang F, Van Keymeulen A, Herzmark P, Straight A, Kelly K, Takuwa Y, Sugimoto N, Mitchison T and Bourne HR (2003) Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* 114: 201-214.

Yago T, Shao B, Miner JJ, Yao L, Klopocki AG, Maeda K, Coggeshall KM and McEver RP (2010) E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin α L β 2-mediated slow leucocyte rolling. *Blood* 116: 485-494.

Yang L, Huang J, Ren X, Gorska AE, Chytil A, Aakre M, Carbone DP, Matrisian LM, Richmond A, Lin PC and Moses HL (2008) Abrogation of TGF β signaling

in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 13: 23-35.

Yost CC, Cody MJ, Harris ES, Thornton NL, McInturff AM, Martinez ML, Chandler NB, Rodesch CK, Albertine KH, Petti CA, Weyrich AS and Zimmerman GA (2009) Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood* 113: 6419-6427.

Yu AL, Uttenreuther-Fischer MM, Huang CS, Tsui CC, Gillies SD, Reisfeld RA and Kung FH (1998) Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. *J Clin Oncol* 16: 2169-2180.

Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ and Diez J. (2001) Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H Oxidase. *Hypertension* 38: 1395-1399.

Zarbock A, Abram CL, Hundt M, Altman A, Lowell CA and Ley K (2008) PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling. *J Exp Med* 205: 2339-2347.

Zarbock A, Deem TL, Burcin TL and Ley K (2007) Galpha_{i2} is required for chemokine-induced neutrophil arrest. *Blood* 110: 3773-3779.

Zhelev DV and Alteraifi A (2002) Signaling in the motility responses of the human neutrophil. *Ann Biomed Eng* 30: 356-370.

Zipfel M, Carmine TC, Gerber C, Niethammer D and Bruchelt G (1997) Evidence for the activation of myeloperoxidase by f-Meth-Leu-Phe prior to its release from neutrophil granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 232: 209-12.

Erklärungen zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

So wurde Kapitel 3.2 in Zusammenarbeit mit Jens Neumann (Forschungsgruppe Prof. Bruchelt; medizinische Doktorarbeit in Präparation, Kinderklinik Tübingen 2014) erstellt. Hierbei war Jens Neumann für die Isolierung und Aufbereitung der Neuroblastomzellen, sowie die Durchführung des BATDA-Release-Assay („Europium-Assay“) im Rahmen der ADCC-Reaktion neutrophiler Granulozyten gegenüber Neuroblastomzellen verantwortlich.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe, und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Danksagung

Diese Dissertation entstand an der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin in der Abteilung Hämatologie und Onkologie unter der Leitung des ärztlichen Direktors Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger, dem ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke.

Ein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. Bruchelt für die Festlegung des Themas der Dissertation und für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die Bereitschaft zur Übernahme der Erstgutachterrolle. Mit seinem enormen Wissen ließ er mich an seiner Forschungserfahrung teilhaben und führte mich mit seiner Begeisterungsfähigkeit auch durch schwierige Phasen der Laborarbeit.

Weiterer Dank gebührt den Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor, insbesondere Frau Dr. N. Kemmler und insbesondere J. Neumann für ihre stets positive Einstellung und ermutigende Unterstützung und Zusammenarbeit. Ebenso danke ich dem hämatologischen Routinelabor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin für die Bereitstellung des ADVIA 120 zur Blutbildbestimmung.

Bei meinen Eltern möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir das Studium ermöglicht haben. Meiner Freundin Chiara möchte ich für die Geduld und die aufbauenden Worte insbesondere während der Zeit des Zusammenschreibens danken.