

**Untersuchungen zur Proteinfreisetzung und -kompartimentierung
humaner neutrophiler Granulozyten
unter besonderer
Berücksichtigung des Zytoskeletts**

**Dissertation
zur
Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der
Universität Bielefeld**

vorgelegt von
Almut Schettler
aus
Bielefeld

Bielefeld im November 1991

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV-V
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	
2.1. Entzündung	3
2.2. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten	5
2.2.1. Funktionen der neutrophilen Granulozyten	6
2.2.1.1. Chemotaxis und Leukodiapedese der PMNL	7
2.2.1.2. Phagozytose neutrophiler Granulozyten	8
2.2.1.3. "Respiratory/oxidative burst"-Reaktion der PMNL	9
2.2.1.4. Sekretion von Enzymen und Proteinen durch PMNL	
2.2.2. Granula der neutrophilen Granulozyten	12
2.2.2.1. Proteine/Enzyme der PMNL	13
2.2.3. Das Zytoskelett der PMNL	15
2.2.4. Intrazelluläre Signaltransduktion der Granulozyten	17
2.3. Rolle der PMNL bei pathologischen Erscheinungen	20
2.4. Zielsetzung	22
3. Material und Methoden	
3.1. Biochemische Methoden	24
3.1.1. Isolierung der PMNL aus humanem Vollblut	24
3.1.2. Bestimmung der Zellzahl und Lebendrate der PMNL	26
3.1.3. Fixierung der Zellen und Erstellung eines Differential- blutbildes	26
3.1.4. Aufschluß der Zellen und Zerstörung der Granulamembranen	27

II

3.1.5.	Abtrennung von Zellen und Zellkomponenten mittels Zentrifugation	28
3.1.6.	Durchführung der Sekretionsexperimente	28
3.1.7.	Bestimmung der Zahl nicht angehefteter PMNL	29
3.1.8.	Zur Stimulierung/Behandlung der PMNL verwendete Substanzen	29
3.1.9.	Messung der Elastasekonzentration	30
3.1.10.	Messung der Myeloperoxidasekonzentration	32
3.1.11.	Behandlung von Gesamtextrakten/PMNL mit 1 M NaCl	34
3.1.12.	Nachweis von Elastase mittels SDS-PAGE	35
3.1.13.	Verfahren zur Bestimmung des G-Aktingehalts	38
3.1.14.	Fluoreszenzmarkierung von Aktin	39
3.2.	Immunologische Methoden	
3.2.1.	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay	40
3.2.1.1.	Herstellung der Antikörper-Konjugate	44
3.3.	Mikroskopie	
3.3.1.	Licht-und Fluoreszenzmikroskopie	46
3.3.2.	Rasterelektronenmikroskopie	46
4.	Ergebnisse	
4.1.	Blutauarbeitung und Blutspender	49
4.2.	Bestimmung des Protein-/Enzymgesamtgehaltes	50
4.3.	Untersuchungen zur Protein-/Enzymsekretion neutrophiler Granulozyten	52
4.3.1.	FNLPNTL-Stimulierung von PMNL mit und ohne Cytochalasin B Behandlung	52
4.3.1.1.	Untersuchungen zur Wirkung von Cytochalasin B	57
4.3.2.	Stimulierung der PMNL mit Prostaglandin F _{2α}	61
4.3.3.	Stimulierung der PMNL mit Leucin-Enkephalin	64
4.3.4.	Granulafreisetzung phagozytierender PMNL	66

4.3.5.	Granulafreisetzung nach Erhöhung des cAMP-Spiegels durch Hemmung der Phosphodiesterase	70
--------	--	----

III

4.3.6.	Protein-/Enzymfreisetzung nach Zerstörung der Mikrotubuli	75
4.3.7.	Untersuchungen zur Anheftung von PMNL	78
4.3.7.1.	Anheftungsrate der Zellen nach Stimulierung	78
4.3.7.2.	Proteinsekretion angehefteter/suspendierter PMNL	80
4.4.	Zusammenfassung der Sekretionsergebnisse	82
4.5.	Assoziation der Granula mit dem Zytoskelett	85
4.6.	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	88
4.6.1.	Untersuchungen zur Phagozytose und Darstellung der Granula	88
4.7.	Untersuchungen zur Elastasesekretion	92
4.7.1.	NaCl-Behandlung von Gesamtextrakten und stimulierten PMNL	92
4.7.2.	Gelelektrophoretische Auftrennung sezernierter Elastase	95

5. Diskussion

5.1.	Isolierung der PMNL	101
5.2.	Sekretionsmuster und Kompartimentierung der untersuchten Proteine	102
5.2.1.	Testbedingungen zur Untersuchung der Granulafreisetzung	102
5.2.2.	Proteinfreisetzung nach Stimulierung der Neutrophilen mit FNLNPTL und körpereigenen Substanzen	102
5.2.3.	Granulafreisetzung phagozytischer PMNL	105
5.2.4.	Hemmung der Degranulation durch Erhöhung des cAMP-Spiegels	106
5.3.	Einfluß des Zytoskeletts auf die Granulafreisetzung neutrophiler Granulozyten	107
5.3.1.	Assoziation der Granula mit dem Zytoskelett	107
5.3.2.	Beteiligung der Mikrotubuli an der Granulafreisetzung	108
5.3.3.	Mikrofilamente und Granulafreisetzung	109
5.3.4.	Anheftung und Proteinsekretion	110

5.4.	Untersuchungen zur Elastasesekretion	112
5.4.1.	Assoziation der Elastase mit unlöslichen Zellbestandteilen	112
5.4.2.	Darstellung sezernierter Elastase	113
6.	Literaturverzeichnis	116

Abkürzungen

AB:	(engl.) antibody
ABTS:	Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin)-Sulfonsäure
atm:	Atmosphären
ATP:	Adenosintriphosphat
bidest.:	zweifach destilliert
cAMP:	cyklisches Adenosinmonophosphat
CB:	Cytochalsin B
CD:	Cytochalasin D
CMF-PBS:	(engl.) Calcium-magnesium-free-phosphate-buffered-saline
Col:	Colcemid = Demecolchicin
DAG:	Diacylglycerin
DFP:	Diisopropylfluorophosphat
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	(engl.) desoxyribo-nucleic-acid
DPBS:	(engl.) Dulbeccos-phosphate-buffered-saline
EDTA:	(engl.) ethylen-diamin-tetra-acetic-acid
EGTA:	(engl.) ethylen-glycol-tetra-acetic-acid
ELISA:	(engl.) enzyme-linked-immunosorbent-assay
F-Aktin:	filamentöses Aktin
FITC:	Fluorescein-isothiocyanat
FMLP:	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FNLNPTL:	Formyl-Norleucyl-Leucyl-Phenylalanyl-Norleucyl-Tyrosyl-Leucin
G-Aktin:	globuläres Aktin
GTP:	Guanosintriphosphat
HL:	human-leukozytär
IgG:	Immunglobulin der Klasse G
IP ₃ :	Inositoltriphosphat
kDa:	Kilodalton (Masse eines Moleküls)
LMW:	(engl.) low molecular weight
Leu-Enk:	Leucin-Enkephalin

V

M:	molar
μg :	Mikrogramm (10^{-6} g)
mg:	Milligramm (10^{-3} g)
min:	Minute
ml:	Milliliter
mM:	millimolar (10^{-3} M)
mU:	10^{-9} mol/min umgesetztes Substrat (Einheit der Enzymaktivität)
n:	Grundgesamtheit (Anzahl der durchgeführten Tests)
ng:	Nanogramm (10^{-9} g)
OD:	optische Dichte
PAGE:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAF:	(engl.) platelets-activating-factor
PBS:	(engl.) phosphate-buffered-saline
PGE ₁ :	Prostaglandin des Typs E ₁
PGF _{2α} :	Prostaglandin des Typ F _{2α}
Pg :	Pikogramm (10^{-12} g)
α_1 -PI:	α_1 -Proteinaseinhibitor
PLA ₂ :	Phospholipase A ₂
PLC:	Phospholipase C
PMA:	Phorbol-Myristat-Acetat
REM:	Rasterelektronenmikroskop
RSA:	Rinderserumalbumin
RT:	Raumtemperatur
SDS:	(engl.) sodium-dodecyl-sulfate
sec:	Sekunde/n
Std.:	Stunde/n
TEM:	Transmissionselektronen-Mikroskopie
TKI:	Trypsin-Kallikrein-Inhibitor
TRIS:	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween:	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
Za:	Zardaverin

1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Kompartimentierung von Proteinen neutrophiler Granulozyten (PMNL) durchgeführt. Ausgangspunkt für diese Experimente war die bisher nur teilweise bzw. widersprüchlich aufgeklärte Kompartimentierung von PMNL-Proteinen in drei Granula-Hauptgruppen (spezifische Granula /azurophile Granula/C-Partikel). Desweiteren wurde der Einfluß des Zytoskeletts (Mikrofilamente/ Mikrotubuli) auf die Granulafreisetzung der PMNL durch Einsatz Zytoskelett- zerstörender Agentien untersucht.

Bei den durchgeführten Stimulierungsexperimenten wurden die Sekretionsmuster der Metalloenzyme Typ-I-Kollagenase (spezifische Granula) und Gelatinase (C-Partikel), sowie die der Proteine Elastase (azurophile Granula), Myeloperoxidase (azurophile Granula) und Laktoferrin (spezifische Granula) aufgenommen.

Die dabei eingesetzten PMNL wurden aus dem Blut von ca. 50 verschiedenen Spendern durch eine schnelle und schonende Präparationsmethode isoliert.

Bei der Stimulierung der Zellen mit verschiedenen Agentien (Formyl-Peptide, Zymosan-Partikel, Prostaglandin $F_{2\alpha}$, Cytochalasin B) ergab sich für alle untersuchten Proteine ein unterschiedliches Sekretionsmuster. Auch die Freisetzung durch unbehandelte Kontrollzellen wies z.T. erhebliche Unterschiede in bezug auf die hier untersuchten Proteine auf, so daß eine "deckungsgleiche" Kompartimentierung eines oder mehrerer dieser Proteine ausgeschlossen werden kann. Die drei bisher beschriebenen Granula-Hauptgruppen scheinen Subpopulationen aufzuweisen, die verschiedene Proteine bzw. Proteine in einem unterschiedlichen Mengenverhältnis speichern.

Diese Annahme konnte im weiteren durch die unterschiedliche Inhibierung der Freisetzung der PMNL-Proteine durch Erhöhung des $cAMP_{intrazell.}$ Spiegels belegt werden. Auch die Assoziation der untersuchten Proteine bzw. der sie speichernden Kompartimente mit dem Zytoskelett differierte z.T. erheblich.

Die Untersuchungen zur Beteiligung des Zytoskeletts an der Degranulation neutrophiler Granulozyten zeigten, daß sowohl die Mikrofilamente (Aktinfilamente = F-Aktin), als auch die Mikrotubuli Einfluß auf die Proteinfreisetzung haben.

Das kortikale Aktinfilamentnetz der PMNL scheint in Abhängigkeit von der Größe der Granula eine Sekretionsbarriere darzustellen. Eine Stimulus- induzierte Freisetzung der

größten Kompartimente (azurophile Granula) konnte nur bei gleichzeitiger Zerstörung der Mikrofilamente mittels Cytochalasin B erreicht werden. Auch die Freisetzung der kleineren Kompartimente (spezifische Granula/C-Partikel) wurde durch eine solche Behandlung erhöht. Dabei war bei zunehmender Inkubationsdauer mit dem Mikrofilament-zerstörenden Agents eine Zunahme an monomerem Aktin (Abnahme von F-Aktin) im Überstand von Zell-Lysaten zu verzeichnen, die mit einer Steigerung der Sekretionsrate einherging.

Mikrotubuli, eine weitere Hauptgruppe von Zytoskelett-Proteinen, stellen in Verbindung mit sog. Motorproteinen (Kinesin/Dynein) ein Transportsystem für sekretorische Vesikel und Organellen in Zellen dar. Es konnte gezeigt werden, daß neben der FNL PNTL - induzierten auch die durch CB/FNL PNTL- Zusatz erreichte Granula-freisetzung von intakten Mikrotubuli abhängig ist.

2. Einleitung

2.1. Entzündung

Unter dem Begriff "**Entzündung**" wird eine Vielzahl komplexer, zellulär-biochemischer Reaktionen zusammengefaßt, die der Abwehr körperfremder/-eigener Noxen (Substanzen mit schädigender, krankheitserregender Wirkung) und dem Abbau beschädigten Gewebes dienen.

Entzündungsauslösend wirken physikalische Faktoren (Strahlung etc.), mechanische Verletzung von Gewebe, chemische Stoffe, eindringende Mikroorganismen (Pilze, Viren, Bakterien und Parasiten), aber auch autogene Reize wie extravasales Blut, maligne Tumore oder Präzipitate körpereigener Substanzen (AB-Komplexe, Uratkristalle etc.).

Ein komplexes Zusammenspiel humoraler und zellulärer Reaktionen führt zu den klassischen Entzündungssymptomen: **Rötung (Rubor)**, **Wärmebildung (Calor)**, **Schwellung (Tumor)**, **Schmerz (Dolor)** und **Funktionsverlust** des betroffenen Gewebes (**Functio laesa**) [Pschyrembel, 1989].

Durch Schädigung von Gewebe kommt es zur Aktivierung der Gerinnungskaskade und des Kallikrein-Kinin-Systems. Dabei werden eine Reihe von Entzündungsmediatoren (Komplementfaktoren, Prostaglandine, Kinine etc.) freigesetzt, die zu einer gesteigerten Durchblutung und Stoffwechselleistung (Rubor und Calor), zur Aktivierung verschiedenster Zelltypen sowie zum Austritt von Plasma in das betroffene Gewebe (Tumor) führen [Lang, 1989].

Noch vor der Produktion spezifischer Antikörper treten Zellen des Immunsystems (Granulozyten, nachfolgend Monozyten und später Lymphozyten) aus dem Blutstrom aus und wandern gerichtet (Chemotaxis) in das betroffene Gewebe ein; dabei wirken Entzündungsmediatoren, Matrixbruchstücke sowie Substanzen bakteriellen Ursprungs als Chemotaxine.

2. Einleitung

Am Entzündungsherd werden zerstörtes Gewebe und eingedrungene Mikroorganismen von Zellen phagozytiert (Aufnahme fester Stoffe). Eine Vielzahl von Enzymen in lysosomalen Strukturen dieser Zellen ermöglichen die Bildung bakterizid-wirkender Sauerstoffmetaboliten und die intrazelluläre Verdauung des phagozytierten Materials. Bei heftigem Entzündungsverlauf kommt es zur Eiterbildung, einer aus nekrotischem Gewebe und polymorphkernigen Granulozyten bestehenden flüssigen Absonderung.

Ein komplexes Zusammenspiel zwischen Entzündungsmediatoren (Faktoren der Gerinnungskaskade, des Komplementsystems etc.) steuert nicht nur die chemotaktische Wanderung der Zellen, sondern auch die Produktion weiterer Mediatoren (z.B. Leukotriene, Prostaglandine) und Antikörper durch die Zellen, die Freisetzung ihrer lysosomalen Proteine sowie den Vorgang der Phagozytose.

Je nach Dauer bzw. Stärke einer entzündlichen Reaktion kann es zu systemischen Veränderungen, wie etwa der drastischen Erhöhung der Leukozytenzahl, Verschiebung der Plasmaprotein-Zusammensetzung, Fieber und einer heftigen Immunreaktion kommen.

Nach Beseitigung von nekrotischem Gewebe und den entzündungs-auslösenden Faktoren, erfolgt durch Thrombozyten und die Proliferation von Bindegewebe-synthetisierenden Zellen (Histiozyten, Fibroblasten etc.) die Wundheilung, d.h. der Aufbau neuen Gewebes.

Ist das komplexe Gleichgewicht einer Entzündungsreaktion durch eingeschränkte Funktion beteiligter Zellen, veränderte Mediatorkonzentration oder eine Autoimmunerkrankung etc. gestört, kommt es zu einer pathologisch verlaufenden Reaktion, innerhalb derer zunehmend körpereigenes Gewebe zerstört wird (chronische Polyarthritits, systemischer Lupus Erythematodes etc.) [Neumann/Lang, 1989].

2.2. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten

Leukozyten (weiße Blutkörperchen) werden in B-/T-Lymphozyten (20-40 %), Monozyten (2-8 %) sowie eosinophile, basophile und neutrophile (polymorphkernige und stabkernige) Granulozyten (50-75 %) unterteilt.

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNL/Neutrophile) bilden mit 50-70 % den Hauptanteil der Granulozyten bzw. Leukozyten im Blut, ihnen kommt im Entzündungsgeschehen eine entscheidende Rolle zu: sie sind die ersten Zellen, die schon nach wenigen Stunden in den Entzündungsherd einwandern.

Gebildet werden die PMNL im Knochenmark aus einer pluripotenten Stammzelle, etwa 10^{11} PMNL werden pro Tag aus dem Knochenmark freigesetzt [Baggiolini, 1980].

Die erste Phase ihrer Bildung dauert ca. 7 Tage und verläuft über die Stadien des/der **Myeloblasten, Promyelozyte, Myelozyte** (Granulopoese/Proliferation), eine 6-tägige Reifung (Maturation) über das Stadium der **Metamyelozyte** zum **stabkernigen und segmentkernigen Granulozyten** schließt sich an [Pschyrembel, 1989].

Die Proliferation der PMNL wird u.a. durch das von Makrophagen sezernierte Glykoprotein CSF (colony stimulating factor) stimuliert, durch das Granulozyten-eigene Protein CIF (colony inhibiting factor) gehemmt.

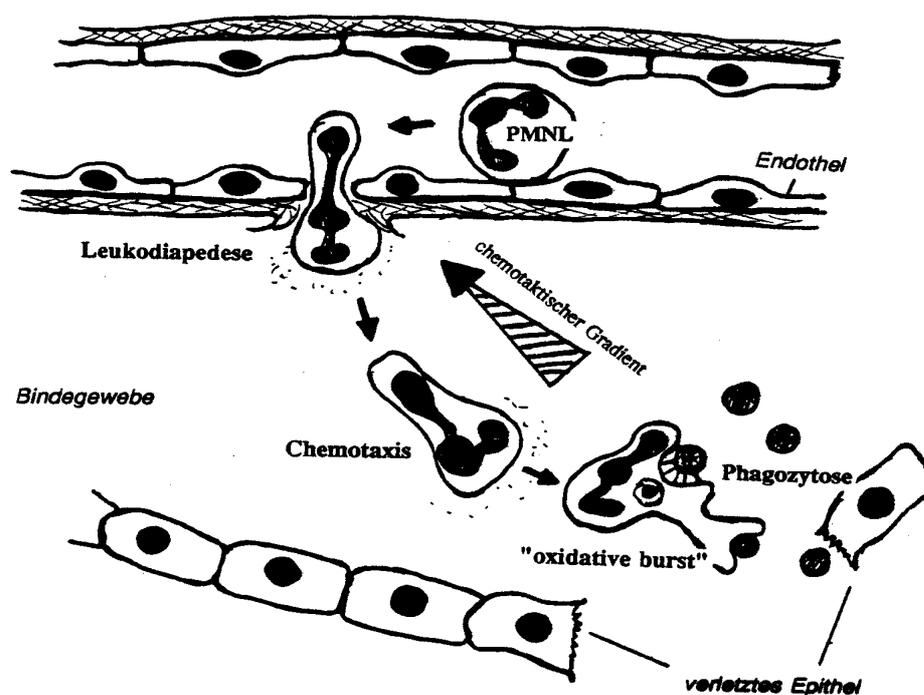
Im Blut unterscheidet man einen marginalen, dem Endothel anhaftenden, und einen zirkulierenden Pool von Granulozyten, wobei der Übergang von Zellen aus dem einen in den anderen Pool möglich ist; die Halbwertszeit der Neutrophilen im Blut beträgt ca. 6-8 Stunden [Rick, 1977 / Kleesiek, 1989].

Die in lysosomalen Strukturen (Granula) der Zellen gespeicherten Proteine/Enzyme sowie die Fähigkeit zur Chemotaxis und zur Phagozytose ermöglichen es den PMNL, ihre Aufgabe innerhalb des unspezifischen zellulären Immunsystems zu erfüllen.

2.2.1. Funktionen der neutrophilen Granulozyten

Die wichtigste Funktion der PMNL ist die Aufnahme und der Abbau von eingedrungenen Mikroorganismen und zerstörtem Gewebe (**Phagozytose**); so werden die Zellen häufig auch als Phagozyten bezeichnet. Den Entzündungsort erreichen sie durch gerichtete Bewegung entlang eines aufsteigenden chemischen Gradienten (z.B. Substanzen bakteriellen Ursprungs) (**Chemotaxis**). In lysosomalen Strukturen (Granula) gespeicherte Proteine/Enzyme ermöglichen den Abbau von ingestiertem Material, aber auch von körpereigenem Gewebe bei der Auswanderung aus dem Blutstrom (**Leukodiapedese**). Die Granula können mit Phagosomen oder der Plasmamembran verschmelzen (**intra-/extrazelluläre Sekretion von Enzymen**). Einige der gespeicherten Proteine sind in einer komplexen Redoxreaktion an der Bildung bakterizid bzw. zytotoxisch wirkender Sauerstoffmetaboliten beteiligt ("**respiratory bzw. oxidative burst reaction**").

Abb. 1 Funktionen der PMNL



2.2.1.1. Chemotaxis und Leukodiapedese der PMNL

Als (positive) **Chemotaxis** bezeichnet man die gerichtete Bewegung von Zellen entlang eines aufsteigenden chemischen Gradienten. PMNL sind einer der beweglichsten humanen Zelltypen, sie wandern mit einer Geschwindigkeit von 30-35 $\mu\text{m}/\text{min}$ [Zigmond, 1977]. Die Zellen migrieren entlang eines chemotaktischen Gradienten zum Entzündungsherd, chemotaktisch wirksam sind dabei Komplementfaktoren (C3a/C5a), Matrixbruchstücke, Leukotriene (LTB_4), Formyl-Peptide sowie eine Reihe weiterer körpereigener und bakterieller Substanzen [Golditz & Movat, 1984 / Schmitt et al., 1986]. Der Migration durch das Gewebe zum Ort der Entzündung geht die Aggregation der Neutrophilen und ihre rezeptorvermittelte Adhäsion an das Endothel voraus [Osborn, 1990 / Schapira et al., 1982]. Die Auswanderung der Zellen bzw. der Durchtritt durch die Endothel-/Matrix-abgrenzende Basallamina erfolgt wahrscheinlich unter Beteiligung sezernierter Gelatinase (**Leukodiapedese**) [Bakowski, 1989].

Bei Kontakt mit Chemotaxinen kommt es nach wenigen Minuten zur Polarisation der PMNL, d.h. zum Auftreten von anterior ausgebildeten Lamellipodien und einem posterior gelegenen Zellschwanz. Dabei sind kontraktile Wellen ("**ruffling**") auf der Zelloberfläche zu beobachten, die von der Front der Zellen zum Hinterende verlaufen [Peter et al., 1988].

Die initiale Polarisierung und chemotaktische Wanderung der Neutrophilen ist verbunden mit der Reorganisation des Zytoskeletts und einer Umverteilung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche [Carson et al., 1986 / Devreotes & Zigmond, 1988]. PMNL können bei ihrer Wanderung noch 1 %-ige Unterschiede im Gradienten detektieren [Zigmond, 1977]; der genaue Mechanismus, mit dessen Hilfe die PMNL sich in einem Gradienten orientieren, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Die Anzahl der Rezeptoren für ein Chemotaxin und deren Verteilung auf der Zelloberfläche sowie die Organisation von Zytoskelettstrukturen spielen dabei eine entscheidende Rolle [Keller et al., 1985 / Peter et al., 1988]. Neben Chemotaxis-inhibierenden Faktoren, wie z.B. dem Anaphylatoxin-Inaktivator (Carboxypeptidase N) und dem Chemotaxin-Inaktivator im Blutserum [Maderazo et al., 1988], führt auch die

Zerstörung der Mikrofilamente zur Hemmung der Migration neutrophiler Granulozyten [Hoffstein, 1980].

2.2.1.2. Phagozytose neutrophiler Granulozyten

Als **Phagozytose** wird die rezeptorvermittelte Aufnahme großer Partikel (Mikroorganismen/Zelltrümmer/Matrixbestandteile) durch Zellen bezeichnet. Dabei wird das zu phagozytierende Material von der Membran eingeschlossen und unter Bildung einer Vakuole (**Phagosom**) internalisiert. Die Opsonierung des aufzunehmenden Materials mit Antikörpern, C5a etc. beschleunigt die Aufnahme durch PMNL und kann die Sekretion von Proteinen und die "respiratory burst reaction" induzieren bzw. verstärken [Müller et al., 1982].

Die Verschmelzung der proteinspeichernden Granula mit dem Phagosom führt zur Bildung von **Phagolysosomen**. Die dabei in das Phagolysosom freigesetzten Proteine/Enzyme (Elastase, Lysozym etc.) sowie die zytotoxische Sauerstoffmetabolite vermitteln den intrazellulären Abbau ingestierter Bestandteile bzw. die Abtötung von Bakterien [Hoffstein, 1980 / Bainton 1973].

Ein einzelner neutrophiler Granulozyt kann eine Vielzahl von Bakterien aufnehmen. Im Verlauf der intrazellulären "Verdauung" der Partikel kommt es zum Absterben der Zelle, die Zelltrümmer werden von anderen Phagozyten beseitigt oder als eitriges Absonderung ausgeschieden.

Substanzen, die die Funktion des Zytoskeletts beeinträchtigen [Hoffstein, 1980], Inhibitoren der Proteinkinase C [Gresham et al., 1989] sowie Produkte der "respiratory burst reaction" [Hamers & Roos, 1985] können zum Verlust der phagozytotischen Aktivität von PMNL führen.

2.2.1.3. "Respiratory/oxidative burst"-Reaktion der PMNL

Die "**respiratory/oxidative burst reaction**" neutrophiler Granulozyten wird durch eine Reihe von Entzündungsmediatoren wie Arachidonsäurekömmlinge, C3b, C5a, Immunkomplexe etc. sowie durch Bakterien und bakterielle Kulturüberstände über die Aktivierung der Proteinkinase C induziert. Die Reaktion führt zur Bildung von zytotoxischen/bakteriziden Sauerstoffmetaboliten [Schmitt et al., 1986 / Baggiolini, 1980]. Der "respiratory/oxidative burst" dient vor allem der Zerstörung bzw. dem Abtöten phagozytierter Mikroorganismen in den Phagolysosomen.

Die respiratorische Reaktion ist begleitet von einer erhöhten O₂-Aufnahme und einem gesteigerten Glukoseumsatz durch die Zellen [Neumann & Lang, 1989 / Baggiolini, 1980]. Eine membranständige NAD(P)H + H⁺-Oxidase ("respiratory burst oxidase" katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff (O₂) zu **Superoxidanionen (O₂⁻)** [Babior, 1987].

Aus den Sauerstoffradikalen entsteht spontan oder durch **Superoxiddismutase (SOD)** katalysiert Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Das H₂O₂ wird von der **Myeloperoxidase (MPO)** mit Halidionen (z.B. Cl⁻) zu **Hypohaliten** (z.B. OCl⁻) und H₂O, mittels Laktoferrin mit Superoxidanionen (O₂⁻) zu molekularem Sauerstoff und **Hydroxyradikationen (OH⁻)** umgesetzt.

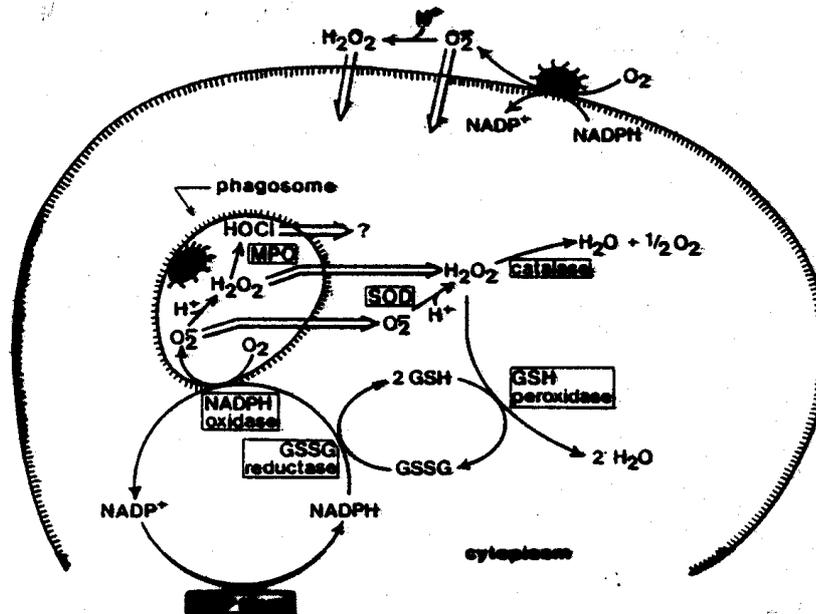
Energiereicher Sauerstoff (O₂-Singlett), Halidionen und H₂O werden spontan aus H₂O₂ und Hypohaliten gebildet (Abb. 2).

Hypohalite, Hydroxyradikale und energiereicher Sauerstoff sind starke Oxidantien, sie wirken durch Oxidation von Carbonylgruppen und Polysacchariden, die Peroxidierung von Lipiden und partielle DNA-Zerstörung (Strangbrüche) stark bakterizid und zytotoxisch. [Hamers & Roos, 1985 / Matheson, 1981 / Till et al., 1985]

Im Verlauf der "respiratory/oxidative burst reaction" kommt es zur Bildung endogener Peroxide (Leukotriene/Prostaglandine), die wiederum als Entzündungsmediatoren dienen können. Auch die Inaktivierung/Aktivierung von PMNL Enzymen durch

Reaktionsprodukte des "oxidative burst" wird beschrieben [Weiss et al., 1985 / Matheson et al., 1981].

Abb. 2 "Respiratory burst reaction" neutrophiler Granulozyten



(aus: Hamers & Roos, 1985)

Intrazellulärer Schutz der PMNL vor den produzierten Sauerstoffmetaboliten wird über die **Katalase** (Zersetzung von H_2O_2), die **Superoxiddismutase (SOD)** (Umsetzung der Superoxidanionen) und das **Glutathionredox-System (GSH/GSSG)** (Oxidierung von Peroxiden und Reduktion von Radikalen etc.) vermittelt (Abb. 2). Trotzdem führt der "oxidative burst" neben der Abtötung von Bakterien in der Regel zum Absterben der Neutrophilen. Auch das Endothel und andere Zellen sowie Matrixkomponenten können im Verlauf der Reaktion in Mitleidenschaft gezogen werden [Hamers & Roos, 1985 / Till et al., 1985 / Retran et al., 1984].

2.2.1.4. Sekretion von Enzymen und Proteinen durch PMNL

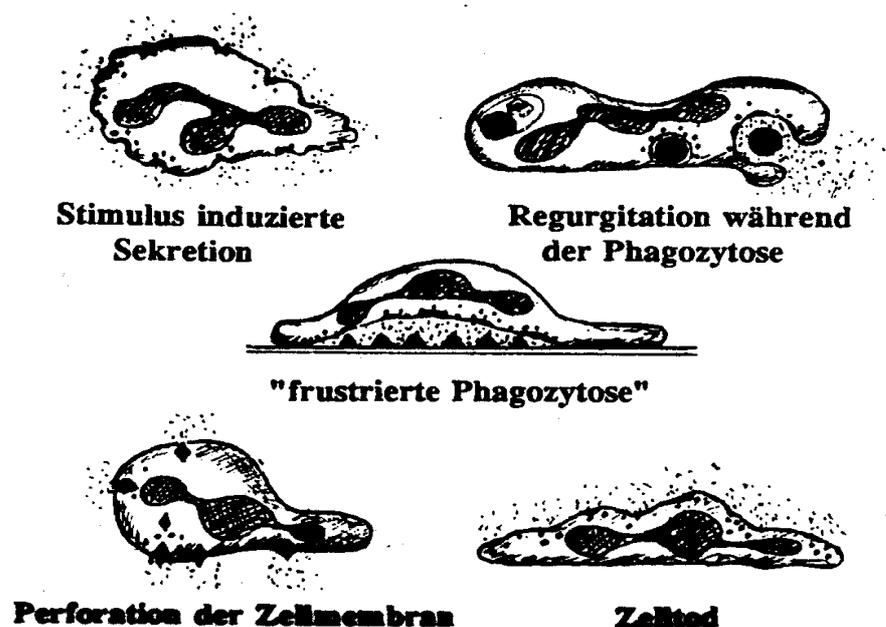
Die Freisetzung von PMNL-Proteinen kann durch verschiedene Faktoren bzw. Mechanismen ausgelöst werden (Abb. 3). Durch Zusatz von Formyl-Peptiden,

Komplementfaktoren etc. zu den Neutrophilen wird die Verschmelzung der Granula mit der Plasmamembran induziert (**Degranulation**) [Wright, 1988].

Bemerkenswert ist, daß dabei eine weitreichende Freisetzung der azurophilen Granula nur durch Zerstörung der Mikrofilamente [Bentwood, 1980], Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [Simochowitz et al., 1980] oder direkte Stimulierung der Proteinkinase C mit Phorbolestern [Kokot et al., 1987] erreicht werden kann.

Die Freisetzung von lysosomalen Proteinen in den extrazellulären Raum während der Phagozytose tritt besonders bei der Aufnahme zu großer oder einer zu großen Anzahl von Partikeln auf. Die Proteinfreisetzung beruht dabei wahrscheinlich auf dem unvollständigen Schluß des Phagosoms (**Regurgitation**) [Hoffstein, 1980].

Abb.3 *Mechanismen der Proteinfreisetzung durch PMNL*



Die Beschichtung von großen, durch die PMNL nicht zu phagozytierenden Substraten mit stimulierenden Obsoninen (z.B. IgG) führt zur Proteinfreisetzung der Zellen durch sog. "**frustrierte Phagozytose**" [Henson, 1971]. Auch beim **Zelltod** oder der **Perforation der Zellmembran** nach Aufnahme von z.B. Uratkristallen führt zur Freisetzung leukozytärer Proteine [Goetzl & Goldstein, 1985 / Olson & Venge, 1980].

2.2.2. Granula der neutrophilen Granulozyten

Die Protein/Enzym speichernden Granula der PMNL sind lysosomale Strukturen mit einem Durchmesser von 20-500 nm, die schon während der Maturation der Granulozyten gebildet werden. Bretz und Baggiolini (1974) beschreiben zwei durch unterschiedliche Größe und Dichte sowie durch ihre Proteinausstattung zu unterscheidende Typen von Granula (Tab. 1): die größeren **azurophilen** oder **primären** und die kleineren **spezifischen** oder **sekundären** Granula.

Die azurophilen Granula werden im Stadium der Promyelozyte, die spezifischen Granula im Reifungsstadium der Myelozyte gebildet [Baggiolini, 1980]. Als dritter und kleinster Granulatypus werden die **C-Partikel** oder **tertiären Granula** beschrieben [Dewald et al., 1982].

Tab. 1 *Proteinkompartimentierung neutrophiler Granulozyten*

primäre Granula (azurophile)	sekundäre Granula (spezifische)	tertiäre Granula (C-Partikel)
neutrale Proteinasen Elastase Kathepsin G	Typ-I-Kollagenase	Gelatinase
saure Proteinasen Kathepsin B Kathepsin H Kathepsin L	Vitamin-B ₁₂ -bindendes Protein	
β-Glucuronidase	Laktoferrin	
Arylsulfatase	Lysozym	
Lysozym	Histaminidase	
Myeloperoxidase		
Glykosaminoglykane		

(nach: Neumann & Lang, 1989)

Das Zytoplasma reifer neutrophiler Granulozyten ist angefüllt mit Granula, während andere Organellen wie Mitochondrien oder der Golgi-Apparat nur noch in geringer Anzahl vorkommen [Baggiolini, 1980].

Neuere Untersuchungen [Perez et al., 1987 / Damiano et al., 1988] zur Proteinverteilung

in den Granula deuten auf die Existenz von Subpopulationen der azurophilen bzw. spezifischen Granula hin, wobei zum Teil widersprüchliche Angaben in bezug auf die Kompartimentierung gemacht werden. So beschreiben Hibbs & Bainton (1989) eine 80%-ige Kolo-kalisation von Laktoferrin und Gelatinase in spezifischen Granula, Rice et al. (1986) dagegen eine weitreichende Vergesellschaftung von Myeloperoxidase und Laktoferrin in den azurophilen Granula.

Neben der Speicherung von Enzymen/Proteinen bilden die Granula einen intrazellulären Speicher für Adhäsions-vermittelnde Rezeptoren (CD11b/CD11c/CD18) [Lacal et al., 1988/ Singer et al., 1989] und GTP-bindende Proteine [Dexter et al., 1990].

2.2.2.1. Proteine/Enzyme der PMNL

Die in den Granula der Neutrophilen gespeicherten Proteine/Enzyme gehören verschiedenen Protein-/Enzymgruppen an und ermöglichen den Zellen ihr breites Funktionsspektrum. Nachfolgend sind die Charakteristika einiger Proteine/Enzyme aufgeführt; auf ihre Beteiligung bei pathologischen Erscheinungen wird unter 2.3. eingegangen.

Typ-I-Kollagenase (EC 3.4.24.7): leukozytäre Kollagenase ist eine Metalloproteinase mit Zn^{2+} im aktiven Zentrum; das pH-Optimum des Enzyms liegt bei 6 - 8.5, der Isoelektrische Punkt bei pH 5.8 .

Das Molekulargewicht latenter Kollagenase wird mit 70-85 kDa angegeben, das durch Trypsin, α -Chymotrypsin und Autoproteolyse aktivierte Enzym weist ein apparentes Molekulargewicht von 64 kDa auf [Knäuper et al., 1990 / Hasty et. al. 1990].

Kollagenase spaltet die interstitiellen Kollagentypen I, II, III, Fibronectin, Proteoglykan, sowie den Serin-Proteinaseinhibitor α_1 -P₁ ; gehemmt wird das Enzym durch die Komplexbildner (EGTA, EDTA etc.), TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) und verschiedene Tetrazycline. Von den PMNL wird die Typ-I-Kollagenase in ihrer latenten Form sezerniert, der in vivo Aktivierungsmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt.[Knäuper, 1989 / Docherty & Murphy, 1990].

Gelatinase (EC 3.4.24.-): die latente Form leukozytärer Gelatinase besteht aus einer Mischform mit den Molekulargewichten 98 kDa, 125 kDa und 220 kDa; das aktive Enzym weist eine Größe von 81-88 kDa auf. Wie die Kollagenase besitzt auch die Gelatinase Zn^{2+} im aktiven Zentrum und ist durch TIMP und Komplexbildner zu inhibieren. Aktiviert wird das Metalloenzym durch Serinproteinasen (Trypsin, α -Chymotrypsin, Cathepsin G) und eine durch Quecksilberverbindungen beschleunigte Autoproteolyse [Oberhoff, 1990 / Docherty & Murphy, 1990].

Aktive Gelatinase spaltet abgebauten Typ-I-Kollagen (Gelatin), Typ IV- und V-Kollagen, sowie die TC_A/TC_B -Fragmente des Typ-I-Kollagens. Auch die Gelatinase wird in der latenten Form von den Neutrophilen freigesetzt. [Oberhoff, 1990 / Murphy et al., 1981].

Elastase (EC 3.4.21.37): Die Serinproteinase Elastase besteht aus drei, durch unterschiedliche Glykosylierung zu unterscheidende Formen mit einem Molekulargewicht um 30 kDa [Watorek, 1990]. Die neutrale Protease besitzt im aktiven Zentrum die Aminosäurtriade (**Ser 195 / His 57 / Asp 102**) [Sinha et al., 1987]; ihr pH-Optimum liegt bei 8 - 8.5, der Isoelektrische Punkt wird mit pH 8.8 - 9.15 angegeben.

Das Enzym spaltet neben Aminosäuren, die kleine Alkylseitenketten besitzen [Bode et al., 1989] und entfaltet eine breite Spezifität in bezug auf biologische Substrate.

Neben Matrixbestandteilen wie Proteoglykan, Kollagen Typ III/IV und Elastin, werden auch IgG, IgM, Präalbumin, Komplementfaktoren (C5/C3), sowie die Plasma-Inhibitoren Antithrombin III und α_1 -PI von der Elastase gespalten [Neumann & Lang, 1989].

Inhibiert wird die Serinprotease durch die Plasmaproteine α_1 -PI und α_2 -Makroglobulin, aber auch durch synthetische Substanzen wie z.B. DFP (Diisopropylfluorophosphat) [Bode, 1988].

Myeloperoxidase (EC 1.11.1.7): die Peroxidase humaner PMNL ist eine Oxidase mit zwei **Häm-Gruppen** pro Molekül, das Molekulargewicht wird mit 118-150 kDa angegeben. Unter reduzierenden Bedingungen läßt sich das Enzym durch SDS-Page in eine größere (10-63 kDa) und eine kleinere (57-83 kDa) Untereinheit auftrennen; der Zuckeranteil des Enzyms beträgt 2.5 % [Harrison et al., 1977 / Bakkenist et al., 1978]. Das pH-Optimum (4.4 - 6.2) der Peroxidase liegt im sauren Bereich und ist abhängig von der H₂O₂ Konzentration [Hamers & Roos, 1985].

Die Myeloperoxidase katalysiert die Bildung zytotoxischer bzw. bakterizider Hypohalite (z.B. HCl⁻) aus Hydroxyperoxiden und Halidionen (Cl⁻, I⁻, Br⁻); gehemmt wird das Enzym durch Cyanide und Azid. In Anwesenheit von Hydroxyperoxiden und Chlorid-ionen (ohne ein weiteres Substrat) kommt es zur Autoaktivierung der Peroxidase, auch die Inaktivierung des Proteinaseinhibitors α₁-PI (bei pH 5.9 - 6.5) durch die Peroxidase wird beschrieben [Matheson et al., 1981].

Laktoferrin: Laktoferrin ist eine eisenbindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 77 kDa; pro Laktoferrinmolekül werden zwei Fe-Atome gebunden. Die Laktoferrinkonzentration in Säugermilch ist relativ hoch, im Blutserum finden sich nur geringe Mengen; PMNL speichern in ihren Granula große Mengen des Proteins. Über die Funktion von Laktoferrin ist wenig bekannt. Neben dem Einfluß auf die Granulozytopenese und einer beschleunigten Bildung extrem bakterizider/zytotoxischer Hydroxyradikale durch Fe³⁺-gesättigtes Laktoferrin, wird der Einfluß des Proteins auf die Anheftung von PMNL an das Endothel diskutiert [Neumann & Lang, 1989 / Adeyemi et al., 1988]. Auch soll der durch Laktoferrin vermittelte Fe-Entzug zur Abtötung von Bakterien beitragen [Thews et al., 1991].

2.2.3. Das Zytoskelett der PMNL

Das Zytoskelett bestimmt die Morphologie von Zellen, stabilisiert diese und ermöglicht alle dynamischen zellulären Prozesse (Migration, Phagozytose, Mitose etc.). Drei

2. Einleitung

Gruppen von Proteinen sind dabei zu unterscheiden: Die Mikrofilamente (5-7 nm), die Mikrotubuli (25 nm) und die sog. Intermediärfilamente (ca. 10 nm) [Weber & Osborn, 1985].

Die **Mikrofilamente** (F-Aktin) - doppel-helikale Strukturen aus globulären 42 kDa Aktineinheiten - bilden zusammen mit einer Reihe von assoziierten Proteinen (Myosin, α -Aktinin, Gelsolin, Fodrin, Profilin etc.) ein äußerst dynamisches System. Dieses ist wesentlich an zellulären Vorgängen wie Anheftung, Kontraktion und Lokomotion etc. beteiligt. **Mikrotubuli** sind röhrenförmige, aus sog. Protofilamenten bestehende Strukturen; die Protofilamente sind aus Tubulindimeren (100 kDa) aufgebaut. Zusammen mit einer Vielzahl assoziierter Proteine sind die Mikrotubuli an der Organisation zellulärer Prozesse (Mitose, Vesikeltransport etc.) beteiligt [Olmsted, 1986]. Das Vorkommen und der Aufbau von **Intermediärfilamenten** ist gewebespezifisch. Diese Filamente dienen vor allem der Druck- und Zugfestigkeit von Zellen [Alberts et al., 1989].

Auch die zahlreichen Funktionen der PMNL stehen in Zusammenhang mit der Organisation des Zytoskeletts bzw. seiner raschen Reorganisation.

In unstimulierten PMNL liegen 60 % - 70 % des Aktins als G-Aktin vor [Deverotes & Zigmond, 1988]. Nach Stimulierung der neutrophilen Granulozyten mit Chemotaxinen wird eine rasch einsetzende (nach 10-15 sec) Aktinpolymerisation, gefolgt von einer Depolymerisationsphase, beobachtet [White et al., 1983]. Dabei ist die initiale Aktin-Polymerisation im Gegensatz zur Depolymerisationsphase Ca^{2+} unabhängig [Omann et al., 1987]. Die hoch motilen PMNL besitzen nicht -wie viele andere Zelltypen- sog. "stress fibers", aus F-Aktin aufgebaute Filamentbündel die den Zellen eine gewisse Spannung verleihen, sondern sie weisen im unpolarierten Zustand ein cortikales F-Aktinnetzwerk auf [Boyles & Bainton, 1979 / Cassimeris et al., 1990]. Bei Polarisierung bzw. Migration der Neutrophilen ist in der Frontlamelle eine Konzentration von Aktin, Myosin und anderen Aktin-bindenden zu beobachten [Valerius et al., 1981 / Devreotes & Zigmond, 1988].

Beim Übergang vom unpolarierten Zustand zur durch FMLP-induzierten Polarisierung

der Zellen werden von Watts et al. (1991) zwei Übergangsstadien beschrieben: ein **"round-ruffled-shape"** Stadium und ein **"round-blebbed-shape"** Stadium. Dabei bestimmt das Ausmaß der initialen Aktinpolymerisation nach Stimuluszugabe, ob die Zellen sich polarisieren, oder im "blebbed-shape" Stadium verbleiben.

Die Behandlung von Zellen mit Cytochalasin B, einem Pilzmetaboliten, führt konzentrationsabhängig zur Blockierung der + -Enden der Aktinfilamente (für G-Aktin hoch-affine Enden) und somit zu deren Depolymerisation [Cooper, 1987].

Auch die Mikrotubuli der Neutrophilen werden durch Stimuluszugabe beeinflusst, es kommt dabei zu einer Neubildung von Mikrotubuli und zur Verlängerung vorhandener Strukturen [Omann et al., 1987 / Anderson et al., 1982]. Weiterhin kann durch Stimulierung (FMLP) eine vermehrte Bildung von Granula-Mikrotubuli-Komplexen induziert werden [Rothwell et al., 1989].

Die Veränderung bzw. Inhibierung von Morphologie, Chemotaxis, Sekretion sowie der Phagozytose neutrophiler Granulozyten durch Zusatz von Zytoskelett-zerstörenden bzw. beeinflussenden Agentien (Erhöhung der Ca^{2+} _{intrazell.}-Konzentration, Nocodazol, Cytochalasine, Colcemid etc.) belegt die entscheidende Rolle des Zytoskeletts bei allen Funktionen der Zellen [Hoffstein, 1980 / Roschger et al., 1990].

2.2.4. Intrazelluläre Signaltransduktion der Granulozyten

Die Stimulierung der PMNL mit einer bestimmten Konzentration eines Agens kann selektiv nur einige Funktionen der Zellen induzieren; so liegt die optimale Konzentration des Formyl-Peptids FMLP für die sog. **"frühen Antworten"** (leichte Adhäsion/Polarisierung/Chemotaxis) bei $10^{-10}M$ - $10^{-8}M$, dagegen werden die sog. **"späten Antworten"** (Degranulation/"respiratory burst"/starke Adhäsion) erst bei einer Konzentration von $10^{-7}M$ in weitem Umfang induziert [Lackie, 1988]. Auch können sich zwei Stimulantien in ihrer Wirkung potenzieren [Aaku et al., 1990].

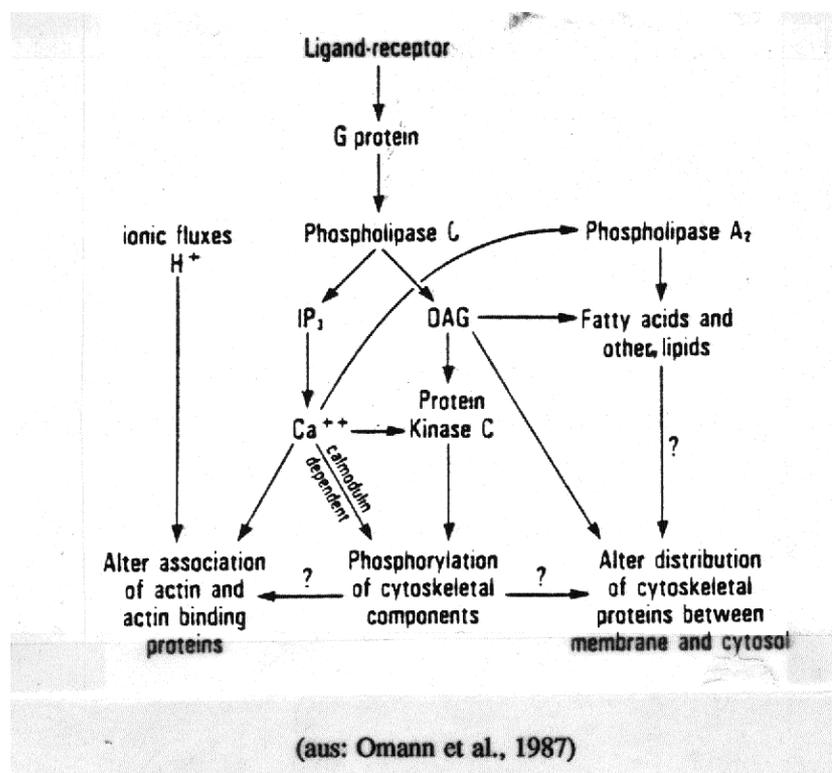
Zwischen der Bindung eines Agens an einen Rezeptor und der dadurch hervorgerufenen

2. Einleitung

"Antwort" der Zellen (Chemotaxis, Degranulation etc.) vermittelt die sog. **intrazelluläre Signaltransduktion**: durch ein komplexes Zusammenspiel von Protein-/Enzym- Aktivierungen und Inaktivierungen werden eine Reihe von intrazellulären Botenstoffen, sog. "**second messengers**", (cAMP, Ca^{2+} , DAG, IP_3 etc.) gebildet, die wiederum Kinasen und andere Proteine aktivieren bzw. beeinflussen.

Die Intrazelluläre Signaltransduktion neutrophiler Granulozyten umfaßt zum einen die Bildung von **cAMP** aus ATP durch eine Adenylatcyclase, zum anderen die Freisetzung von **Diacylglycerin (DAG)** und **Inositoltriphosphat (IP_3)** aus Membran-Phospholipiden durch die **Phospholipase C (PLC)**. Zwischen Ligand-induzierter Konforma-tionsänderung des Rezeptors und der Aktivierung der Adenylatzyklase und Phospholipase C vermitteln GTP-spaltende, z.T. Rezeptor-regulierende Proteine (**G-Proteine**) [Omann et al., 1987].

Abb. 4 Intrazelluläre Signaltransduktion neutrophiler Granulozyten



2. Einleitung

Über die Aktivierung von Kinasen durch Diacylglycerin (**Proteinkinase C/PKC**) und cAMP (**A-Kinasen**) werden durch Phosphorylierung weitere Enzyme und Zytoskelett-assoziierte Proteine aktiviert bzw. verändert. Die durch IP₃ induzierte Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels (Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speicherpools) hat die Umgestaltung von Zytoskelettstrukturen (z.B. Aktin-Depolymerisation) verbunden mit der Aktivierung verschiedener Ca²⁺-abhängiger Kinasen/Proteine (Calmodulin, Fodrin, Gelsolin, Proteinkinase C) zu Folge [Berridge, 1985 / Berridge & Weeds, 1986].

Für eine optimale Induzierung der "respiratory burst reaction" und der Degranulation ist sowohl die Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels als auch die Aktivierung der Proteinkinase C erforderlich. Die beschriebene initiale Aktinpolymerisation nach FMLP-Stimulierung ist nicht wie die darauffolgende Depolymerisation und weitere Reorganisation der Mikrofilamente Ca²⁺-abhängig [Omann et al., 1987].

Die anfängliche Aktinpolymerisation ist mit einem kurzzeitigen cAMP_{intrazell.}-Anstieg verbunden [Nourshargh & Houtl, 1986]. Bei einer weiterer, bzw. länger andauernden Erhöhung des cAMP_{intrazell.}-Spiegels wird die Degranulation der Neutrophilen gehemmt.

Weiterhin bedingt die Stimulierung der PMNL die Aktivierung einer **Phospholipase A₂ (PLA₂)**, die aus Phospholipiden Arachidonsäure und Lysophosphatide freisetzt [Tao et al., 1989]. Aus Arachidonsäuren werden im sog. Lipoxygenase- und Cyclooxygenaseweg Leukotriene sowie Thromboxane und Prostaglandine gebildet, die nach ihrer Freisetzung als Entzündungsmediatoren wiederum die Funktionen der PMNL und anderer Zellen "triggern" [Kaplan & Silverberg, 1988 / Bauldry et al., 1988].

Lysophosphatide können die Membranfluidität beeinflussen und die Aktivität der Proteinkinase C inhibieren [Lackie, 1988].

Die "frühen Antworten" der PMNL werden auf die Aktivierung von PLA₂, die "späten Antworten" vor allem auf die Aktivierung der PLC zurückgeführt [Lackie, 1988]. So ruft z.B. die direkte Stimulierung der PKC mit PMA eine Inhibierung der FMLP/PAF-

induzierten Arachidonsäurefreisetzung hervor [Tao et al., 1989].

2.3. Rolle der PMNL bei pathologischen Erscheinungen

Die Enzyme neutrophiler Granulozyten und die von ihnen produzierten toxischen Sauerstoffmetabolite sind für eine Reihe von pathologischen Erscheinungen mitverantwortlich.

Störungen in der Bildung von Entzündungsmediatoren sowie das Auftreten großer Mengen bakterieller Toxine können zu einer verstärkten Einwanderung von PMNL in bestimmte Körperbereiche und zu einer übermäßigen Stimulierung der Zellen führen. So wird als eine Ursache für die Zerstörung von Lungengewebe beim Lungenemphysem eine erhöhte Elastaseaktivität, wahrscheinlich verbunden mit einer Inhibierung von α_1 -P₁ u.a. durch Metabolite der "respiratory burst reaction" angenommen [Bonney & Smith, 1986 / Janoff, 1988].

Auch das septischen Krankheitsbild (Polytrauma etc.) ist durch einen Anstieg des Verhältnisses von Elastase/ α_1 -PI im Blutserum gekennzeichnet. Der Abbau von Bindegewebsproteinen, Komplementfaktoren und Immunglobulinen etc. durch die Serinproteinasen kann zu einer weiteren Stimulierung von PMNL und Makrophagen etc. und damit zur Verstärkung des Entzündungsgeschehens führen [Fink et al., 1988 / Pschyrembel 1989].

Neutrophile Granulozyten aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigen eine veränderte Chemotaxis und Phagozytose [Goetzl & Goldstein, 1985]. Die Schädigung von Knorpelgewebe bei diesem Krankheitsbild wird u.a. auf die verstärkte Einwanderung von PMNL in das betroffene Gewebe in Zusammenhang mit der Sekretion und Aktivierung von Gelatinase und Typ-I-Kollagenase zurückgeführt [Knäuper, 1989]. Auch die Elastase ist an der Zerstörung von Knorpel- und Matrixgewebe beteiligt [Schalkwijk et al., 1988 / Mohr et al., 1981].

Die übermäßige Freisetzung und Produktion zytotoxischer Sauerstoffmetabolite durch Neutrophile führt zur weitreichenden Schädigung umliegender Gewebe und Zellen sowie zur Inaktivierung von Proteinaseinhibitoren (siehe **2.2.1.3.**) [Hamers & Roos, 1985]. Neben einer verstärkten Aktivierung der PMNL führen auch Verlust oder Einschränkung von PMNL-Funktionen zu pathologischen Erscheinungen, wie z.B. zu einer stark erhöhten Anfälligkeit für Infektionskrankheiten [Neumann & Lang, 1989].

2.4. Zielsetzung

Diese Arbeit stellt eine Fortsetzung der im Projekt B7 des SFB 223 "Pathophysiologie zellulärer Wechselwirkungen" begonnenen Untersuchungen zur Proteinfreisetzung humaner neutrophiler Granulozyten dar.

Zielsetzung der dargestellten Experimente war es, die bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärte Kompartimentierung leukozytärer Proteine/Enzyme zu untersuchen. Die durch Stimulierung der Zellen mit verschiedenen Agentien hervorgerufenen Sekretionsmuster von PMNL-Proteinen sollten Aufschluß über die Proteinverteilung in den unterschiedlichen Granulatypen geben. Dabei sollte die Konzentration einer möglichst großen Anzahl von Proteinen im selben Überstand stimulierter Zellen bestimmt werden, um eine optimale Vergleichbarkeit in bezug auf ihre Freisetzung bzw. Kompartimentierung zu erreichen.

Es wurden die Sekretionsmuster der Proteine/Enzyme Elastase, Myeloperoxidase, Typ-I-Kollagenase, Gelatinase und Laktoferrin aufgenommen, deren noch nicht vollständig geklärte Kompartimentierung alle drei bisher beschriebenen Granulatypen mit einbezieht. Um die Sekretionsmuster der untersuchten Proteine unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu erhalten und zu vergleichen, wurden sowohl lösliche körpereigene und bakterielle als auch partikuläre Stimulantien eingesetzt.

Da eine weitreichende Freisetzung azurophiler Granula bisher nur nach Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} - Spiegels, Mikrofilamentzerstörung etc. [Hoffstein, 1980 / Kokot et al., 1987] erreicht werden konnte, sollte im besonderen die Beteiligung des Zytoskeletts an der Freisetzung der Granula unter Einsatz der Mikrofilament- bzw. Mikrotubuli- zerstörenden Agentien Cytochalasin B bzw. Colcemid untersucht werden. Auch mögliche Unterschiede im Sekretionsmuster der genannten Proteine nach Eingriff in die intrazelluläre Signaltransduktion wurden untersucht.

Eine weitreichende Freisetzung der den azurophilen Granula zugeordneten Protease Elastase kann, wie erwähnt, ohne Zusatz von Mikrofilament-zerstörenden Agentien oder Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nicht erreicht werden, jedoch finden sich bei einer Reihe von pathologischen Erscheinungen (z.B. Sepsis) große Mengen des Enzyms im Blutserum [Fink et al., 1988]. Untersuchungen zur Sekretion

2. Einleitung

der Elastase bzw. ihrer drei Formen sollten klären, ob nur bestimmte oder alle Elastasetypen von den PMNL unter den gegebenen Testbedingungen sezerniert werden.

Bei den durchgeführten Sekretionsexperimenten sollte besonders darauf geachtet werden, möglichst gleichbleibende experimentelle Bedingungen einzuhalten, um einen durch unterschiedliche Behandlung der Zellen hervorgerufenen Einfluß auf die Freisetzung der Proteine zu vermeiden [Schmitt et al., 1986]

3. Material und Methoden

3.1. Biochemische Methoden

3.1.1. Isolierung der PMNL aus humanem Vollblut

Zur Isolierung neutrophiler Granulozyten aus frischem, heparinisierten Humanblut wurde eine nach Böyum (1976) und Schmitt (1986) modifizierte Methode angewendet. Folgende Arbeitsschritte wurden dabei durchgeführt:

- zur Sedimentation der Erythrozyten wurde ein Methocel/Ultravist-Gemisch mit der doppelten Menge an Vollblut überschichtet; die Sedimentationsdauer betrug ca. 40-80 Minuten
- der sich bildende, weitgehend von Erythrozyten befreite Überstand wurde auf die gleiche Menge Histopaque 1077 gegeben und für 40 Minuten bei 1200 rpm (Hettich Universal 2S-Zentrifuge) in dem diskontinuierlichen Gradienten zentrifugiert (in 50 ml Zentrifugenröhrchen)
- nach dieser Zentrifugation wurde der Überstand (Blutserum und mononukleäre Zellen) verworfen und das Granulozyten-Sediment einer zweifachen hypotonen Lyse unterzogen, um verbliebene Erythrozyten zu entfernen.
- das Sediment wurde, je nach Sedimentgröße und gewünschter Zellzahl, in 5-15 ml DPBS-Puffer resuspendiert.

Die Blutaufarbeitung sowie alle folgenden Arbeitsschritten wurden unter sterilen Bedingungen und in Plastikgefäßen bzw. silikonisierten Glasgefäßen durchgeführt, um eine Stimulierung der PMNL und die starke Anheftung der Zellen an Glasoberflächen zu verhindern [Chenoweth et al. , 1977].

3. Material und Methoden

Hypotone Lyse:

Um das Granulozyten-Sediment ganz von Erythrozyten zu befreien, wurde das Sediment für 30-40 sec in 0.2 %iger NaCl-Lösung resuspendiert, danach erfolgte die Zugabe von 1.6 %iger NaCl-Lösung. Eine Zentrifugation für 6-10 Minuten bei 1200 rpm schloß sich an.

Puffer / Reagenzien:

- CMF-PBS (pH 7.3):
 - 0.14 M NaCl
 - 0.0027 M KCl
 - 0.0080 M Na₂HPO₄ · 2 H₂O
 - 0.0015 M K₂HPO₄

- PBS (pH 7.3):
 - CMF-PBS +
 - 0.50 mM MgCl₂ · 6 H₂O
 - 0.90 mM CaCl₂ · 2 H₂O

- DPBS (pH 7.3):
 - PBS + 0.1% Glucose

- Methocel (Sigma):
 - Methylzellulose
- Ultravist 370 (Schering):
 - Röntgenkontrastmittel mit 370 mg Jod/ml
- Methocel/Ultravist:
 - ein Gemisch aus 18,65 % Ultravist + 1.45 % Methocel in H₂O_{bidest}.
- Histopaque 1077 (Sigma):
 - enthält Ficoll 400 und Natrium-Metrizoat (Dichte: 1.077 g/ml)
- Ficoll 400:
 - Kopolymer aus Sucrose und Epichlorhydrin

3.1.2. Bestimmung der Zellzahl und Lebendrate der PMNL

Nach Verdünnung der Zellsuspension mit Türkslösung (1:20 in einer Leukozyten-Mischpipette) wurde die Zellzahl / ml Suspension durch Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt [Rick 1977]. Durch Anfärbung der Kerne mittels Türkslösung wird die mikroskopische Auszählung der sonst im Lichtmikroskop farblos erscheinenden Zellen ermöglicht.

Die Bestimmung der Lebendrate erfolgte durch Zugabe von Tryphanblau-Lösung zu den PMNL (1:20) und anschließender Auszählung abgestorbener, im Kernbereich blau gefärbter Zellen [Metcalf et al. 1986].

Reagenzien:

Türkslösung (Serva): 0.01 % Gentianaviolett + 1 % Essigsäure in H₂O bidest.
Tryphanblau-Lösung: 0.5 % Tryphanblau (Serva) in 0.85 % NaCl-Lösung

3.1.3. Fixierung der Zellen und Erstellen eines Differenzialblutbildes

Zur Erstellung eines Differenzialblutbildes wurden Vollblutausstriche nach Pappenheim [Rick, 1977] gefärbt. Bei dieser panoptischen Färbung ermöglicht die unterschiedliche Anfärbbarkeit von Zytoplasma- und Kernstrukturen eine gute Differenzierung von Blutzellen [Burck, 1981].

Pappenheimfärbung:

May-Grünwaldlösung (Merck): enthält eosinsaures Methylenblau in Methanol/Glycin;
Färbung der Blutausstriche mit dieser Lösung 3 min.

Giemsa-Lösung (Merck): enthält Azur II und eosinsaures Azur II in Methanol/Glycin;
Färbung der Ausstriche für 15 min mit einer 1:20 verdünnten Giemsa-Gebrauchslösung.

Die Fixierung der PMNL (z.B. für Lichtmikroskopie) erfolgte durch Zugabe von 3 %-iger Formaldehydlösung für 5-10 min oder durch Behandlung mit 90 %-igem Methanol für 60 sec. Danach wurden die Präparate mit CMF-PBS gewaschen und in Mowiol eingebettet.

Reagenzien:

Formaldehyd-Lösung: 3% Paraformaldehyd (Serva) in CMF-PBS.

Mowiol 4.88 (Hoechst): enthält Polyethylenglycol und Glycerin in Puffer.

3.1.4. Aufschluß der Zellen und Zerstörung der Granulamembranen

Zur Bestimmung des Enzym-/Proteingehaltes neutrophiler Granulozyten und der Granulaverteilung mußten die Zell- sowie Granulamembranen zerstört werden. Dies erfolgte durch Behandlung mit Ultraschall und der Zugabe von Detergenz.

Zerstörung der Zellmembranen:

- Ultraschall- Behandlung der Stufe 4-5 für 7-12 sec (Mikrotip).

Zerstörung der Granulamembranen:

- Der ersten Ultraschall-Behandlung folgte der Zusatz von 0.5 % Triton-X-100 für 30-60 min bei 4°C (mehrmaliges vortexen); eine zweite, stärkere Ultraschall-Behandlung der Stufe 5-6 // 50 % Pulse // 20-30 sec (danach mehrmals vortexen) schloß sich an.

Dabei mußte die Stärke bzw. Dauer des Ultraschalls je nach Beschaffenheit des Gefäßes, in dem die Behandlung durchgeführt wurde, und je nach Alter der Teflonspitze des Mikrotips variiert werden.

Geräte / Reagenzien:

Mikrotip eines Branson Cell Disrupter

Triton-X-100 (Serva / Sigma): t-(Octylphenoxy-poly-ethoxyethanol)

3.1.5. Abtrennung von Zellen und Zellkomponenten mittels Zentrifugation

Nach Durchführung der Sekretionsexperimente wurden die Zellüberstände durch Zentrifugation (5 min / 800 g // Heraeus Biofuge A) von nicht angehefteten PMNL befreit. Zur Trennung von Zytoskelett-assoziierten und löslichen, cytosolischen Komponenten wurden die Zell-Lysate für 10-15 min bei 2200 g zentrifugiert; Granula und unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 14.000 g (30-45 min) abgetrennt [De Duve, 1975/ Williams & Wilson, 1984].

3.1.6. Durchführung der Sekretionsexperimente

Zur Durchführung der Sekretionsexperimente wurde die Leukozytensuspension auf 5×10^6 PMNL / 1 ml bzw. 0.99 ml eingestellt und zum langsamen Erwärmen für 20 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Vorinkubationszeit (in Suspension) wurde den Zellen, je nach Versuchsdurchführung, 5 - 10 µl Agens zugesetzt (Kontroll-Zellen blieben ohne Zusatz). Danach wurden 1 ml bzw. 0.990 ml Portionen der Zellsuspension in vorgewärmte Gewebekulturschalen überführt und für die jeweils angegebenen Zeiträume mit 5 - 10 µl Agens (z.B. FNLPNTL) behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände (nach vorsichtigem "Abspülen" der Zellen) abgenommen und die nicht angehefteten PMNL, wie unter **3.1.5.** beschrieben, aus dem Überstand entfernt.

Bei den Versuchen zur Phagozytose wurde die Zellzahl auf 4×10^6 PMNL/ml eingestellt .

3.1.7. Bestimmung der Zahl nicht angehefteter PMNL

Bei einigen Sekretionsexperimenten wurde die Adhäsionsrate der Zellen bestimmt, dazu wurde das Zellpellet nach Zentrifugation des Überstandes (siehe 3.1.5.) in 50 - 100 µl DPBS aufgenommen und die PMNL in der Neubauerkammer (siehe 3.1.2.) ausgezählt.

3.1.8. Zur Stimulierung/Behandlung der PMNL verwendete Agentien

Cytochalasin B (Sigma): ein Metabolit des Pilzes *Helminthosporium dematoideum*;
Konzentration im Test 5 µg/ml // gelöst in DMSO.

Cytochalasin D (Sigma): ein Metabolit des Pilzes *Zygosporium mansonii*;
Konzentration im Test 5 µg/ml // gelöst in DMSO.

Colcemid (Sigma): Demecolcin (N-deacetyl-N-methyl Colchicin) modifiziertes
Alkaloid der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*);
Konzentration im Test 5 µg/ml // gelöst in DMSO.

FNLPNLT (Sigma): Formyl-Norleucyl-Leucyl-Phenylalanyl-Norleucyl-Thyrosyl-
Leucin, ein synthetisches Formyl-Peptid ;
Konzentration in Test 10^{-7} M // gelöst in DMSO/CMF-PBS.

Prostaglandin F_{2α} (Sigma): humanes Gewebshormon;
Konzentration im Test 10^{-6} M // gelöst in CMF-PBS.

Leucin-Enkephalin (Bachem AG): ein humanes Opiat;
Konzentration im Test $1 - 2.4 \times 10^{-9}$ M // gelöst in CMF-PBS.

Zymosan-Partikel (Sigma): Hefen des Spezies *Saccharomyces cerevisiae*;

Konzentration im Test $80 \mu\text{l/ml} = 2.4 \times 10^7$ Partikel // in DPBS.

Präparation des Zymosans:

Die Zymosan-Partikel wurden 3 x mit PBS bei 4°C gewaschen, durch eine 1:10 Verdünnung auf $6.25 \text{ g/ml} = 3 \times 10^8$ Partikel/ml eingestellt und anschließend nochmals 3 x mit DPBS gewaschen. Die Opsonierung des Zymosans erfolgte durch Inkubation mit DPBS (7 Teile) und humanem Blutserum (3 Teile) für 10 min bei 25°C ; anschließend wurde das opsonierte Zymosan, wie oben beschrieben, 3 x mit DPBS gewaschen [Metcalf, 1986].

Zardaverin (Byk Gulden Pharmaceuticals): synthetischer Inhibitor der Phospho-

-diesterase; Konzentration im Test 10^{-5} M (10^{-9} M , 10^{-8} M , 10^{-7} M)

// gelöst in CMF-PBS + NaOH.

Alle Lösungen und Substanzen wurden mit sterilem Puffer angesetzt und bei -20°C aufbewahrt.

3.1.9. Messung der Elastasekonzentration

Die Bestimmung der Elastasekonzentration in Zellüberständen/-lysaten erfolgte überwiegend in einem photometrischen Test [Nakajima et al., 1979]. Dabei wurde als Enzymsubstrat Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-Nitroanilid eingesetzt, so daß die Elastaseaktivität durch Abspaltung des Nitroanilins als Extinktionszunahme bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ verfolgt werden konnte. Die Enzymtestlösung wurde vor dem Start der Reaktion mit dem Substrat für 10-20 min bei 25°C inkubiert. Die kinetische Messung erfolgte in vier Durchläufen a 30 sec, wobei bei jedem Durchlauf ein Blindwert mitgeführt wurde.

Enzymtestlösung

in 1 ml-Küvetten:

400 - 500 μ l Testpuffer

70 - 150 μ l Zellüberstand/-lysate

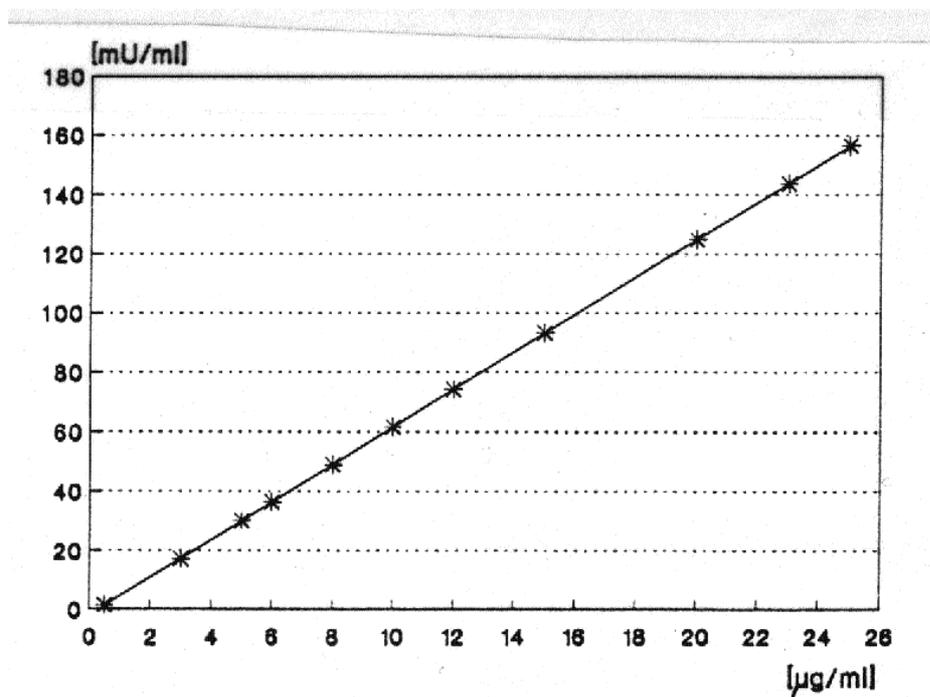
400 - 500 μ l Tensidlösung

50 - 70 μ l Substrat (im Test 0.05 - 0.07 mM)

Zur Angabe der Elastasekonzentration in [μ g/ml] wurde eine Eichreihe erstellt (Abb. 5), wobei leukozytäre Elastase aus humanem Sputum als Standard diente. In dem oben beschriebenen Testverfahren wurden die Extinktionswerte im Bereich von 0.5 - 25 μ g/ml (n= 7-11) bestimmt.

Abb. 5

Elastase-Eichreihe



Puffer / Reagenzien:

Testpuffer (pH 8.0) 0.2 M Triethanolamin
1.0 M NaCl
0.02 % NaN₃

Tensidlösung (pH 8.0) : Testpuffer + 0.2% Benzalkoniumchlorid (Serva)

Enzymsubstrat : Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-para-Nitroanilid (Sigma);
0.588 mg / ml DMSO

Enzymstandard: Lyophilisat leukozytärer Elastase aus humanem Sputum
(salzfrei); (Elastin Products Inc.)

Photometer/Rechner: Eppendorf-Photometer 1101 M mit angeschlossenem
Rechner/CKE 6455

3.1.10. Messung der Myeloperoxidasekonzentration

Ebenfalls in einem photometrischen Test wurde in Zellüberständen/-lysaten die Peroxidasekonzentration ermittelt [Püttner & Becker, 1983]. Zum Nachweis der Myeloperoxidase wurde das Substrat 2,2-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin)-sulfonsäure in einer Redoxreaktion umgesetzt; die Extinktionszunahme wurde bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ / 37°C mittels Photometer (4 Durchläufe a. 30 sec) verfolgt. Durch Zugabe der Substratlösung wurde die Reaktion gestartet, nachdem die gesamte Enzymtestlösung ca. 30 min bei 37°C inkubiert worden war.

Enzymtestlösung

in 1ml Küvetten:

800 - 870 μ l Testpuffer

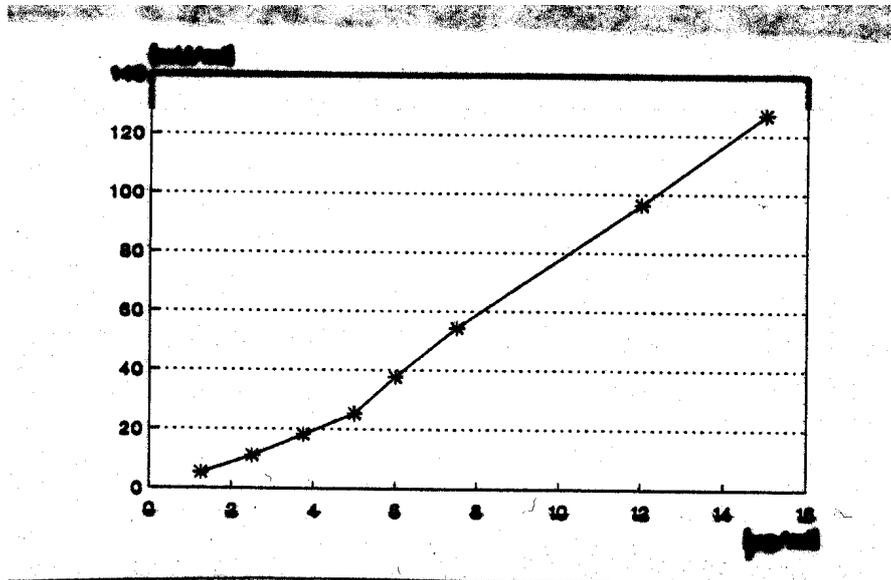
100 μ l Substratlösung

30 - 100 μ l Zellüberstand/-lysate

Auch eine Myeloperoxidase-Eichreihe mit leukozytärer Peroxidase aus humanem Sputum wurde erstellt (Abb. 6). Nach dem oben beschriebenen Messverfahren wurden die Extinktionswerte im Bereich von 1.25 - 15 μ g / ml (n= 9-16) aufgenommen.

Abb. 6

Myeloperoxidase-Eichreihe



Puffer / Reagenzien:

Testpuffer (pH 5.6): 83 mM Citronensäuremonohydrat
 112 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Enzymsubstratlösung: 2,2-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin)-sulfonsäure (Sigma);
gelöst in Testpuffer; im Test: 0.91 nM ABTS +
0.125 µl 30 % H₂O₂ / ml Testansatz .

Enzymstandard: Leukocytäre Myeloperoxidase aus humanem Sputum, chroma-
tophisch gereinigt (Elastin Products Inc.).

Photometer/Rechner: siehe **3.1.9.**

3.1.11. Behandlung von Gesamtextrakten/PMNL mit 1 M NaCl

Um zu überprüfen, ob ein Teil der Elastase nach der Sezernierung an der Membran bzw. den Membranstrukturen haften bleibt, wurde das Sediment von Gesamtextrakten und CB/FNLPNTL-behandelte Zellen mit PBS/NaCl behandelt [Watorek, 1990].

NaCl-Behandlung von Gesamtextrakten: nach Aufschluß der Zellen (5×10^6 PMNL/ml) durch Ultraschall und Detergenz-Behandlung (siehe **3.1.4.**) wurde der Zellextrakt für 30 min bei 14.000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und auf das Pellet (P 1) für 8-10 min bei 4°C 300 µl PBS/NaCl gegeben und mehrfach gevortext. Nach Zugabe von 700 µl DPBS (vortexen) schloß sich eine weitere Zentrifugation (15 min / 14.000 g) an, der Überstand wurde gesammelt und das Pellet (P 2) in 50 - 100 µl DPBS aufgenommen. Die gesammelten Überstände bzw. das zweite Pellet wurden in den unter **3.1.9.** und **3.1.10.** beschriebenen photometrischen Tests auf ihren Gehalt an Elastase bzw. Myeloperoxidase untersucht. Zum Vergleich wurde der Gehalt der beiden Enzyme in Zell-Lysaten der jeweils selben Spender ohne vorhergehende Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile bestimmt.

Behandlung CB/FNLPNTL-stimulierter PMNL: 5×10^5 PMNL wurden mit/ohne CB und FNLPNTL behandelt, nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen (Ü 1), die Zellen 1 x mit vorgewärmten DPBS gewaschen und für 5-6 min mit DPBS/NaCl behandelt (Ü 2). Beide Überstände wurden nach Zentrifugation auf ihren Elastase-Gehalt untersucht (siehe **3.1.9.** und **3.2.1.**).

Puffer / Reagenzien:

PBS/NaCl: PBS mit 1 M NaCl

DPBS/NaCl: DPBS mit 1 M NaCl

3.1.12. Nachweis von Elastase mittels SDS-PAGE

Zur Gewinnung von Elastase aus Überständen wurden $1 - 1.6 \times 10^8$ PMNL in Suspension mit Cytochalasin B ($5 \mu\text{g/ml}$) vorinkubiert und dann in großen Gewebekulturschalen für 15 min mit CB ($5 \mu\text{g/ml}$) / FNLPNTL (10^{-7} M) behandelt. Der Überstand der Zellen wurde in Millipore Ultrafree-MC Röhrchen durch Zentrifugation bei 3200 g auf 120-650 μl eingengt.

Um die angehefteten Zellen vom Boden der Kulturschale zu lösen, wurden 3 ml PBS/NaCl + 1 % Triton-X-100 aufgegeben und die Zellen dann bei -20°C eingefroren.

Der Aufschluß der Zellen und Granula erfolgte durch zweifachen Ultraschall (Stufe 5.3 // 50 % Pulse // 30 sec); nach Zentrifugation (13.000 g / 30 min) wurde das Lysat, wie oben beschrieben, auf 200 - 600 μl eingengt. Die Gesamtextrakte wurden, wie unter **3.1.4.** beschrieben, aus $2 - 6.6 \times 10^7$ PMNL (in PBS/NaCl) gewonnen und auf 110-640 μl eingengt.

3. Material und Methoden

Substrat-Gelelektrophorese: Proben (20 µl) von Zell-Lysaten etc. wurden mit je 2 µl SDS-Lösung + etwas Saccharose versetzt und auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel + 0.2-0.4 % Gelatin aufgetragen (je 4-16 µl). Der elektrophoretische Lauf erfolgte bei 20-40 mA pro Gel (unter Kühlung). Danach wurde durch Waschen der Gele mit Elastase-Puffer + 2.5 % Triton-X-100 (2 x 20 min) das SDS entfernt und die Gele in Tensidlösung bei 37°C 15-70 Stunden inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Proteine im Gel mittels Entfärber (10-15 min) gefällt, die Gele in H₂O_{bidest.} gewaschen und mit Coomassieblue-Lösung gefärbt. Dannach wurden die Acrylamidgele solange mit Entfärber behandelt, bis die durch proteolytische Aktivität der Elastase Protein-freien Banden im blau gefärbten Gelatin-Gel gut sichtbar waren [Hibbs et al.,1985].

Silberfärbung: 20 µl der eingeeengten Probe wurden mit 4 µl SDS-Lösung versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden die Gele 2 x mit 10 %-igem Ethanol (10 min) und 2 min mit "Farmers reducer" behandelt. Nach mehrmaligem Waschen mit H₂O_{bidest.} erfolgte eine Inkubation mit 0.1 %-iger Silbernitratlösung für 30 min. "Entwickelt" wurden die Gele mit 2.5 %-iger Natriumcarbonatlösung + 30 % Formaldehyd [Damerval et al., 1987].

Puffer/Reagenzien:

Gelatin: aus Typ-I-Kollagen (Rind-/Kalbshaut) durch Aufkochen (1-3 x) gewonnen; das Kollagen wurde gelöst in Kollagen-Puffer:

0.10 M Tris/HCl

0.01 M CaCl₂

0.30 M NaCl

Elastasepuffer / Tensidlösung: siehe **3.1.9.**

3. Material und Methoden

PBS/NaCl:	siehe 3.1.11.	
Acrylamidlösung:	5.6 M	Acrylamid
	70.0 mM	Bisacrylamid
Gelpuffer (pH 9.4)	1.5 M	Tris [α,α,α -Tris(hydroxymethylmethylamin)]
	13.9 mM	SDS [Natriumdodecylsulfat]
	0.23 %	TEMED [N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin]
Elektrodenpuffer (pH 8.6):	25.0 mM	Tris/HCl
	3.5 mM	SDS
	0.2 M	Glycin
SDS-Lösung:	20% SDS + 0.01% Bromphenolblau	
Entfärber:	5 Teile Methanol + 5 Teile H ₂ O _{bidest.} + 1 Teil Essigsäure (konz.)	
Coomassie Blue R:	0.2 g Coomassie Blue R (Serva) ad 100 ml Entfärber	
Farmers-Reducer:	5 g	K ₃ [Fe(CN) ₆]
	8 g	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O
	ad 500 ml H ₂ O _{bidest.}	
Entwickler:	2.5 M Na ₂ CO ₃ + 0.05 % Formaldehyd	
Ethanol:	10 %-ig in H ₂ O _{bidest.}	
Silbernitrat:	0.1 %-ig in H ₂ O _{bidest.}	

LMW-Marker: Phosphorylase 94 kDa

Albumin	67 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Carboanhydrase	30 kDa
Trypsin-Inhibitor	20.1 kDa
Lactalbumin	14.4 kDa

Einengung: Millipore-Ultrafree-MC Röhren (\varnothing 10 mm) mit einer Ultrafiltrationsmembran (Low-binding / Typ PLGC); Ausschlußvolumen der Membran von 10 kDa.

3.1.13. Verfahren zur Bestimmung des G-Aktin Gehalts

Um die Wirkung von Cytochalasin B auf das Mikrofilamentsystem der Neutrophilen zu kontrollieren, wurden 1×10^7 PMNL in Suspension mit/ohne CB/FNLPNTL behandelt. Nach Versuchsablauf und Zentrifugation bei 800 g wurden die PMNL in Lysispuffer + 20 μ l DFP (100 mM) aufgenommen und für 30-60 min auf Eis gestellt. Nachdem die Suspension gevortext worden war, erfolgte die Abtrennung des filamentösen Aktins durch Zentrifugation bei 8000 g (10-15 min). Der das G-Aktin enthaltene Überstand wurde abgetrennt und eine Acetonfällung (0.5 ml Überstand + 0.8 ml Aceton // 1 Std) durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 14.000 g (10-15 min) wurde das Sediment in 50 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen und davon 11-13 μ l auf ein 10 %-iges Acrylamidgel gegeben. Folgend der Auftrennung im Gel (40 mA pro Gel) wurden die Proteine mit Entfärber gefärbt und nach 2-maligem Waschen mit Coomassie-Lösung gefärbt (siehe 3.1.12.). Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mit Hilfe eines LMW-Markers. Um den Gehalt des G-Aktins zu bestimmen, wurden die Gele mit einem Joyce-Loeble-Chromoscan gescannt [White et al., 1983].

Puffer/Reagenzien:

Acrylamidlösung:	siehe 3.1.12.
Elektrodenpuffer:	"
Gelpuffer:	"
Entfärber:	siehe 3.1.12.
Coomassie-Lösung:	"

Lysis-Puffer (pH 7.0): 80 mM KCl
20 mM Imidazol
10 mM EGTA
2 % Triton-X-100

SDS-Probenpuffer (pH 6.6): 10 % SDS
13 mM Mercaptoethanol
86 mM Tris/HCl
20 % Glycerin

3.1.14. Fluoreszenzmarkierung von Aktin

Die Markierung der Mikrofilamente (F-Aktin) erfolgte mit Hilfe Rhodamin - gekoppelten Phalloidins [Cassimeris et al., 1990]: dazu wurden die PMNL mit/ohne CB vorinkubiert und dann in Gewebekulturschalen mit/ohne FNLNPTL (auf Polylysin beschichteten Deckgläschen) behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in Methanol fixiert (60-80 sec), 3 x mit CMF-PBS gewaschen und mit 20 µl Phalloidin-Rhodamin-Lösung inkubiert (30 min/37°C). Nach Versuchsablauf wurden die Zellen 3 x mit CMF-PBS gewaschen und in Mowiol eingebettet.

Puffer / Reagenzien:

CMF-PBS-Puffer (pH 7.2): siehe **3.1.1.**

Poly-L-Lysin-Beschichtung: 0.01 %-ige Poly-L-Lysin-Lösung (Sigma) in sterilem PBS, für 5 min auf die Deckgläschen gebracht, Trocknung der Gläschen bei 40°C.

Phalloidin-Rhodamin: mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltes Phalloidin (spezifisch F-Aktin-bindendes Protein); zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H. Faulstich, MPI Heidelberg.

3.2. Immunologische Methoden

3.2.1. Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Die Konzentrations-Bestimmung der Enzyme Typ-I-Kollagenase und Gelatinase sowie des Häm-Proteins Laktoferrin erfolgte in einem ELISA-Verfahren (Sandwich-Typ). Mit Hilfe polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen und einer Eichreihe wurde der Gehalt dieser Proteine in verdünnten Zellüberständen/-lysaten in folgenden Arbeitsschritten nachgewiesen [Bergmann et al., 1989]:

Zunächst wurden die Mikrotiterplatten mit 100 µl (je Well) Beschichtungs-IgG (1.AB) (2 mg spezifisches IgG/ml H₂O // 1:1000 verdünnt in Beschichtungspuffer) beschickt und für > 2 Std bei 4°C inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit PBST-Waschpuffer erfolgte das Auftragen von je 100 µl in RSA-Puffer verdünntem Antigen (Zellüberstände/-Lysate 1:2 - 1:40 verdünnt // Eichreihe *); den Zellüberständen/-Lysaten wurden 10 µl DFP zugesetzt.

Dannach wurden die Mikrotiterplatten bei 37°C für 2 Std. oder bei RT über Nacht inkubiert. Vor dem Auftragen von 100 µl des zweiten, Peroxidase-

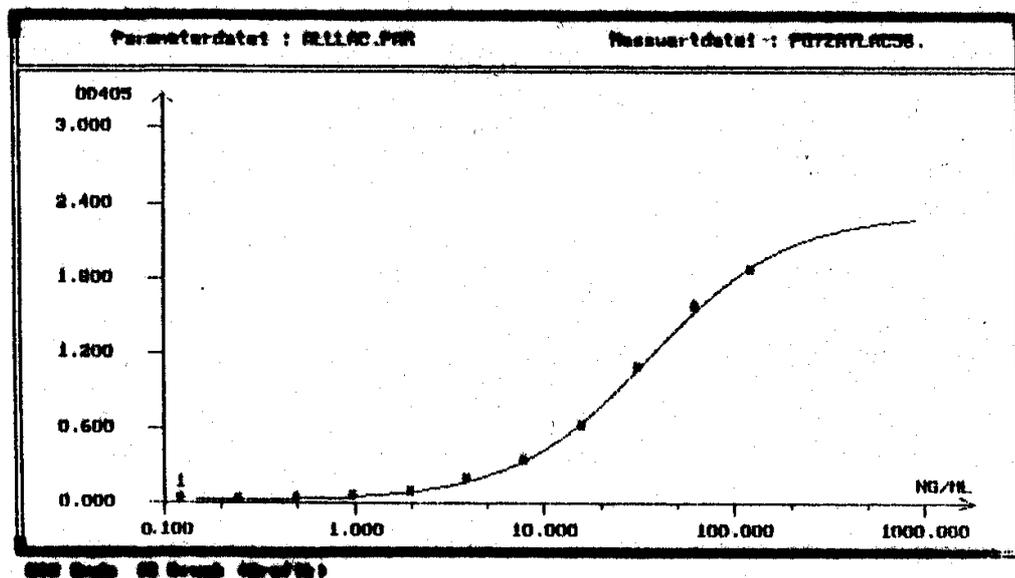
3. Material und Methoden

konjugierten, Antikörpers (1:2000 - 1:6000 in RSA-Puffer verdünnt) wurden die Platten 4 x gewaschen; Inkubation > 2 Std. bei RT. Nach 6-maligem Waschen mit Waschpuffer wurde die Mikrotiterplatte mit 100 µl Farbreagenz (ABTS in Citratpuffer + H₂O₂) je Well beschickt; Inkubation bei 18°C für 2 Std.

Nach Abschluß der Farbreaktion wurde die Absorbtion bei $\lambda = 405$ nm im ELISA-Reader gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Eichreihe* bestimmt.

* Damit die OD-Kurven von Eichung (Abb. 7) und Proben parallel verliefen, wurde die Konzentration der Eichreihe und die Verdünnung der Proben bei jeder Versuchsreihe aufeinander abgestimmt. Nur bei parallelem Verlauf des linearen Teils der Kurven ist eine genaue Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der Eichreihe möglich.

Abb. 7



Die Immunisierung der Kaninchen, die Blutentnahme, sowie die Serumgewinnung erfolgte durch Frau C. Wiegand, Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie (Fakultät für Biologie/Universität Bielefeld) mit aus "buffy-coat" aufgereinigter Gelatinase [Oberhoff, 1990] und Typ-I-Kollagenase [Knäuper, 1989]. Die Reinigung der

3. Material und Methoden

Antikörper wurde von Frau V. Süwer, Lehrstuhl für Biochemie (Fakultät für Chemie/Universität Bielefeld) durchgeführt. Die Aufreinigung der AB aus Serum erfolgte nach Harboe & Ingild, (1973) durch Ammoniumsulfat-Fällung, Dialyse (gegen H₂O und Aceton) und Ionenaustausch-Chromatographie (Sephadex A 50- Säule).

Puffer / Reagenzien:

- Carbonatpuffer (pH 9.6): 35.0 mM NaHCO₃
 15.0 mM Na₂CO₃
 0.02 % NaN₃
- PBST-Waschpuffer (pH 7.4): 0.146 M NaH₂PO₄
 0.146 mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O
 0.151 mM NaCl
 0.05 % Tween 20 (Polyoxyethylen-
 sorbitanmonolaureat)
- RSA-Puffer (pH 7.4): PBST-Waschpuffer + 2 % RSA
- Farbreagenz (pH 4.2): 1 mg ABTS / ml Citratpuffer + 0.013 % 30%-iges H₂O₂
- Citrat-Puffer (pH 4.2): 0.100 M Citronensäuremonohydrat
 0.125 M Na₂HPO₄
 0.050 % Tween 20
- 1.AB= Beschichtungs-IgG: 2 mg spezifisches IgG / ml H₂O_{bidest.}; polyklonaler
 Antikörper aus dem Kaninchen
- 2.AB= Konjugat: 1 mg Peroxidase-konjugierter polyklonaler Antikörper aus dem
 Kaninchen in 200-500 µl PBST-Puffer und Glycerin
 (siehe **3.2.1.1.**)
- DFP-Lösung: 100 mM Diisopropylfluorophosphat (Serva) in n-Propanol

Geräte:

ELISA-Reader: Dynatech-ELISA-Reader mit angeschlossenen Mikrotek-Auswertprogramm

Mikrotiterplatten: Nunc-Immuno-Maxisorbplatten F96

Zur Bestimmung geringer Mengen an Elastase wurde ein ELISA-Verfahren von Merck (**Merck Immunoassay 12589 PMN / Elastase; ELISA gegen Elastase/ α_1 -Proteinase-inhibitor-Komplex**) angewendet. Dabei wurden die Proben (mit NaCl eluierte Elastase von der Oberfläche stimulierter PMNL, siehe 3.1.11.) 1:200 in Verdünnungspuffer verdünnt und mit 5.5×10^{-7} M α_1 -PI für 10 min versetzt, danach erfolgte die Bestimmung der Elastasekonzentration mit Hilfe von Eichwerten in AB-beschichteten Röhrchen:

Vor dem Einpipettieren von je 500 μ l verdünnter Probe bzw. Eichlösung wurden die mit dem 1. AB beschichteten Röhrchen mit 1 ml Waschlösung gewaschen; Inkubation für 60 min bei 20-25°C. Nach 3-maligem Waschen mit 1 ml Waschpuffer erfolgte die Zugabe von 500 μ l Antikörper-Enzymlösung (2. AB; gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) für 30 min bei 20-25 °C. Danach wurden die Röhrchen 2 x mit je 2 ml Waschlösung gewaschen und 500 μ l Substratlösung für 30 min bei 20-25°C zugegeben. Die Farbreaktion wurde durch Zusatz von 100 μ l Stopplösung beendet; die Messung der Extinktionen erfolgte im Eppendorf-Photometer bei $\lambda = 405$ nm 25°C (Schichtdicke der Küvetten 1 cm) gegen einen Blindwert.

Die Elastasekonzentration in den Proben wurde jeweils in Doppelbestimmungen mit Hilfe einer Eichreihe ermittelt, die Extinktionen der Eichwerte in 6 Messungen bestimmt.

Puffer / Reagentien:

1. AB: anti-(human)-PMN-Elastase Antikörper aus dem Schaf

2. AB: anti-(human)- α_1 -Proteinase-Inhibitor-Komplex aus dem Kaninchen, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase

Eichlösungen: PMN-Elastase- α_1 -Proteinase-Komplex: 0.4 ng/ml; 0.8 ng/ml; 1.94 ng/ml; 3.57 ng/ml

Verdünnungspuffer (pH 7.5): 20 mM Phosphat

Waschlösung: Detergenz in H₂O_{bidest.}

Antikörper-Enzymlösung (pH 7.5): Antikörper-Konjugat-Lösung (2. AB) 44%-ig in 1:1 verdünnter Waschlösung.

Enzym-Substratlösung (pH 9.8): 20.0 μ M 4-Nitrophenylphosphat
 1.0 M Diethylamin
 0.5 mM MgCl₂

Stopplösung: 2 M NaOH

3.2.1.1. Herstellung der Antikörper-Konjugate

Die Konjugierung des 2.AB mit Meerrettich-Peroxidase erfolgte modifiziert nach Tijssen (1985):

3. Material und Methoden

- 5 mg spezifisches IgG wurden in 500 μ l Carbonatpuffer gelöst und mit einigen Tropfen Sephadex Gel-G12 versetzt (Erhöhung der Dichte)
- 1.6 mg Meerrettich-Peroxidase (Boeringer GmbH) wurden in 160 μ l NaIO_4 -Lösung aufgenommen; 15 min Reaktionszeit bei RT (bei Dunkelheit)
- Zugabe der IgG-Lösung zur Peroxidase; 4 - 5 Std. Reaktion bei RT
- danach Zentrifugation der Lösung (10 min/13.000g) und 3-4 maliges Waschen des Sediments mit 200 μ l Carbonatpuffer, die Überstände wurden gesammelt
- die Überständen wurde 3 x mit NaBH_4 -Lösung (1/20-igstel ihres Volumens) versetzt; Reaktionszeit jeweils 20 min bei RT
- durch Zugabe der gleichen Menge gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wurde das konjugierte IgG gefällt; Inkubation bei 4°C über Nacht
- durch Zentifugation (5-10 min/13.000 g) wurde das IgG-Konjugat von freier Peroxidase getrennt und mit 50 %-iger $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gewaschen
- je nach Größe des Sediments wurde es in 100-250 μ l PBST-Puffer + Glycerin aufgenommen.

Puffer / Reagenzien:

Carbonatpuffer (pH 9.6): 15.0 mM Na_2CO_3
 35.0 mM NaHCO_3

Phosphatpuffer (pH 7.9): 12.7 mM Na_2HPO_4

NaIO₄-Lösung: 8 mM NaIO₂ in H₂O_{bidest.}

NaBH₄-Lösung: 10 mg NaBH₄ / ml 0.1 N NaOH

Peroxidase (Boeringer GmbH): Meerrettich-Peroxidase

3.3. Mikroskopie

3.3.1. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Leitz Diavert Mikroskop durchgeführt, die Fluoreszenz-Mikroskopie mit einem Leitz Axiophot Mikroskop unter Anregung des Rhodamins bei $\lambda = 550$ nm.

3.2.2. Rasterelektronenmikroskopie

Um die Aufnahme von Bakterien durch PMNL untersuchen zu können, wurden phagozytierende Zellen für das Rasterelektronenmikroskop (Hitachi S-450) präpariert. Auch CB-behandelte und mit Hilfe Polylysin-beschichteter Deckgläschen "zerrissene" PMNL (Darstellung der Granula) wurden im REM untersucht [Plattner & Zingsheim, 1987]. Die Behandlung der PMNL sowie die Herstellung von REM-Präparaten wurden wie im folgenden beschrieben durchgeführt:

Phagozytose: die PMNL wurden 20 min mit FNL PNTL (10^{-7} M) in Suspension inkubiert und dann in Gewebekulturschalen mit Polylysin-beschichteten Deckgläschen überführt; 80 μ l Zymosan-Lösung wurden zugesetzt. Nach 30-40 min wurden die Zellen fixiert und für das REM präpariert

3. Material und Methoden

Darstellung der Granula und CB-behandelter PMNL: $1-2 \times 10^6$ PMNL wurden

mit/ohne CB//FNLNTL auf Polylysin-beschichteten Deckgläschen behandelt und fixiert. Ein Teil der Zellen wurde mit Hilfe eines zweiten, frisch mit Polylysin-beschichteten Deckglas zerrissen und ebenfalls für das REM präpariert.

Herstellung von REM-Präparaten: zur Fixierung wurden die PMNL zunächst mit

3 %-iger Glutaraldehyd-Lösung für 2 Std. bei 4°C behandelt, anschließend wurde das Fixans durch 3-maliges Waschen mit 0.1 M Cacodylat-Puffer entfernt. Nach Lagerung der Präparate bei 4°C in Cacodylat-Puffer erfolgte der zweite Schritt der Fixierung mit 0.5 %-iger OsO₄-Lösung (2 Std./4°C) und Waschen mit Cacodylat-Puffer (siehe oben).

Der Fixierung schloß sich die Entwässerung der Präparate an. Zum Austausch des Wassers gegen Äthanol wurden die Deckgläschen jeweils 15 min bei RT in einer aufsteigenden Konzentrations-Reihe (10 % - 96 %) behandelt (Lagerung der Gläschen bei 4°C in 70 %-igem Äthanol). Zur Trocknung der Präparate wurden die Deckgläschen in einem Kompressiosgerät mit CO₂ als Trocknungsflüssigkeit einer Trocknung am kritischen Punkt ($P_{kr. CO_2} = 72.9 \text{ atm} / T_{kr. CO_2} = 31.1 \text{ °C}$) unterzogen.

Nach diesen Arbeitsschritten wurden die Präparate mit einem Spezialklebeband auf Aluminium-Probentellern befestigt und mit einer elektronendichten Goldschicht versehen ("sputtern"). Dabei wurden in Stickstoff-Atmosphäre unter Anlegung einer Hochspannung und bei einem Druck von 0.1 Torr durch Sekundäremission Goldatome aus einer Kathode geschlagen und die Präparate mit einem Goldüberzug versehen. Die Behandlung erfolgte in einer Technics Hummer V- Sputter Anlage (Dauer 4 min).

Die nun wasserfreien, d.h. Hochvakuum-beständigen Präparate konnten im REM untersucht werden. Hierbei bedingt der Goldüberzug der Präparate sowohl einen Schutz gegen Aufladungserscheinungen als auch eine höhere Sekundärelektronenausbeute, d.h. ein besseres Auflösungsvermögen im REM

3. Material und Methoden

[Hopwood, 1972 // Zingsheim & Plattner, 1976].

Puffer / Reagenzien:

Glutaraldehyd-Lösung: 3 % Glutaraldehyd in 0.1 M Cacodylat-Puffer

Cacodylat-Puffer (pH 7.2): 0.1 M Na (CH₃)₂ AsO₂ · 3 H₂O

OsO₄-Lösung: 0.5 % OsO₄ in 0.1 M Cacodylat-Puffer

Poly-L-Lysin-Beschichtung: siehe **3.1.1.4.**

4. Ergebnisse

4.1. Blutaufarbeitung und Blutspender

Bei der hier angewandten Granulozyten-Präparationsmethode wurde eine Zellausbeute von 1.66×10^6 PMNL pro ml Vollblut (gemittelt aus 109 Spenden) erreicht. Das ist vergleichbar mit den in der Literatur angegebenen Werten [Rick, 1977 / Kleesik, 1989]. Die stichprobenartig bestimmte Lebendrate der Zellen lag bei $> 95\%$; Zellausbeute sowie Sedimentations-Geschwindigkeit des Blutes auf Ultravist/Methocel (siehe 3.1.1.) unterlagen spenderabhängigen Schwankungen. Auch die Zellzahl pro ml Vollblut desselben Spenders variierte bis zu 100 %; in Abb. 8 ist von drei Spendern die PMNL-Zahl pro ml Vollblut aus 12 Blutspenden aufgetragen.

Nach Pappenheim gefärbte Blutausstriche ermöglichten die Darstellung und Differenzierung der drei Granulozyten-Typen (Abb. 9).

Abb. 8 *Zellausbeute pro Milliliter Vollblut
(12 Blutspenden)*

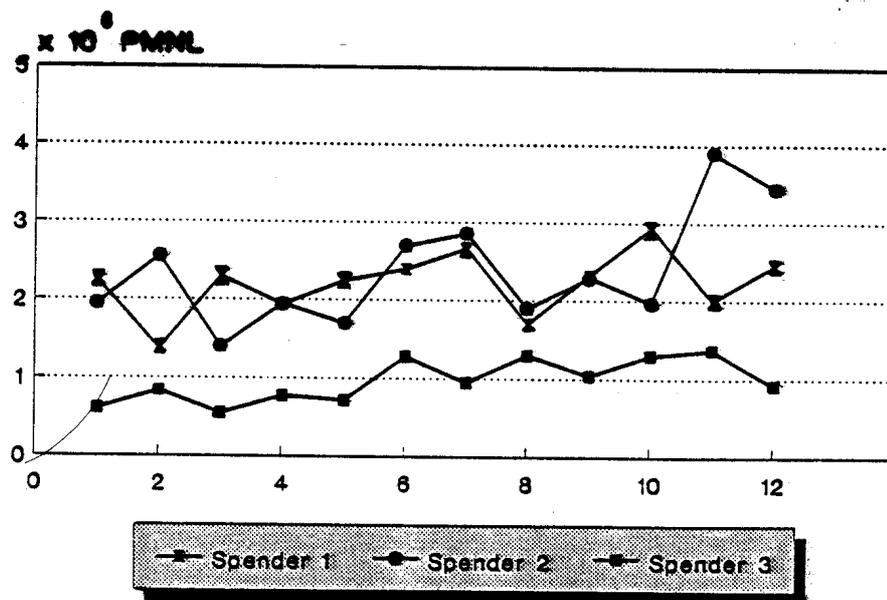
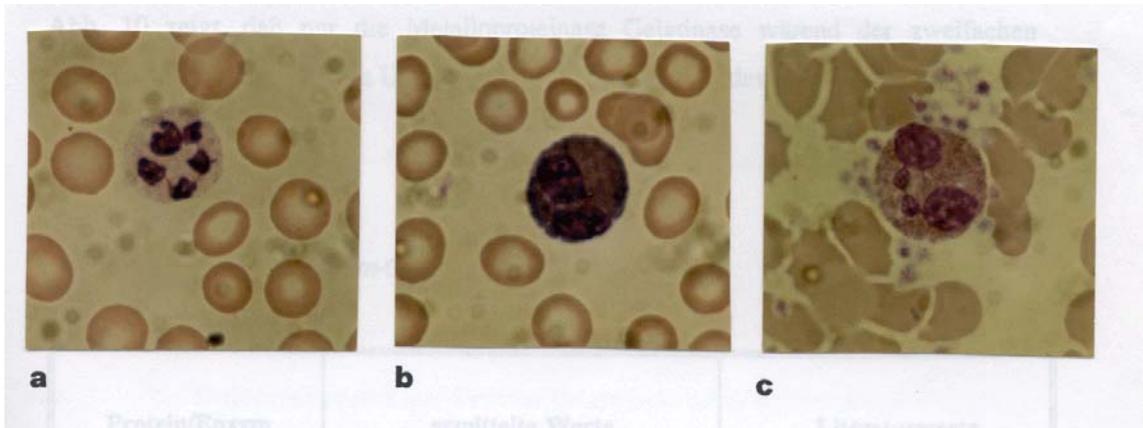


Abb. 9 Granulozyten im nach Pappenheim gefärbten Blutausstrich



- a. neutrophiler Granulozyt
- b. basophiler Granulozyt
- c. eosinophiler Granulozyt

4.2. Bestimmung des Protein-/Enzymgesamtgehaltes

Zur Bestimmung des Protein-/Enzymgesamtgehaltes (Tab. 2) wurden Zell- und Granulamembranen von 5×10^6 PMNL/ml DPBS durch Ultraschall und Detergenzbehandlung (3.1.4.) aufgeschlossen und der Protein-/Enzymgehalt in den Zell-Lysaten bestimmt. Der Gehalt an Typ-I-Kollagenase, Gelatinase und Laktoferrin wurde im ELISA-Verfahren (3.2.1.), die Konzentration an Elastase bzw. Myeloperoxidase in Aktivitätstests (3.1.9. und 3.1.10.) gemessen (n= 18-20 // 9-10 Spender).

Um auch für die beiden letztgenannten Enzyme Angaben in [$\mu\text{g/ml}$] machen zu können, wurde eine Eichreihe mit HL-Elastase bzw. Myeloperoxidase aus humanen Sputum erstellt (Abb. 5/6 in 3.1.9. und 3.1.10.). Bei der Angabe des Gesamtgehaltes wurde der bereits während der zweifachen hypotonen Lyse sezernierte Proteinanteil berücksichtigt. Dazu wurden je 1 ml des Überstandes nach der Lyse entnommen.

4. Ergebnisse

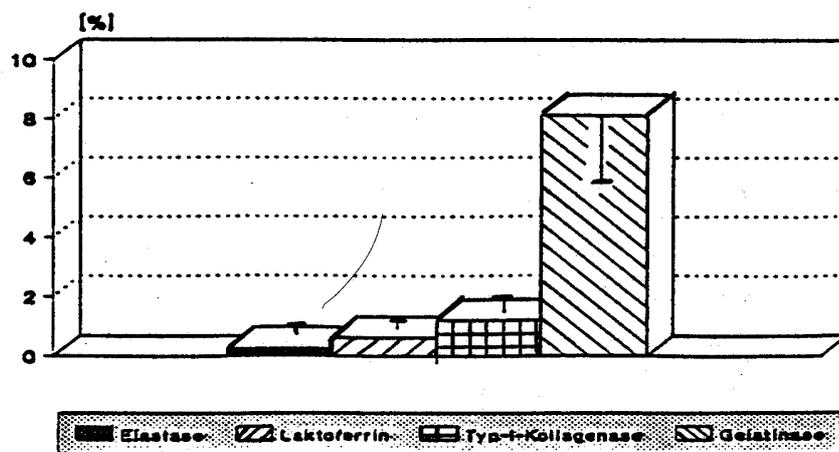
(n= 7-8 // 7-8 Spender), der Gehalt der untersuchten Proteine bestimmt und nach der Zellzählung auf 5×10^6 PMNL umgerechnet.

Abb. 10 zeigt, daß nur die Metalloproteinase Gelatinase während der zweifachen hypotonen Lyse in größerem Umfang ($> 8\%$, bezogen auf den Gesamtgehalt) von den Zellen freigesetzt wurde.

Tab. 2 Protein-/Enzym-Gesamtgehalt in 5×10^6 PMNL

Protein/Enzym	ermittelte Werte	Literaturwerte
Typ-I-Kollagenase	0.674 μg +/- 0.18	0.3 - 20.5 μg
Gelatinase	0.545 μg +/- 0.16	----
Laktoferrin	14.050 μg +/- 2.90	15.0 - 21.75 μg
Elastase	14.90 μg +/- 2.70	10.0 - 15.00 μg
Myeloperoxidase	14.30 μg +/- 3.1	19.55 μg

Abb. 10 Proteinfreisetzung während der Lyse



Die Myeloperoxidase-Ausschüttung während der Aufarbeitung bzw. Lyse konnte nicht bestimmt werden, da die Enzymaktivität im photometrischen Test durch Erythrozyten/-lysate um das 2-3-fache (je nach Erythrozytenzahl) anstieg.

Alle im Verlauf dieser Arbeit angegebenen prozentualen Werte der Protein-Enzymausschüttung beziehen sich, soweit nicht anders vermerkt, auf die in Tab. 2 angegeben Gesamtgehalte.

4.3. Untersuchungen zur Protein/Enzymsekretion neutrophiler Granulozyten

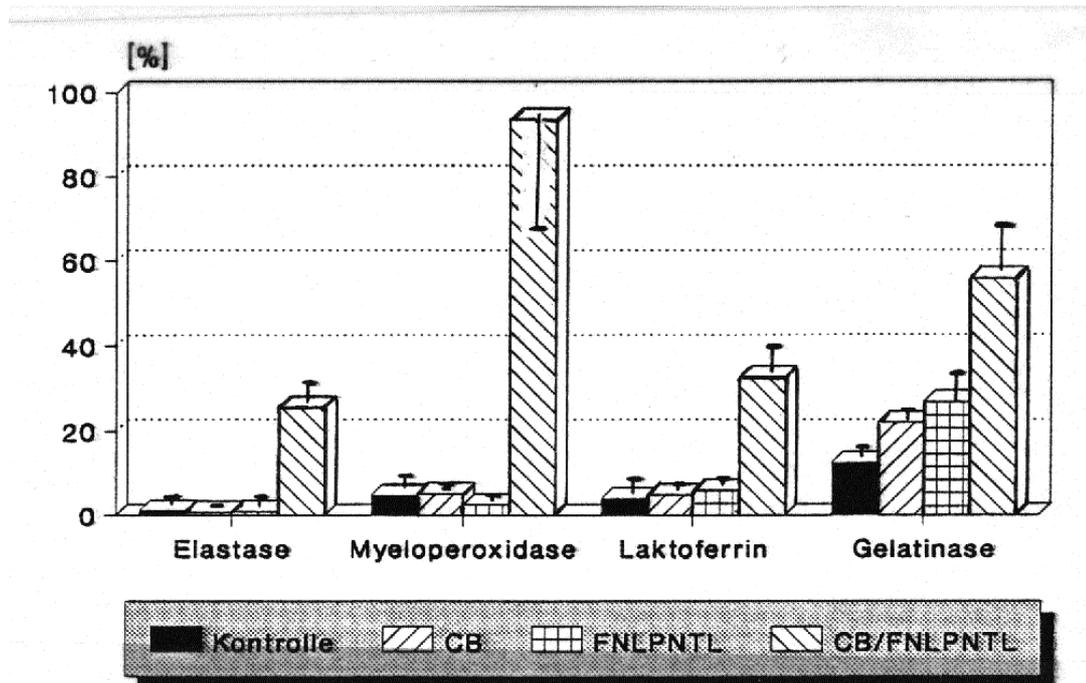
4.3.1. FNLNPTL-Stimulierung von PMNL mit und ohne Cytochalasin B Behandlung

Formyl-Peptide, wie z.B. das synthetische FNLNPTL, sind die am besten untersuchten und umfassendsten Stimulantien für neutrophile Granulozyten. In dieser Arbeit wurde FNLNPTL zur Induzierung der Degranulation in einer Konzentration von 10^{-7} M eingesetzt. Da aus vorheriger Arbeit [A.Schettler, (1988)] und der Literatur bekannt ist, daß eine weitreichende Freisetzung der azurophilen Granula nur durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} - Konzentration oder Zerstörung der Mikrofilamente erreicht werden kann, wurden die Zellen zusätzlich mit Cytochalasin B (CB) behandelt. Dazu wurden 5×10^6 PMNL/ml DPBS für 20 min in Suspension bei $37^\circ C$ mit/ohne CB ($5 \mu g/ml$) behandelt, dann für 10 min in Gewebekulturschalen mit/ohne FNLNPTL (10^{-7} M) und CB inkubiert; Kontrollzellen blieben ohne Zusatz. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen, zentrifugiert und der Gehalt der Proteine bestimmt.

Wie Abb. 11 zeigt, führte die Zerstörung der Mikrofilamente durch CB in bezug auf die Gelatinase zu einer Erhöhung der FNLNPTL-induzierten Sekretion (von 26.8 % auf 56 %) und auch zu einer Erhöhung (um 9.5 %) der Ausschüttung gegenüber den

Kontroll-Zellen. Die unbehandelten Kontrollen wiesen in bezug auf die Gelatinase, verglichen mit der Freisetzung der anderen untersuchten Proteine, mit einer 12.4 %-igen Ausschüttung eine hohe Sekretionsrate auf. Eine Freisetzung (d.h. > 5 % über den Kontrollwerten) der Laktoferrin, Elastase und Myeloperoxidase enthaltenen Granula konnte nur durch Behandlung mit CB und FNLNTL erreicht werden, nicht aber durch Zusatz von CB oder FNLNTL allein. Auffallend dabei war der große Unterschied der Elastase- (25.5 %) und Myeloperoxidase- (93.7 %) Sekretion nach CB/FNLNTL-Behandlung, so daß die Werte in einer weiteren Versuchsreihe (Abb. 13) überprüft wurden.

Abb.11 *CB/FNLNTL-induzierte Proteinfreisetzung nach Vorinkubation mit Cytochalasin B*



5×10^6 PMNL wurden mit/ohne CB (5 $\mu\text{g/ml}$) in Suspension (20 min/37°C) vorinkubiert und nachfolgend in Gewebekulturschalen (10 min) mit/ohne FNLNTL (10^{-7}M) und CB behandelt (n= 11 // 6-7 Spender):

K. unbehandelte Kontrollzellen

CB: mit CB vorinkubierte und CB behandelte Zellen

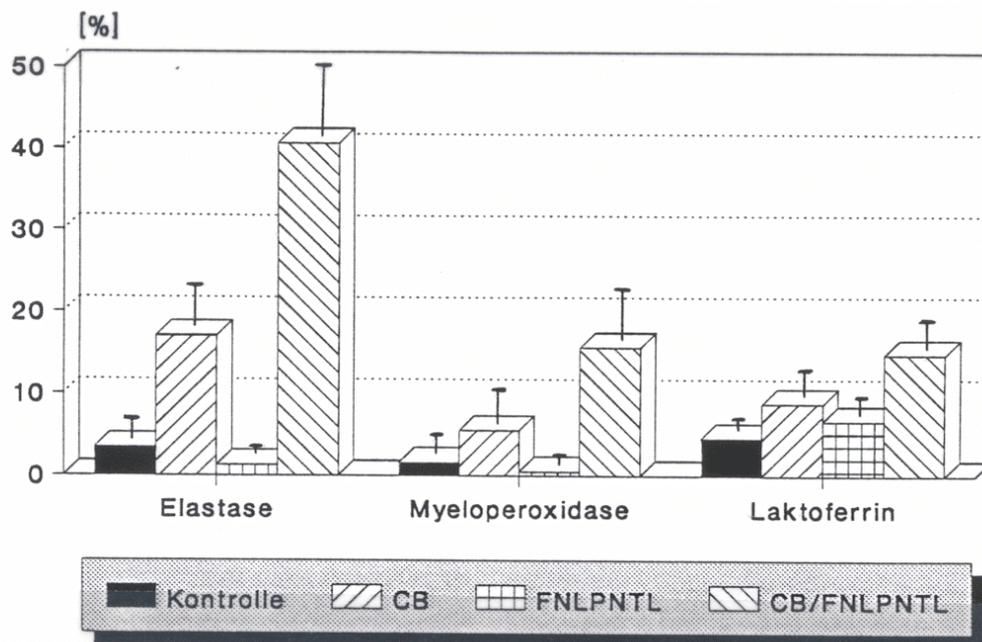
FNLNTL: Vorinkubation der PMNL ohne Zusatz, FNLNTL-Behandlung für 10 min

CB/FNLNTL: Zellen, die mit CB vorinkubiert und dann mit CB+FNLNTL behandelt wurden

Es wurde auch untersucht, ob die Zugabe von CB (5 µg/ml) und FNLPTNL (10^{-7} M) zu den Zellen (in Gewebekulturschalen) ohne Vorinkubation mit CB ebenfalls zu einer verstärkten Freisetzung der Granula führt. Wie in Abb. 12 dargestellt, lag hier die CB/FNLPTNL induzierte Sekretion von Laktoferrin und Myeloperoxidase um 17 % - 78 % unter der Rate, die durch Vorinkubation mit CB erreicht wurde.

Die Elastase-Freisetzung unter diesen Bedingungen lag dagegen um 20 % über dem nach Vorinkubation erreichten Wert; auch die allein durch CB-Behandlung induzierte Freisetzung lag um 20 % über der durch Vorinkubation und Behandlung mit CB hervorgerufenen Sekretion.

Abb. 12 Durch CB/FNLPTNL- Behandlung induzierte Proteinfreisetzung



Proteingehalt im Überstand von 5×10^6 PMNL nach Vorinkubation der Zellen in Suspension (20 min/37°C) ohne Agens und anschließender Behandlung (10 min) mit CB (5 µg/ml), FNLPTNL (10^{-7} M) oder beiden Agentien in Gewebekulturschalen (n=13 // 6 Spender):

K: unbehandelte Kontrollzellen

CB: mit CB behandelte Zellen

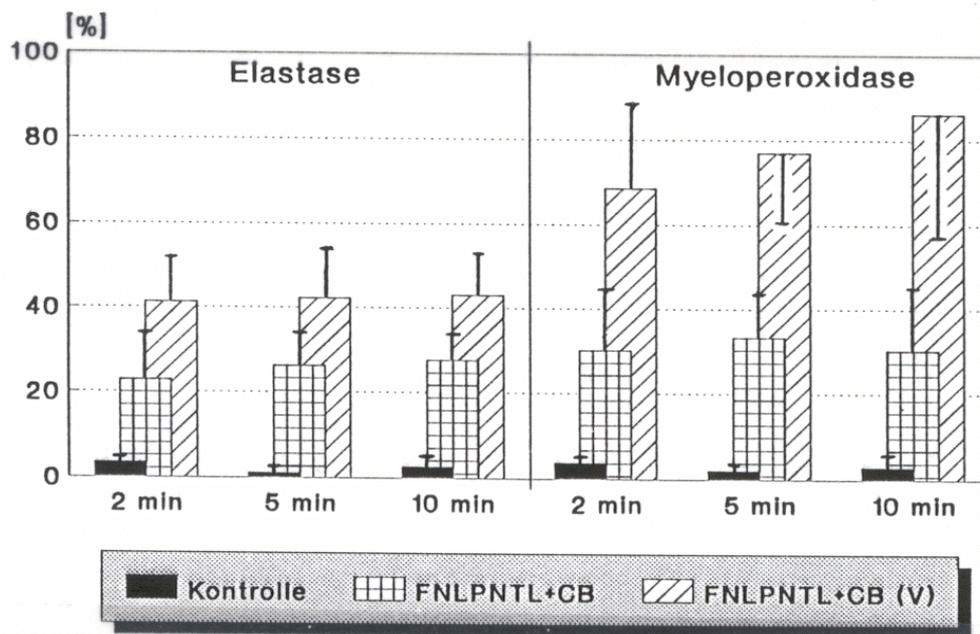
FNLPTNL: mit FNLPTNL behandelte Zellen

CB/FNLPTNL: mit CB+FNLPTNL behandelte PMNL

In einer weiteren Versuchsreihe zur CB/FNLPTNL- induzierten Elastase- und

Myeloperoxidase-Sekretion (Abb. 13) konnten die Unterschiede in der Freisetzung dieser beiden Enzyme reproduziert werden. Dabei ergaben sich, verglichen mit den in Abb. 11/12 dargestellten Werten, für die Myeloperoxidase-Ausschüttung nach CB/FNLPNTL-Behandlung (nach 10 min) Abweichungen von 2 % - 15 %, für die Elastasesekretion Abweichungen von 1 % - 17.5 %. Der Unterschied in der Freisetzung dieser beiden Enzyme bzw. der sie enthaltenen Granula konnte bestätigt werden. Außerdem zeigte sich deutlich, daß die bereits nach 2 min erreichte Sekretionsrate in den weiteren 8 min kaum noch anstieg (mit 10 % größter Anstieg bei der CB/FNLPNTL (V)- induzierten Myeloperoxidasefreisetzung).

Abb. 13 *Proteinfreisetzung nach Behandlung mit Cytochalasin B*



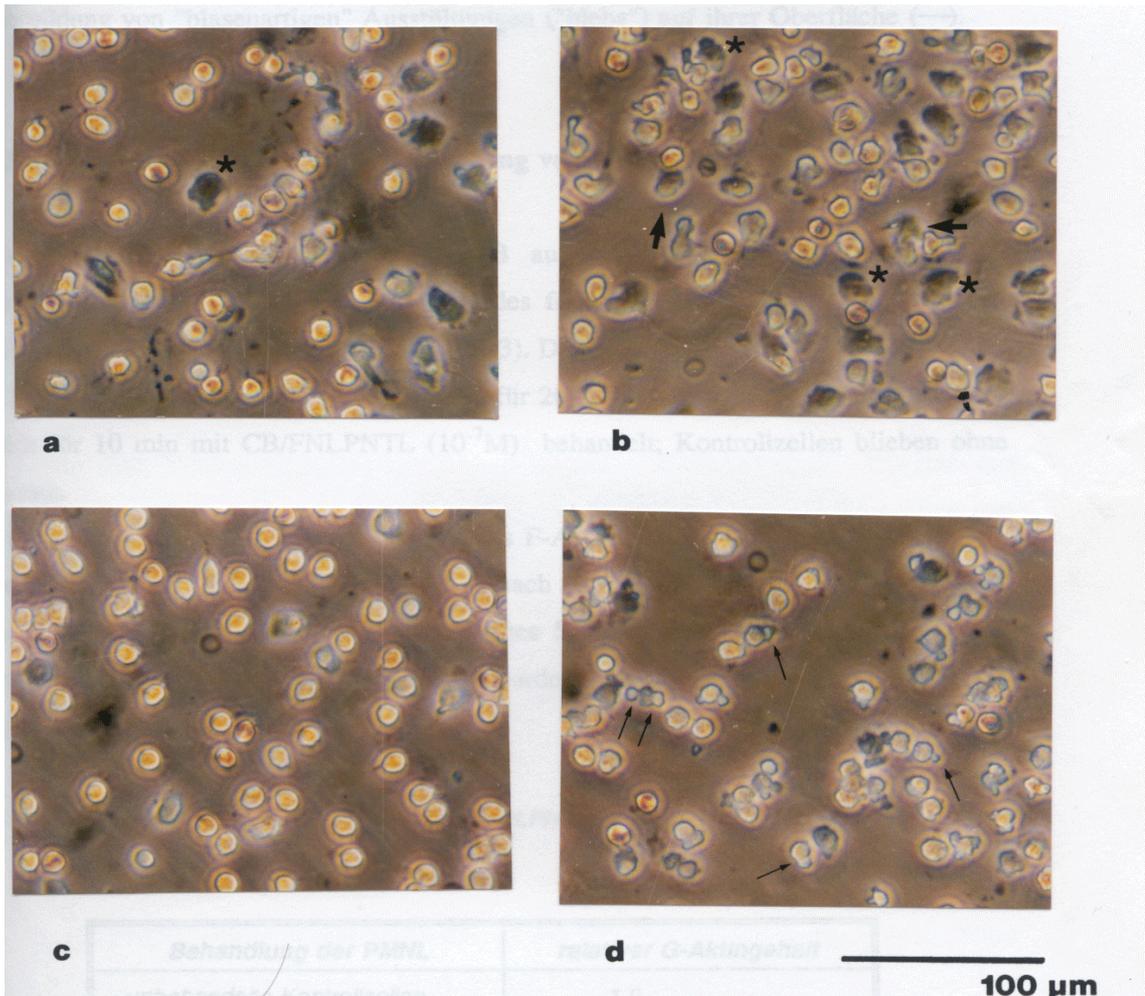
5×10^6 PMNL wurden mit/ohne CB ($5 \mu\text{g/ml}$) in Suspension ($20 \text{ min}/37^\circ\text{C}$) vorinkubiert und nachfolgend in Gewebekulturschalen ($2\text{-}10 \text{ min}$) mit/ohne FNLPNTL (10^{-7}M) und CB behandelt ($n= 7 // 6\text{-}7$ Spender):

- Kontrollen:** unbehandelte Kontrollzellen
- FNLPNTL+CB:** mit CB und FNLPNTL behandelte Zellen
- FNLPNTL+CB (V):** mit CB/FNLPNTL behandelte und mit CB vorinkubierte PMNL

Neben dem Proteingehalt im Überstand nach CB- und FNLPNTL- Behandlung von Granulozyten wurde auch die Morphologie der Zellen unter diesen Bedingungen

dokumentiert. Dazu wurden die Zellen nach Versuchsablauf mit vorgewärmten DPBS gewaschen und sofort im Lichtmikroskop untersucht. Abb. 14 zeigt die Unterschiede in der Zellform der mit CB, FNLNPTL bzw. CB/FNLNPTL inkubierten PMNL im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

Abb. 14 *Morphologie der PMNL nach CB und FNLNPTL-Behandlung*



Morphologie der PMNL nach Vorinkubation der Zellen mit/ohne CB (5 µg/ml) in Suspension (20 min/37°C) und nachfolgender Behandlung in Gewebekulturschalen (10 min) mit/ohne FNLNPTL (10⁻⁷M) und CB:

- a: unbehandelte Kontrollzellen*
- b: Vorinkubation der PMNL ohne Zusatz, FNLNPTL-Behandlung für 10 min*
- c: mit CB vorinkubierte und CB behandelte Zellen*
- d: Zellen, die mit CB vorinkubiert und dann mit CB+FNLNPTL behandelt wurden*

Die unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 14 a) wiesen eine unpolarisierte, d.h. shärische Morphologie auf, während die FNLNTL behandelten PMNL (Abb. 14 b) polarisiert (↔) und teilweise abgestorben (*) waren. Bei 400-facher Vergrößerung war kein morphologischer Unterschied zwischen mit Cytochalasin B (Abb. 14 c) vorinkubierten PMNL und Kontrollzellen zu erkennen; dagegen waren die CB/FNLNTL behandelten Zellen (Abb. 14 d) nicht polarisiert wie nach FNLNTL-Zusatz, sondern zeigten die Ausbildung von "blasenartigen" Ausstülpungen ("blebs") auf ihrer Oberfläche (→).

4.3.1.1. Untersuchungen zur Wirkung von Cytochalasin B

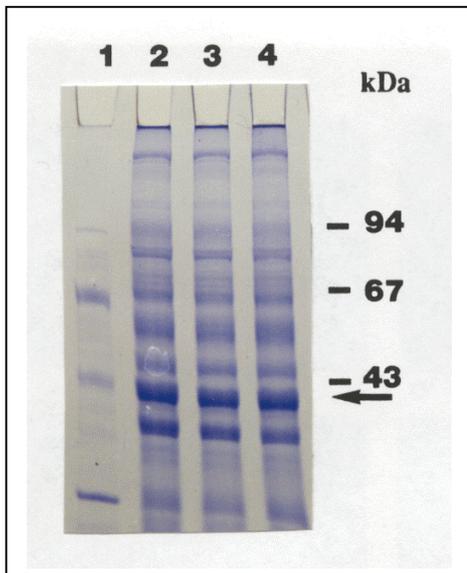
Zur Untersuchung der Wirkung von CB auf das Zytoskelett der neutrophilen Granulozyten wurde zunächst der Anteil des freien G-Aktins in Zell-Lysaten nach CB/FNLNTL-Behandlung bestimmt (Tab. 3). Dazu wurden 1×10^7 PMNL, wie unter 4.3.1. beschrieben, mit/ohne CB (5 µg/ml) für 20 min in Suspension vorinkubiert und dann für 10 min mit CB/FNLNTL (10^{-7} M) behandelt; Kontrollzellen blieben ohne Zusatz.

Anschließend wurden die Zellen lysiert, das F-Aktin durch Zentrifugation abgetrennt und der das G-Aktin enthaltende Überstand nach Acetonfällung und Aufnahme in SDS-Probenpuffer (siehe 3.1.13) auf ein 10%-iges SDS-Gel aufgetragen (Abb. 15). Der relative G-Aktin Gehalt (42 kDa- Bande) wurde densitometrisch vermessen (n=6 // 6 Spender).

Tab. 3 *Relativer G-Aktingehalt in CB/FNLNTL behandelten PMNL*

<i>Behandlung der PMNL</i>	<i>relativer G-Aktingehalt</i>
<i>- unbehandelte Kontrollzellen</i>	<i>1.0</i>
<i>- CB/FNLNTL behandelte Zellen</i>	<i>1.32 +/- 0.20</i>
<i>- mit CB vorinkubierte und mit CB/FNLNTL behandelte PMNL</i>	<i>1.58 +/- 0.33</i>

Abb. 15



- 1: LMW-Marker
 2: Überstand des Lysates von PMNL, die 20 min mit CB vorinkubiert und anschließend 10 min mit CB+FNL PNTL behandelt wurden
 3: Überstand des Lysates von PMNL, die 10 min mit CB+FNL PNTL behandelt wurden
 4: Überstand des Lysates unbehandelter Kontrollzellen

Wie aus Tab. 3 hervorgeht, lag der Anteil des freien G-Aktins in den Lysaten von CB/FNL PNTL-behandelten PMNL (10 min) über dem unbehandelter Kontrollen und dokumentiert die F-Aktin zerstörende Wirkung des Cytochalasins bei FNL PNTL stimulierten PMNL, wie sie auch in der Literatur [White et al., 1983] beschrieben ist. Die Erhöhung des G-Aktingehalts konnte durch Vorinkubation (20 min) der Granulozyten mit CB (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) vor der CB/FNL PNTL Behandlung noch gesteigert werden.

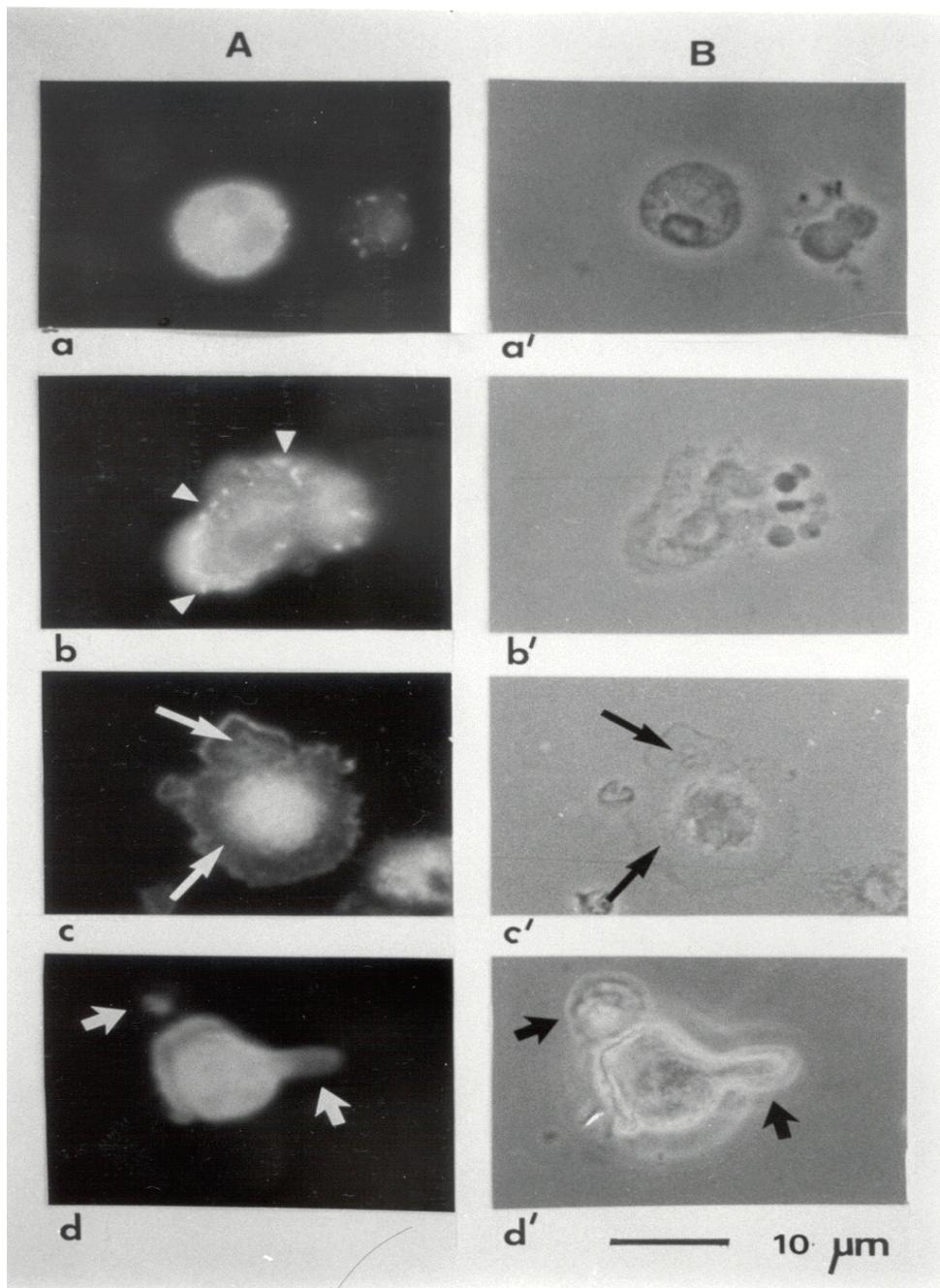
Weiterhin wurden Fluoreszenzmarkierungen mit Phalloidin-Rhodamin an CB/FNL PNTL behandelten PMNL durchgeführt.

$1-2 \times 10^6$ PMNL wurden - wie beschrieben - mit CB/FNL PNTL inkubiert, dann fixiert (3.1.3.) und mit dem Fluoreszenz-Marker (3.1.14.) behandelt.

Abb. 16 zeigt die F-Aktinverteilung in CB und FNL PNTL-behandelten Granulozyten gegenüber unbehandelten Kontrollzellen.

Abb. 16

Aktinverteilung in CB/FNLPNTL behandelten PMNL



$1-3 \times 10^6$ PMNL wurden mit/ohne CB ($5 \mu\text{g/ml}$) in Suspension ($20 \text{ min}/37^\circ\text{C}$) inkubiert und nachfolgend in Gewebekulturschalen (20 min) mit/ohne FNLPNTL (10^{-7} M) und CB behandelt :

a,a': unbehandelte Kontrollzelle

b,b': ohne Zusatz vorinkubierte und mit FNLPNTL behandelte Zelle

c,c': mit CB vorinkubierte und CB behandelte Zelle

d,d': Zellen, die mit CB vorinkubiert und dann mit CB+FNLPNTL behandelt wurden

A: Fluoreszenzmarkierung

B: Phasenkontrast

4. Ergebnisse

Bei den Kontrollzellen zeigte sich eine gleichmäßige F-Aktinverteilung unter der Plasmamembran der PMNL (Abb. 16 a,a'). Bei durch FNLPTNL-Zusatz polarisierten Neutrophilen war eine Konzentration des F-Aktins in der Frontlamelle und eine besonders starke Fluoreszenz an einzelnen Punkten (●) im Randbereich der Zellen zu beobachten (Abb. 16 b,b').

Mit CB behandelte und vorinkubierte PMNL (Abb. 16 c,c') wiesen eine gleichmäßige F-Aktinverteilung im Zellkörper auf; dabei war eine dünne, den zentralen Zellkörper umgebende Plasmaschicht (↔) auf dem Boden der Kulturschale zu beobachten, in der nur eine geringe Fluoreszenz zu verzeichnen war.

PMNL, die mit CB vorinkubiert und mit CB/FNLPTNL behandelt worden waren (Abb. 16 d,d'), zeigten, wie schon bei vorangehend dargestellten Beobachtungen (4.3.1.1./Abb. 14) Ausstülpungen (↔) auf ihrer Oberfläche. In diesen "blebs" war im Gegensatz zur Frontlamelle FNLPTNL-stimulierter Zellen keine Verdichtung des F-Aktins zu erkennen.

Zum Vergleich der Wirkung von CB mit einem weiteren Mikrofilament-zerstörenden Agens wurden die PMNL mit der CB verwandten Substanz Cytochalasin D (CD) bzw. CD/FNLPTNL für 10 min in Gewebekulturschalen behandelt (Daten nicht dargestellt). Der dabei in den Überständen gemessene Myeloperoxidase- und Elastasegehalt entsprach den nach CB- bzw. CB/FNLPTNL-Zusatz gemessenen Werten (Abweichungen von 0.1 % - 5 %). Nur die Elastasesekretion durch mit CD allein behandelte PMNL lag mit 3.4 % erheblich unter dem nach CB-Zusatz gemessenen Wert (17.1 %) (siehe Abb. 12).



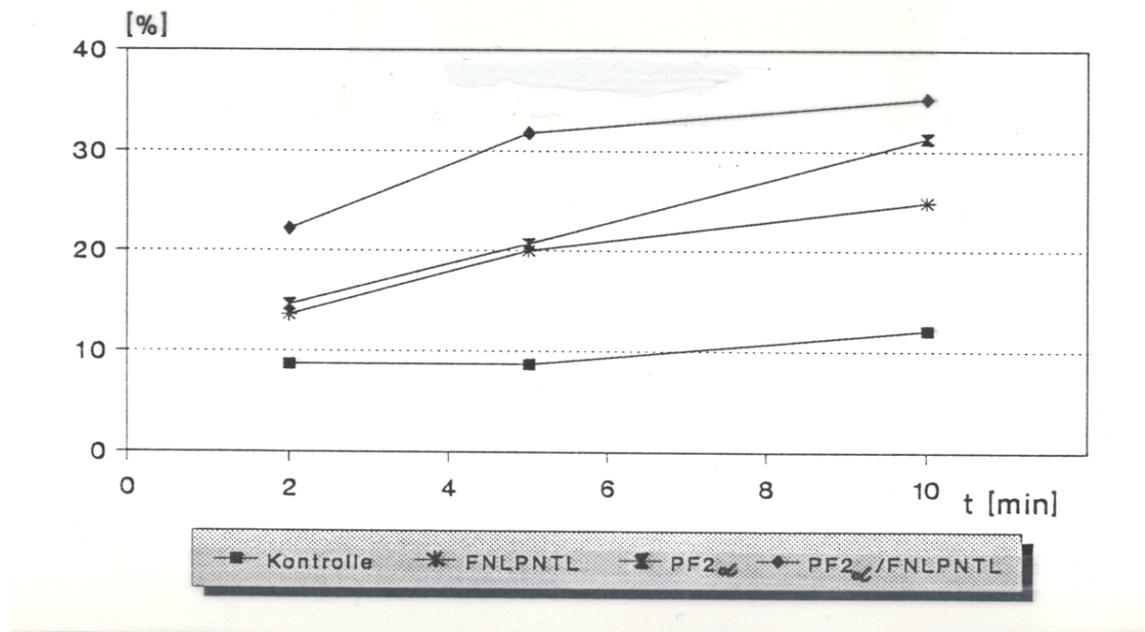
4.3.2. Stimulierung der PMNL mit Prostaglandin F_{2α}

Neben der Stimulierung mit FNLNTL wurden den PMNL auch körpereigene Stoffe zugesetzt. Es wurden Sekretionsversuche mit dem Gewebshormon Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), einem Acharidonsäureabkömmling und Entzündungsmediator [Neumann & Lang, 1989], durchgeführt. Neben der Granulafreisetzung nach PGF_{2α} Zusatz wurde auch untersucht, ob bei gleichzeitiger FNLNTL- Behandlung ein synergistischer oder antagonistischer Effekt in bezug auf die Sekretionsrate auftrat.

Abb. 17 zeigt die Typ-I-Kollagenase-Freisetzung nach Vorinkubation (20 min in Suspension bei 37°C) von 5×10^6 PMNL mit/ohne PGF_{2α} (10^{-6} M) und anschließender Behandlung in Gewebekulturschalen mit FNLNTL (10^{-7} M), PGF_{2α} oder beiden Agentien für 2-10 min (**Standardabweichung**: Typ-I-Kollagenase 3.4 % - 8.7 %).

Wie in Abb. 17 dargestellt, führte die Vorbehandlung mit PGF_{2α} zu einer gegenüber den Kontrollen gesteigerten (6 % - 19.2 %) Granulafreisetzung; bei gleichzeitigem FNLNTL- Zusatz ließ sich in bezug auf die Stimulierung ein synergistischer Effekt der beiden Substanzen feststellen. Die durch beide Agentien induzierte Sekretionsrate lag zwischen 8.3 % - 10.3 % über der, die durch den Zusatz nur eines der Agentien erreicht wurde.

Die Gelatinasefreisetzung unter gleichen Sekretionsbedingungen war unregelmäßig: bei den Zellen einiger Spender war eine Sekretionssteigerung durch Prostaglandin F_{2α}, bei anderen eine leichte Hemmung zu verzeichnen (n= 6-7//6-7 Spender). Die Sekretionsrate PGF_{2α}/FNLNTL-behandelter PMNL zeigte sich ebenso uneinheitlich, so daß eine zusammenfassende Darstellung der Gelatinaseausschüttung unter den beschriebenen Bedingungen nicht möglich war.

Abb. 17 Kollagenasesekretion nach Stimulierung mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ /FNLNPTL

5×10^6 PMNL wurden mit/ohne $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-6}M) in Suspension (20 min/ 37°C) vorinkubiert und nachfolgend in Gewebekulturschalen (2-10 min) mit FNLNPTL (10^{-7}M), $\text{PGF}_{2\alpha}$ oder beiden Agentien behandelt (n=8 // 6 Spender):

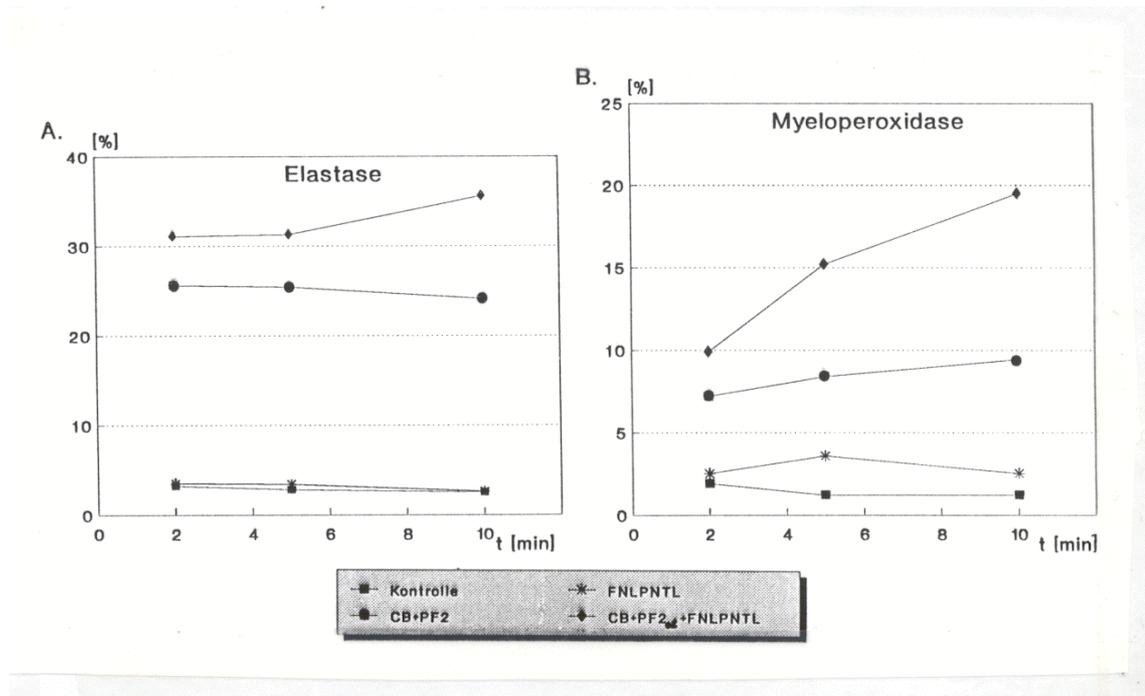
Kontrolle: unbehandelte Kontrollzellen
FNLNPTL: mit FNLNPTL behandelte Zellen
 $\text{PGF}_{2\alpha}$: Vorinkubation und Behandlung der PMNL mit $\text{PGF}_{2\alpha}$
 $\text{PGF}_{2\alpha}$ /FNLNPTL: Zellen, die mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ vorinkubiert und mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ +FNLNPTL behandelt wurden

Eine Freisetzung der den azurophilen Granula zugeordneten Enzyme Elastase und Myeloperoxidase konnte, wie bei Stimulierung mit FNLNPTL, nicht ohne Zerstörung der Mikrofilamente erreicht werden (Daten nicht dargestellt). Die Zugabe von $\text{PGF}_{2\alpha}$ zu CB- bzw. CB/FNLNPTL- behandelten Zellen rief zwar eine Proteinfreisetzung hervor (Abb. 18), die Sekretionswerte lagen jedoch im Bereich der durch CB//FNLNPTL- Stimulation allein erreichten Sekretionsrate (vergl. 4.3.1./Abb. 12/13) (Standardabweichung: Elastasesekretion 1.5 % - 6.8 % // Myeloperoxidasesekretion 2.4 % - 8.1 %).

So ist festzustellen, daß die Freisetzung der azurophilen Granula nach CB- bzw. CB/FNLNPTL- Behandlung nicht oder nur geringfügig durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ gesteigert werden

konnte.

Abb. 18 Elastase-/Myeloperoxidase-Freisetzung nach Stimulierung mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ /FNLNTL



5×10^6 PMNL wurden mit/ohne $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-6}M) in Suspension (20 min/ 37°C) vorinkubiert und nachfolgend in Gewebekulturschalen (2-10 min) mit FNLNTL (10^{-7}M), $\text{PGF}_{2\alpha}$ + CB ($5 \mu\text{g/ml}$) oder allen Agentien behandelt ($n=8 // 6$ Spender):

Kontrolle: unbehandelte Kontrollzellen

FNLNTL: mit FNLNTL behandelte Zellen

CB+ $\text{PGF}_{2\alpha}$: Vorinkubation mit $\text{PGF}_{2\alpha}$, Behandlung der PMNL mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ + CB

CB+ $\text{PGF}_{2\alpha}$ /FNLNTL: Zellen, die mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ vorinkubiert und mit CB + $\text{PGF}_{2\alpha}$ + FNLNTL behandelt wurden

4.3.3. Stimulierung der PMNL mit Leucin-Enkephalin

Über den Einfluß eines bei physischer und psychischer Belastung erhöhten Opiatspiegels im Blut auf PMNL ist wenig bekannt [Freye & Leopold, 1991]. Hier wurde den Zellen das körpereigene Opiat Leucin-Enkephalin (Leu-Enk) zugesetzt; in der Literatur werden Normal-Blutwerte von 65-200 pg Leu-Enk/ml angegeben [Klein, 1987 / Rapoport, 1987].

Die bei den Sekretionsexperimenten verwendeten Leu-Enk Konzentrationen lagen um den Faktor 2.8-7.3 über der oberen Grenze der Normal-Werte im Blut. 5×10^6 PMNL/ml wurden in Suspension mit/ohne Leu-Enk (20 min / 37°C) vorinkubiert, dannach erfolgte die Überführung von 1 ml Portionen in Gewebekulturschalen und die Behandlung mit Leu-Enk, FNLNTL oder beiden Agentien für 10-40 min.

Bei der Stimulierung mit 560 pg/ml (10^{-9} M) Leu-Enk konnte keine Erhöhung der Gelatinase-, Typ-I-Kollagenase oder Laktoferrin-Ausschüttung gegenüber den Kontrollen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

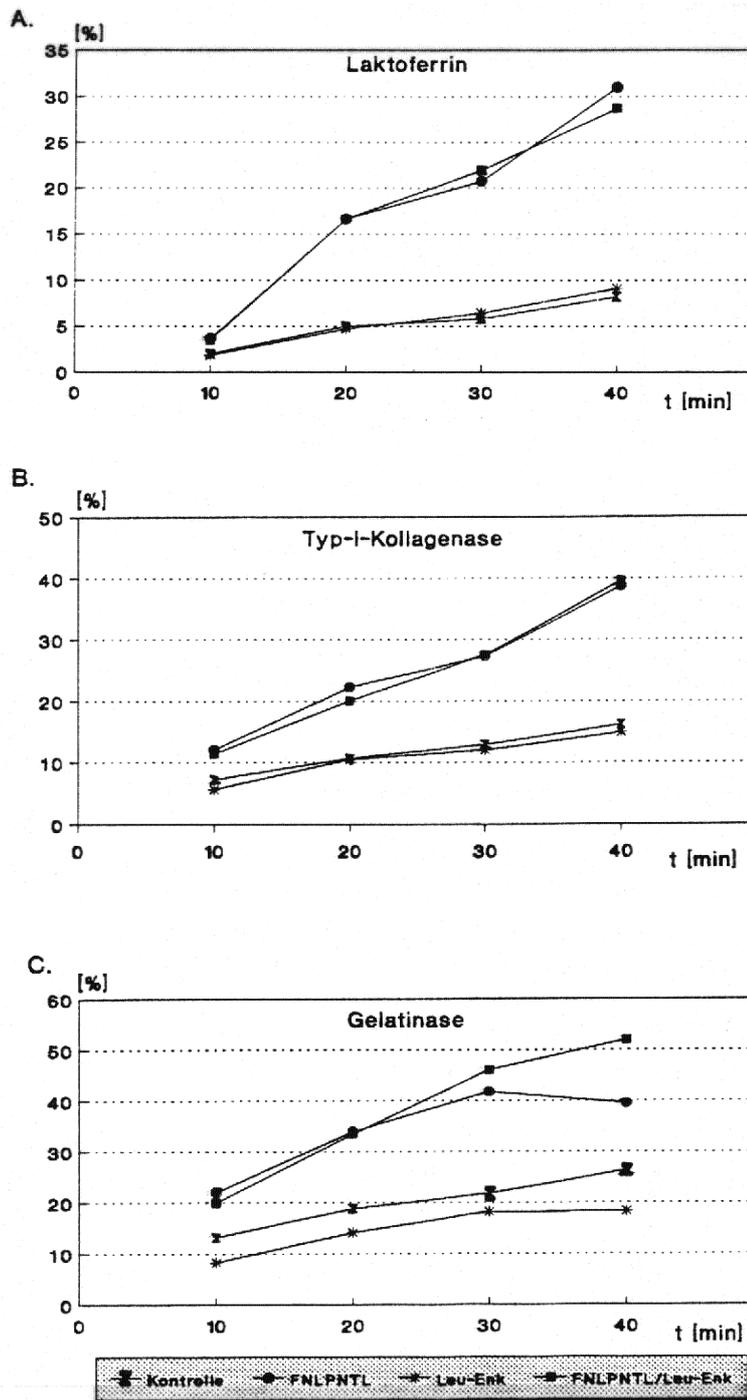
Die Erhöhung der Leu-Enk Konzentration auf 1.45 ng/ml ($= 2.4 \times 10^{-9}$ M) rief ebenfalls keine Sekretionssteigerung hervor, bei der Gelatinase zeigte sich sogar eine leichte Verringerung der Sekretion nach Leu-Enk - Behandlung gegenüber unbehandelten Kontrollzellen.

Auch mit FNLNTL/Leu-Enk behandelte PMNL wiesen gegenüber FNLNTL-stimulierten Zellen keine erhöhte Granulafreisetzung auf (Abb. 19) (**Standardabweichung:** Gelatinasesekretion 2.4 % - 18 % // Typ-I-Kollagenase-sekretion 0.9 % - 20 % // Laktoferrinsekretion 0.4 % - 18 %).

Auffallen war die relativ hohe Typ-I-Kollagenase- bzw. Gelatinase-Ausschüttung durch unbehandelte Kontrollzellen (15 % bzw. 27 % nach 40 min).

Eine Freisetzung der azurophilen Granula durch Inkubation der PMNL mit Leu-Enk konnte ohne CB-Zusatz nicht erreicht werden (Daten nicht dargestellt).

Abb. 19 Proteinfreisetzung nach Stimulierung mit Leucin-Enkephalin



5×10^6 PMNL wurden mit/ohne Leu-Enk ($1.45 \times 10^{-9} M$) in Suspension (20 min/ $37^\circ C$) vorinkubiert und nachfolgend in Gewebekulturschalen mit Leu-Enk, FNLPTL ($10^{-7} M$) oder beiden Agentien behandelt ($n=4-9$ // 4-9 Spender):

Kontrolle: unbehandelte Kontrollzellen
FNLPTL: mit FNLPTL behandelte Zellen
Leu-Enk: Vorinkubation und Behandlung der PMNL mit Leu-Enk
FNLPTL/Leu-Enk: Zellen, die mit Leu-Enk vorinkubiert und mit Leu-Enk+FNLPTL behandelt wurden

4.3.4. Granulafreisetzung phagozytierender PMNL

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Proteinfreisetzung FNLNRTL-stimulierter PMNL während der Phagozytose untersucht. Dazu wurden 4×10^6 PMNL/920 μ l DPBS mit/ohne FNLNRTL (10^{-7} M) für 20 min bei 37°C in Suspension vorinkubiert und dann 980 μ l-Portionen in vorgewärmte Gewebekulturschalen mit 80 μ l opsoniertem (ZyX) oder nicht-opsoniertem Zymosan (Zy) in DPBS (= 2.5×10^7 Partikel) überführt (siehe 3.1.8.).

Nach Ablauf der Inkubationszeit (15 - 60 min) wurden die Zellüberstände abgenommen, zentrifugiert und der Gehalt an Typ-I-Kollagenase, Elastase, Myeloperoxidase und Laktoferrin bestimmt (Abb. 20 A-C).

Es zeigten sich wiederum Unterschiede im Sekretionsmuster der beiden Granula-Typen: Kollagenase (spezifische Granula) wurde bis zu 40 % (ZyX- stimulierte PMNL) sezerniert, dagegen lag die maximale Laktoferrin- bzw. Elastasefreisetzung (azurophile Granula) bei 7 %.

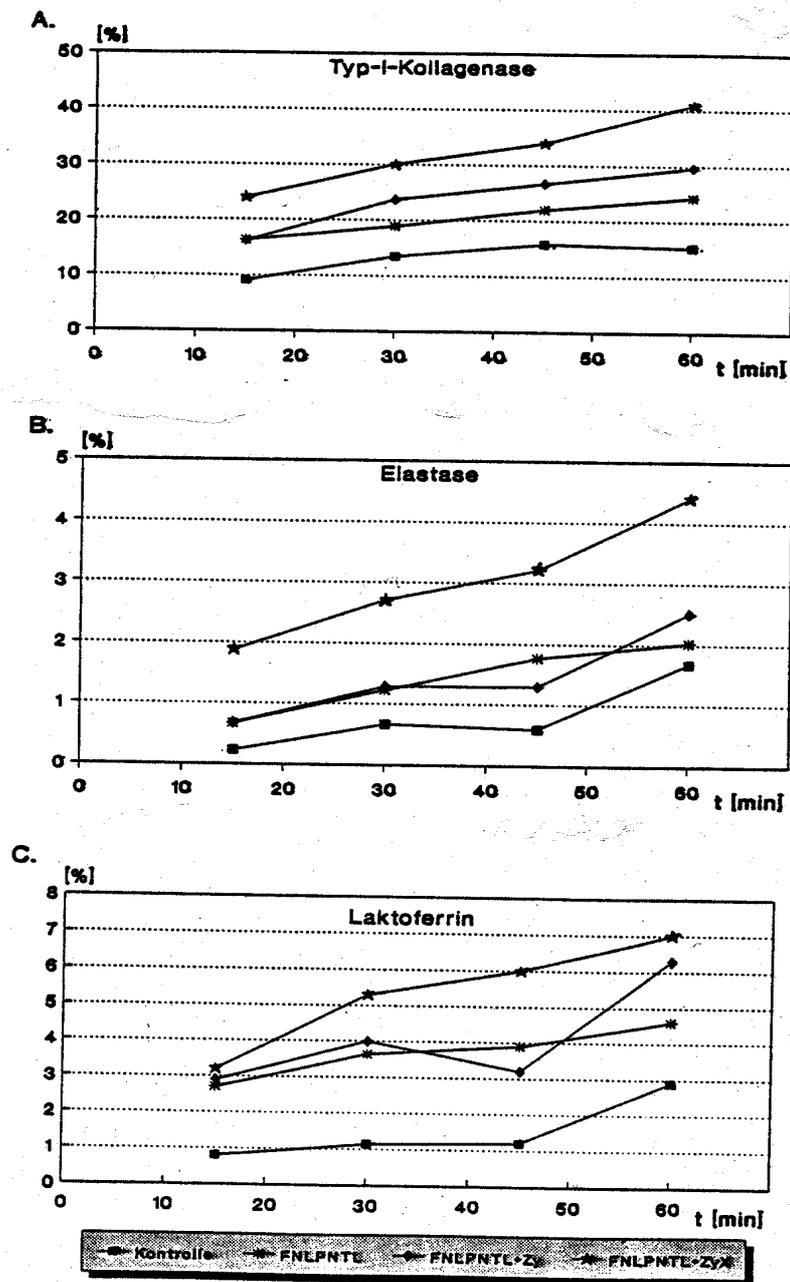
Auffallend war, verglichen mit der Elastase- und Laktoferrinsekretion, die hohe Ausschüttung (> 10 %) von Kollagenase durch unbehandelte Kontrollzellen.

Wie in Abb. 20 dargestellt, bewirkte der Zusatz von opsoniertem-Zymosan zu den Zellen, verglichen mit FNLNRTL oder nicht-opsoniertem Zymosan, die höchste Sekretionssteigerung gegenüber den Kontrollen. Eine deutlich erhöhte Proteinfreisetzung durch Zy/FNLNRTL- behandelte Zellen gegenüber FNLNRTL- behandelten PMNL trat im Untersuchungszeitraum nur in bezug auf die Typ-I-Kollagenase bzw. erst nach 60 min (Laktoferrin) auf.

Eine Myeloperoxidase-Freisetzung > 2.5 % konnte unter den oben beschriebenen Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

Mikroskopische Untersuchungen (Abb. 21 / Abb. 22) zeigten eine rege phagozytotische Aktivität der Zellen, wobei bis zu 13 aufgenommene Zymosan-Partikel in einer Zelle gezählt werden konnten.

Abb. 20 Proteinsekretion durch phagozytierende Granulozyten



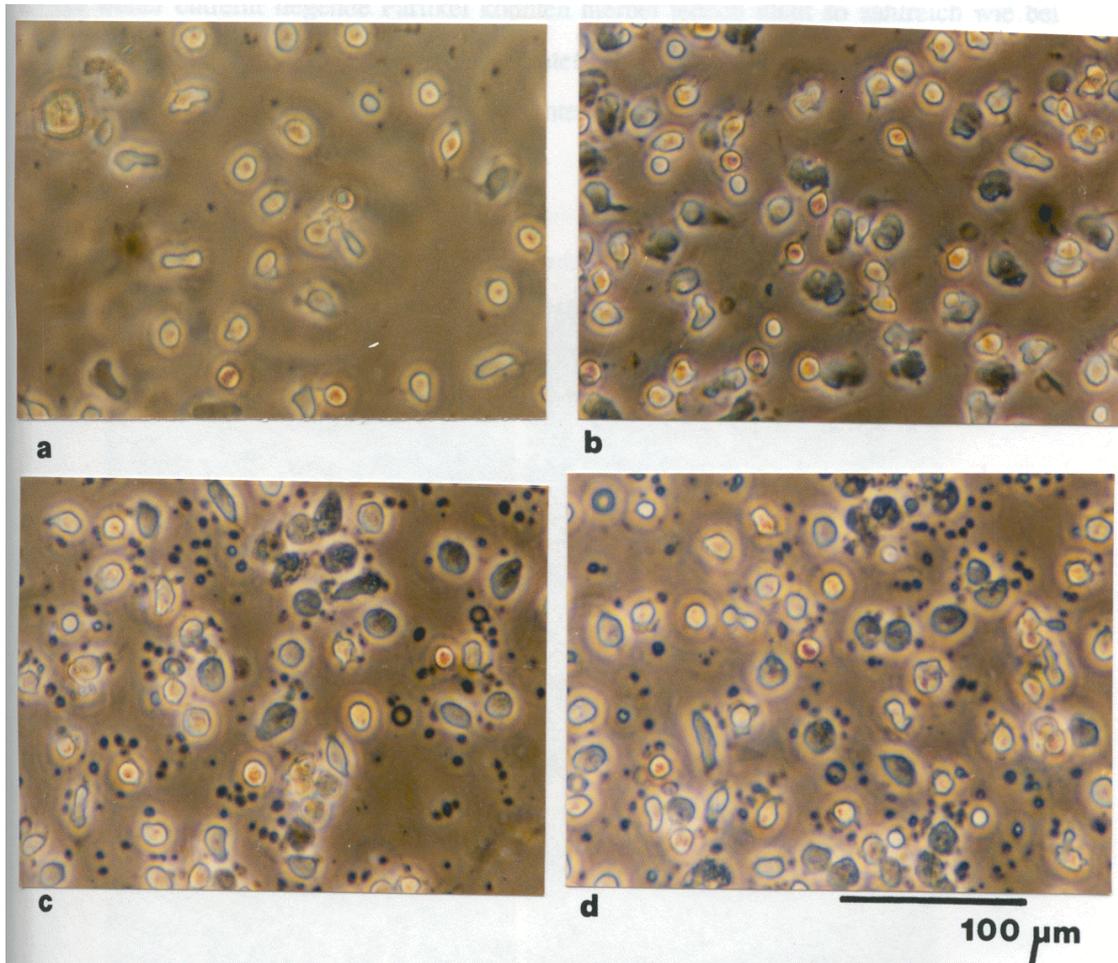
4×10^6 PMNL wurden mit/ohne FNLNPTL ($10^{-7}M$) in Suspension (20 min/ $37^\circ C$) vorinkubiert und nachfolgend in Gewebekulturschalen mit/ohne FNLNPTL und opsoniertem/nicht-opsoniertem Zymosan (2.5×10^7 Partikel) behandelt (n=9-10 // 8-9 Spender):

K: unbehandelte Kontrollzellen

FNLNPTL: mit FNLNPTL vorinkubierte und behandelte Zellen

FNLNPTL+Zy: Vorinkubation der PMNL mit FNLNPTL, Behandlung mit FNLNPTL und nicht opsoniertem Zymosan

FNLNPTL+ZyX: Zellen, die mit FNLNPTL vorinkubiert und dann mit FNLNPTL und opsoniertem Zymosan behandelt wurden



4×10^6 PMNL wurden mit/ohne FNLNPTL ($10^{-7}M$) in Suspension (20 min/ $37^{\circ}C$) vorinkubiert und nachfolgend in Gewebekulturschalen mit/ohne FNLNPTL und opsoniertem/nicht-opsoniertem

Zymosan (2.5×10^7 Partikel) für 30 min behandelt:

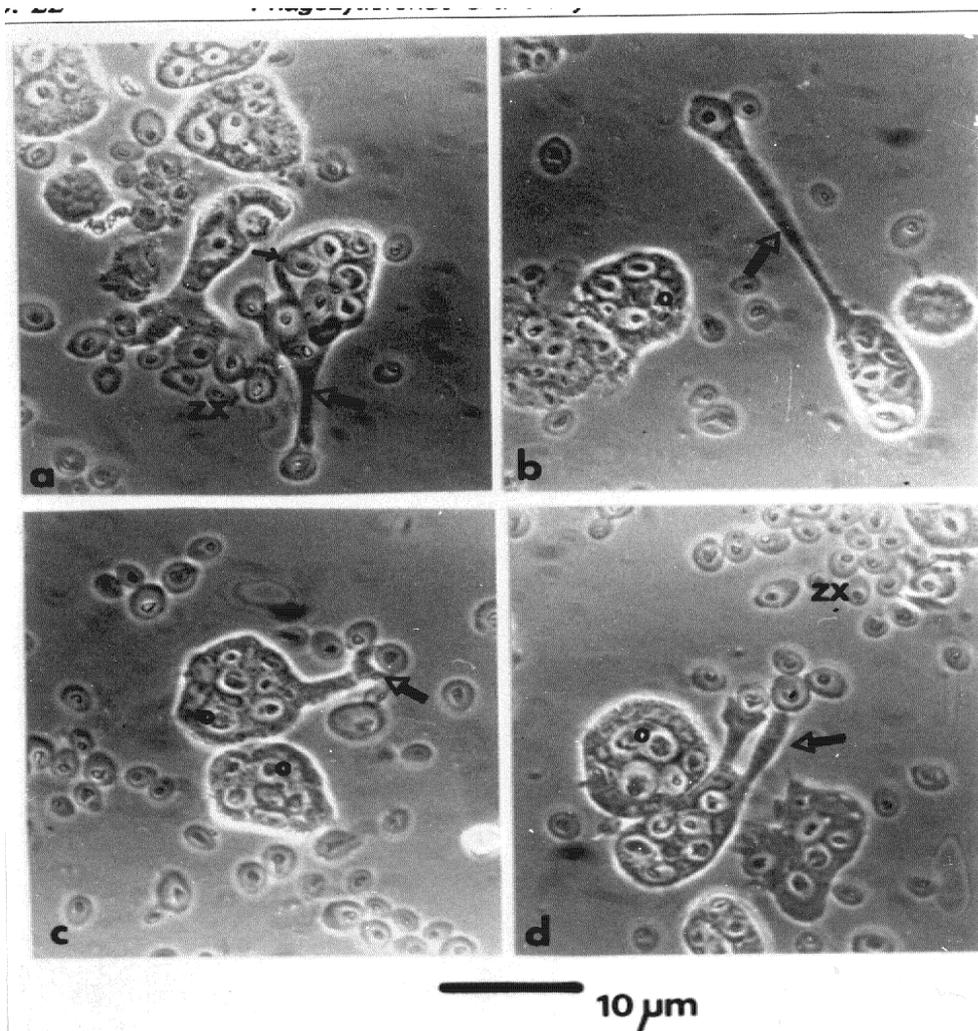
- a: unbehandelte Kontrollzellen
- b: mit FNLNPTL vorinkubierte und behandelte Zellen
- c: Vorinkubation der PMNL mit FNLNPTL, Behandlung mit FNLNPTL und nicht-opsoniertem Zymosan
- d: Zellen, die mit FNLNPTL vorinkubiert und dann mit FNLNPTL und opsoniertem Zymosan behandelt wurden

In Abb. 22 sind die Pseudopodien (\rightarrow) der Granulozyten zu erkennen, mit denen die Zellen die opsonierten Zymosan-Partikel (ZX) einschließen und aufnehmen. In den Zellen sind deutlich die bereits phagozytierten (\rightarrow) und teilweise angedauten Partikel (o) zu erkennen. Auch die Zellen, denen nicht-opsoniertes Zymosan zugesetzt worden

war, hatten zahlreiche Partikel aufgenommen. Die Ausbildung von langen Pseudopodien zu weiter entfernt liegende Partikel konnten hierbei jedoch nicht so zahlreich wie bei Zusatz von opsoniertem Zymosan beobachtet werden.

Weitere rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Phagozytose sind in 4.6.1. dargestellt.

Abb. 22 *Phagozytierende Granulozyten*



Phagozytose FNLNTL-stimulierter PMNL nach Zusatz (30 min) von opsoniertem Zymosan
ZX: Zymosanpartikel
 --- : Aufnahme der Partikel durch die Zellen
 o : teilweise "verdaute" Partikel

4.3.5. Granulafreisetzung durch PMNL nach Erhöhung des cAMP-Spiegels durch Hemmung der Phosphodiesterase

In den in diesem Abschnitt dargestellten Sekretionsexperimenten wurde untersucht, ob sich nach Hemmung der Proteinfreisetzung durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels ebenfalls Unterschiede im Sekretionsmuster der untersuchten Enzyme zeigten. Der Eingriff in die intrazelluläre Signaltransduktion wurde durch Zusatz von Zardaverin (10^{-7}M), einem spezifischen Inhibitor der Phosphodiesterase, bei gleichzeitiger FNLNTL-Stimulierung erreicht [Galvan & Schudt, 1990]. Auch die Hemmbarkeit der CB/FNLNTL- induzierten Granulafreisetzung wurde in einer weiteren Versuchsreihe überprüft.

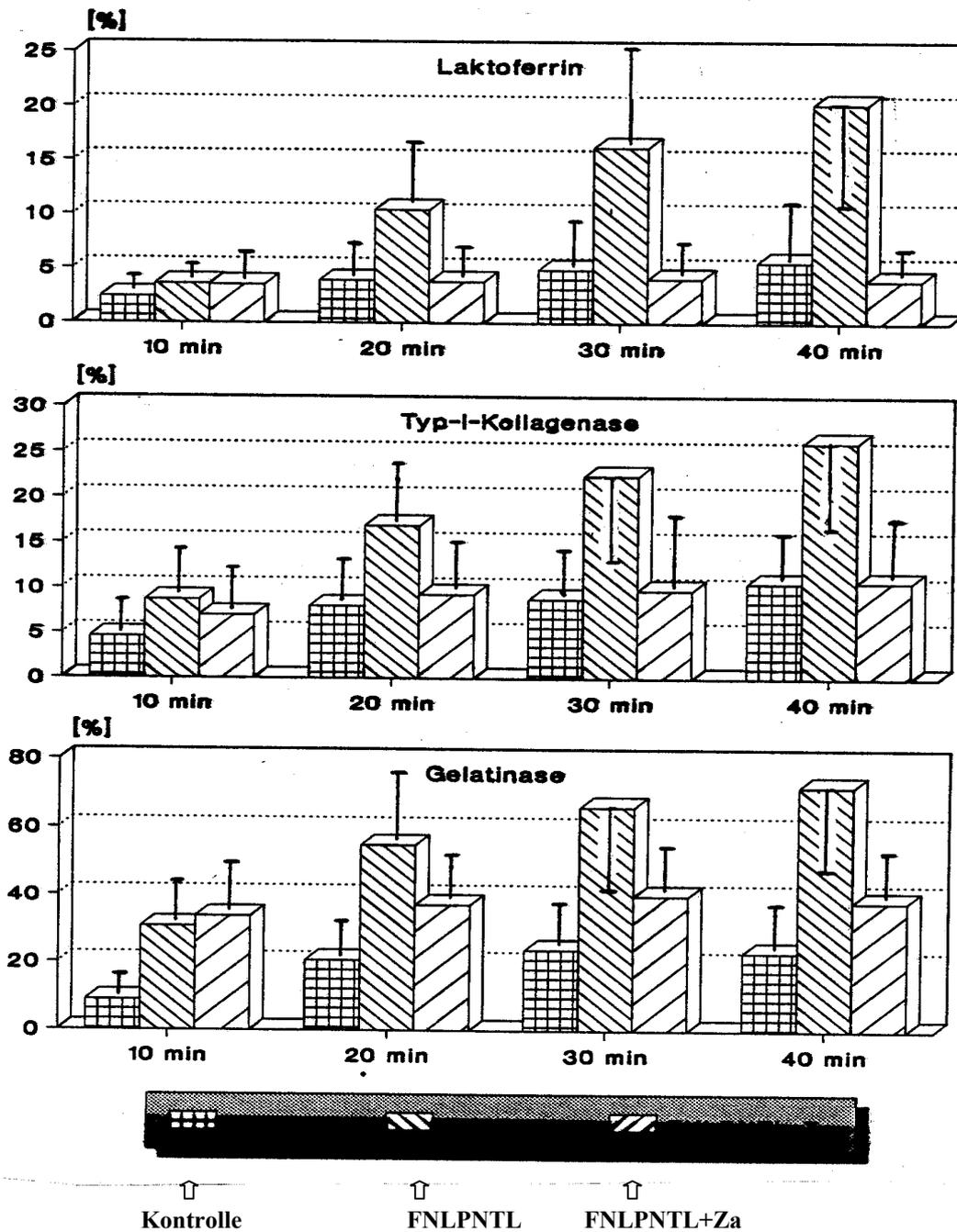
5×10^6 PMNL wurde bei der 20-minütigen Inkubation in Suspension 5 min der Phosphodiesterase-Inhibitor Zardaverin (10^{-5}M) zugesetzt; anschließend wurden die Granulozyten in Gewebekulturschalen überführt und mit/ohne FNLNTL (10^{-7}M) und Zardaverin (10^{-5}M) für 10-40 min behandelt.

Dabei zeigte sich schon nach 20 min eine 86- bzw. 100 %-ige Inhibierung der durch FNLNTL stimulierten Typ-I-Kollagenase- bzw. Laktoferrin-Sekretion, d.h. ein Rückgang bis auf bzw. unter den Kontrollwert (Tab. 4). Die FNLNTL-induzierte Gelatinasesekretion ließ sich unter diesen Bedingungen um maximal 70 % hemmen (Abb. 23 / Tab. 4).

Während die durch FNLNTL-Stimulierung erzeugte Granulafreisetzung in dem untersuchten Zeitraum um bis zu 41 % (Gelatinase) anstieg, veränderte sich die Sekretionsrate nach FNLNTL/Zardaverin-Zusatz kaum (maximal um 4 %).

Deutlich zeigten sich wiederum die Unterschiede bei der durch das Formyl-Peptid hervorgerufenen Freisetzung (22 % - 52 %) von Typ-I-Kollagenase, Laktoferrin und Gelatinase.

Abb. 23 Hemmung der Granulafreisetzung FNL PNTL-stimulierter PMNL nach Zardaverinzusatz



Granulafreisetzung von 5×10^6 PMNL nach Vorinkubation mit/ohne Zardaverine ($10^{-5} M$) in Suspension (5 min/ $37^\circ C$) und anschließender Behandlung (10-40 min) mit FNL PNTL ($10^{-7} M$) oder Zardaverin/FNL PNTL+Za in Gewebekulturschalen ($n=10-12 // 10-12$ Spender):

Kontrolle: unbehandelte Kontrollzellen

FNL PNTL: mit FNL PNTL behandelte Zellen

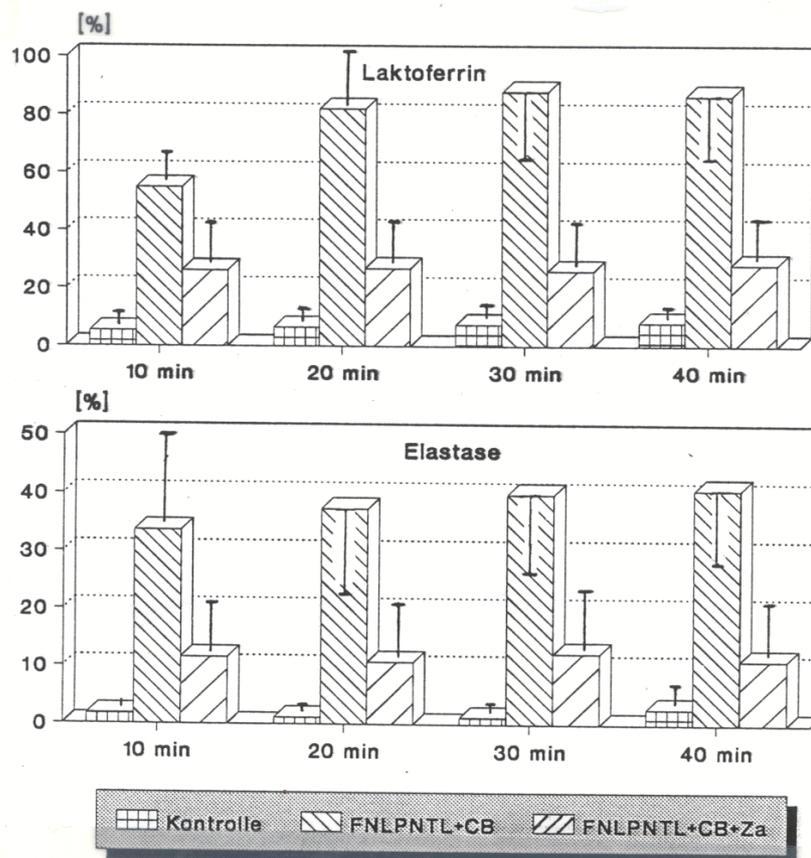
FNL PNTL+Za: mit Zardaverin vorinkubierte und mit FNL PNTL/Zardaverin behandelte PMNL

4. Ergebnisse

Auch die durch CB/FNLPNTL-Behandlung erreichte Granulafreisetzung ließ sich durch Zardaverin-Zusatz um 58 % - 78 % hemmen (Abb. 24 / Tab. 4).

Hierbei veränderte sich die Elastasefreisetzung durch CB/FNLPNTL-behandelte Zellen im Untersuchungszeitraum kaum (7.3 %), die Laktoferrinsekretion stieg dagegen um > 30 % an. Die durch Zardaverin-Zusatz verringerte Granulafreisetzung blieb innerhalb der 30 min weitgehend konstant.

Abb. 24 *Hemmung der CB/FNLPNTL-induzierten Proteinfreisetzung durch Zardaverin*



Granulafreisetzung von 5×10^6 PMNL nach Vorinkubation (5 min) mit/ohne Zardaverin ($10^{-5} M$) und CB (5 μ g/ml/20 min) in Suspension bei $37^\circ C$ und anschließender Behandlung (10-40 min) mit CB/FNLPNTL ($10^{-7} M$) oder Zardaverin/CB/FNLPNTL in Gewebekulturschalen ($n=10 // 10$ Spender):

Kontrolle: unbehandelte Kontrollzellen
FNLPNTL+CB: mit CB vorinkubierte und CB/FNLPNTL behandelte Zellen
FNLPNTL+CB+Za: mit Zardaverin/CB vorinkubierte und mit CB/FNLPNTL/Zardaverin behandelte PMNL

4. Ergebnisse

In Tab. 4 ist die jeweilige prozentuale Hemmung der FNLNTL-induzierten Proteinsekretion (d.h. abzüglich des Kontrollwertes) zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgeführt.

Tab. 4 *Hemmung des Granulafreisetzung durch Behandlung mit 10⁻⁵M Zardaverin*

Protein	Hemmung der FNLNTL-induzierten Sekretion			
	10 min	20 min	30 min	40 min
Gelatinase	+ 13.8 % *	- 15.9 %	- 51.9 %	- 69.4 %
Kollagenase	- 41.5 %	- 85.7 %	- 92.6 %	- 99.4 %
Laktoferrin	- 8.3 %	- 102.0 %	- 107.4 %	- 112.0 % *
Protein	Hemmung der CB/FNLNTL-induzierten Sekretion			
	10 min	20 min	30 min	40 min
Laktoferrin	- 58.0 %	- 73.0 %	- 77.0 %	- 74.6 %
Elastase	- 69.2 %	- 73.4 %	- 71.3 %	- 77.9 %

* ein Wert über -100 % zeigt die Senkung der FNLNTL-induzierten Sekretionsrate durch Zardaverin-Zusatz unter den Kontrollwert an, positive Werte eine Sekretionssteigerung durch Zardaverin-Zusatz.

Berechnung der Sekretionshemmung (y) :

$$y = \frac{100}{a} \times b - 100$$

a= FNLNTL-induzierter Sekretionswert abzüglich des Kontrollwertes

b= Sekretionswert nach FNLNTL/Zardaverin-Zusatz abzüglich des Kontrollwertes

Der sekretionshemmende Effekt eines erhöhten cAMP-Spiegels (nach 40 min) in Abhängigkeit von der Konzentration des Phosphodiesteraseinhibitors Zardaverin wurde

4. Ergebnisse

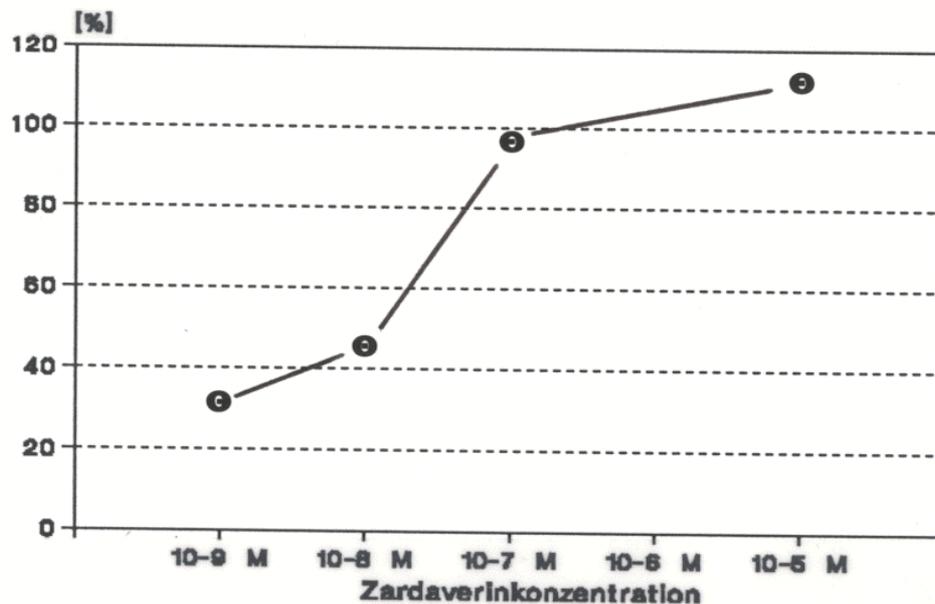
ebenfalls (am Beispiel Laktoferrins) überprüft (Abb. 25); Versuchsdurchführung und Berechnung der Sekretionshemmung erfolgten wie beschrieben.

Schon bei einer Zardaverinkonzentration von 10^{-7} M war eine nahezu vollständige Inhibierung der Laktoferrinsekretion festzustellen.

Dabei stieg die Hemmung der Formyl-Peptid-induzierten Freisetzung durch Erhöhung der Zardaverinkonzentration von 10^{-8} M auf 10^{-7} M um ca. 50 % an, bei der Erhöhung von 10^{-9} M auf 10^{-8} M war dagegen nur eine Erhöhung um 15 % zu verzeichnen.

Im Vergleich dazu ließ sich die Gelatinaseausschüttung auch bei einer InhibitorKonzentration von 10^{-5} M nicht vollständig hemmen (Tab. 4).

Abb.25 *Hemmung der FNLNTL-induzierten Laktoferrinsekretion in Abhängigkeit von der Zardaverinkonzentration*



Inhibierung der FNLNTL-induzierten Laktoferrinsekretion nach Vorinkubation und Behandlung (40 min) der PMNL mit unterschiedlichen Zardaverinkonzentrationen (10^{-9} M - 10^{-5} M) (n= 5-10 / 5-8 Spender).

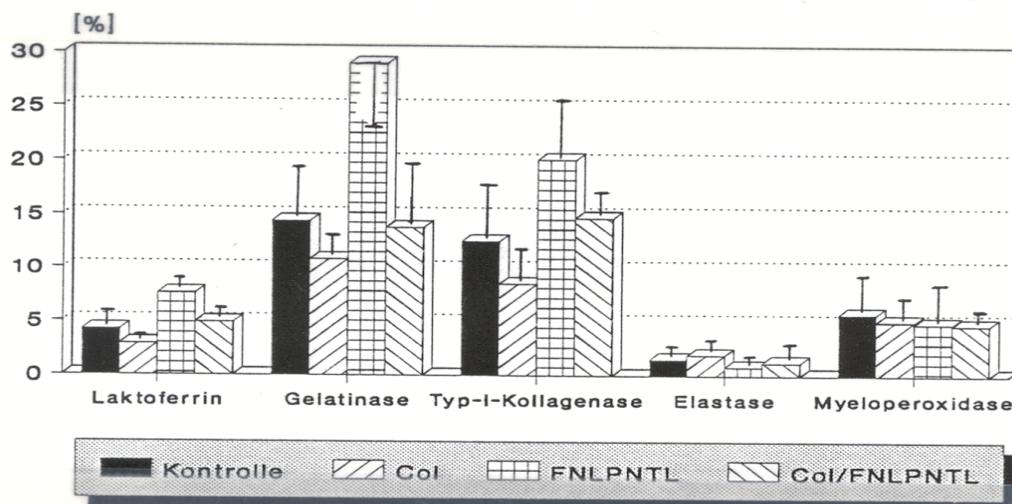
4.3.6. Protein-/Enzymfreisetzung nach Zerstörung der Mikrotubuli

Neben dem Einfluß der Mikrofilamente auf die Granulafreisetzung wurde auch die Sekretionsrate der PMNL nach Zerstörung der Mikrotubuli untersucht. Hierzu wurden die Zellen, analog zur CB-Behandlung, mit dem Mikrotubuli-depolymerisierenden Agens Colcemid (Col) behandelt [Wilson et al., 1974].

In Abb. 26 ist das Sekretionsmuster der untersuchten Proteine nach 20-minütiger Vorinkubation der PMNL mit/ohne Colcemid (5 $\mu\text{g/ml}$) und anschließender Behandlung mit FNLNTL (10^{-7} M) aufgetragen.

Lichtmikroskopische Untersuchungen belegten, daß Colcemid-behandelte Zellen eine veränderte Morphologie aufwiesen: nach Col-Zusatz zeigten die PMNL nur teilweise eine sphärische Morphologie. Mit Col-vorinkubierte und Col/FNLNTL-behandelte PMNL zeigten keine anterior-posterior verlaufende Polarisierung und bildeten sog. "blebs" auf ihrer Oberfläche aus.

Abb. 26 Sekretionshemmung durch Zerstörung der Mikrotubuli



Proteingehalt im Überstand von 5×10^6 PMNL nach Vorinkubation der Zellen in Suspension (20 min/37°C) mit/ohne Colcemid (5 $\mu\text{g/ml}$) und anschließender Behandlung (10 min) mit Col, FNLNTL (10^{-7} M) oder beiden Agentien in Gewebekulturschalen ($n=13 // 6$ Spender):

Kontrolle: unbehandelte Kontrollzellen

Col: mit Colcemid vorinkubierte/behandelte Zellen

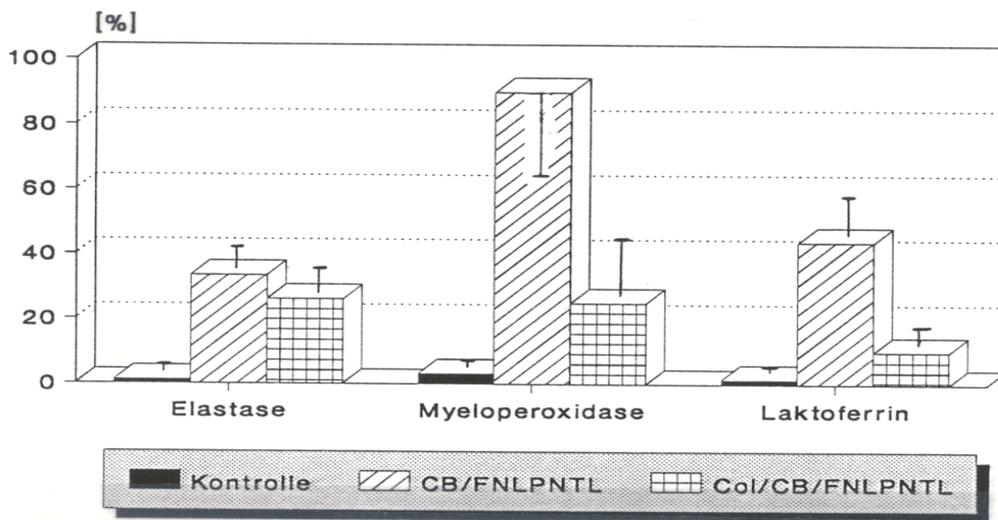
FNLNTL: mit FNLNTL behandelte Zellen

Col/FNLNTL: mit Col vorinkubierte und mit Col+FNLNTL behandelte PMNL

In bezug auf die Laktoferrin-, Typ-I-Kollagenase- und Gelatinase-Ausschüttung konnte eine Hemmung der FNL/PNTL-induzierten Sekretion von 100 % (d.h. bis auf den Kontrollwert) durch Colcemid-Zusatz erreicht werden. Auch die Protein-Freisetzung un behandelter Kontrollen wurde durch Zerstörung der Mikrotubuli reduziert.

Abb. 27 zeigt, daß auch die durch CB/FNL/PNTL-Inkubation erreichte Granula-freisetzung durch Colcemid stark verringert wurde. Besonders deutlich war dieser Sekretionsrückgang in bezug auf die Myeloperoxidase.

Abb. 27 *Sekretionshemmung CB/FNL/PNTL-behandelter Zellen durch Zerstörung der Mikrotubuli*



Proteingehalt im Überstand von 5×10^6 PMNL nach Vorinkubation der Zellen in Suspension (20 min/37°C) mit CB und Colcemid (5 µg/ml) und anschließender Behandlung (10 min) mit CB/Col und FNL/PNTL (10^{-7} M) Gewebekulturschalen (n= 25-26 // 14-15 Spender):

Kontrolle: unbehandelte Kontrollzellen

CB/FNL/PNTL: mit CB vorinkubierte und CB+FNL/PNTL behandelte Zellen

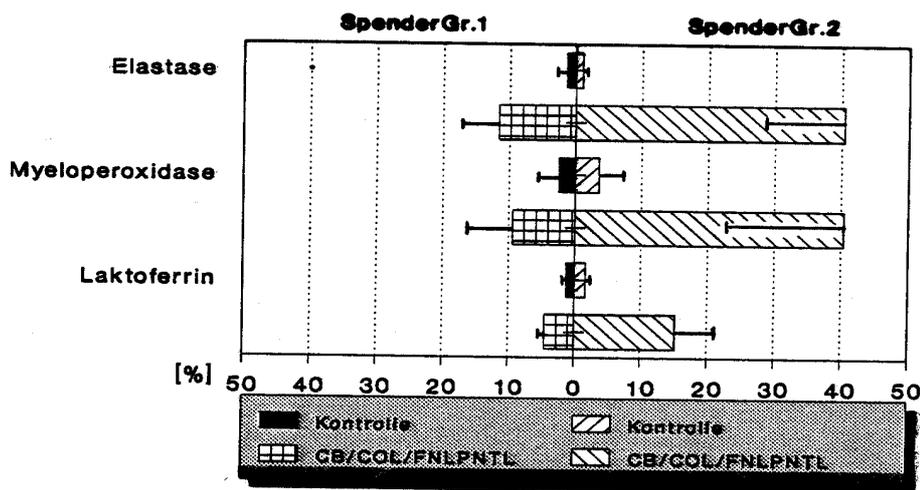
CB/FNL/PNTL/Col: mit Col+CB vorinkubierte und Col+CB+FNL/PNTL behandelte Zellen

Auffallend bei dieser Versuchsreihe war dabei eine Gruppe von 4 Spendern (Spendergruppe 2), bei denen sich, im Gegensatz zu den Zellen weiterer 11 Spender (Spendergruppe 1), ein wesentlich geringerer Sekretions-hemmender Effekt durch

Colcemid-Behandlung zeigte. Bei den Zellen der Spendergruppe 2 ließ sich die Elastase-Ausschüttung fast nicht hemmen, und auch die Sekretionwerte der beiden anderen Enzyme lagen über denen der Spendergruppe 1. Diese Abweichung bei der durch Col hervorgerufenen Sekretionshemmung konnte in mehreren Experimenten mit den PMNL dieser Spender (2-3 verschiedene Aufarbeitungen/12-15 Tests) reproduziert werden.

In Abb. 28 sind die Ergebnisse nach CB/Col/FNLPNTL- Behandlung in bezug auf die beiden Spendergruppen gegenübergestellt.

Abb. 28 Vergleich von zwei Spendergruppen in bezug auf die Colcemid-induzierten Sekretionshemmung CB/FNLPNTL-behandelter Zellen



Proteingehalt im Überstand von 5×10^6 PMNL nach Vorinkubation der Zellen in Suspension (20 min/37°C) mit Colcemid und CB (5 $\mu\text{g/ml}$) und anschließender Behandlung (10 min) mit Col/CB und FNLPNTL (10^{-7}M) in Gewebekulturschalen

(n=16-20 // 10-11 Spender Gr.1) (n=12-15 // 4 Spender Gr.2):

Kontrolle: unbehandelte Kontrollzellen

CB/Col/FNLPNTL: mit CB/Col vorinkubierte und mit CB/Col/FNLPNTL behandelte Zellen

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Zerstörung der Mikrotubuli zu einem fast vollständigen Rückgang der FNLPNTL-induzierten Sekretion auf die Kontrollwerte führte. Auch die Protein-Freisetzung von Kontrollzellen und CB/FNLPNTL-behandelten PMNL konnte durch Colcemid Behandlung erheblich reduziert werden.

4.3.7. Untersuchungen zur Anheftung von PMNL

4.3.7.1. Anheftungsrate der Zellen nach Stimulierung

Der Zusatz von stimulierenden Agentien (z.B. Formyl-Peptide) zu neutrophilen Granulozyten bedingt neben einer Sekretionssteigerung auch die Reorganisation der Mikrofilamente [White et al., 1983], die eng mit der Motilität bzw. Anheftung der Zellen an ein Substrat verbunden ist [Fechtheimer & Zigmond, 1983].

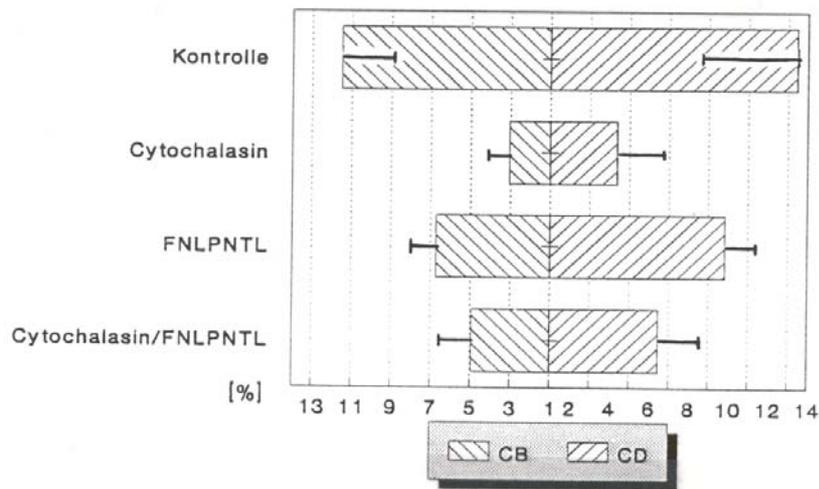
In diesem Zusammenhang wurde die Anheftungsrate der PMNL nach $\text{PGF}_{2\alpha}$ FNLNTL- und Cytochalasin B/Cytochalasin D- Zusatz untersucht. Zur Bestimmung der Anheftungsrate wurde nach Versuchsaufbau der Überstand abgenommen, zentrifugiert und die nicht anhaftenden/abgelösten PMNL im Überstand ausgezählt (siehe 3.1.7.).

Abb. 29 zeigt den prozentualen Anteil nicht angehefteter Granulozyten, bezogen auf 5×10^6 PMNL, nach CB/CD-, FNLNTL- und CB/CD+FNLNTL- Behandlung (Versuchsdurchführung und Sekretionsrate siehe 4.3.1./Abb. 12/13). Dabei war eine Steigerung der Anheftung CB/CD-behandelter Zellen gegenüber unbehandelten Kontrollzellen um 70 % zu verzeichnen (von 673.000 nicht angehefteter PMNL bei den Kontrollen, auf 152.500 PMNL nach Chalasane-Zusatz).

Die Stimulierung mit FNLNTL verringerte die Zahl nicht angehefteter Zellen gegenüber den Kontrollen um 27 % - 43 % (180.000 - 240.000 PMNL = 3.6 - 4.8 % in bezug auf die Gesamtzellzahl). Ein synergistischer Einfluß bei gleichzeitigem Zusatz von Cytochalasin und FNLNTL zeigte sich dabei jedoch nicht.

Im Gegensatz zur Anheftungs-steigernden Wirkung des Formyl-Peptids und den Cytochalasinen konnte in bezug auf eine $\text{PGF}_{2\alpha}$ Anheftungs-verringemde Wirkung festgestellt werden (Versuchsdurchführung und Sekretionsrate siehe 4.3.2./Abb. 17). Die Anheftungsrate der Zellen nach Vorinkubation und Zusatz von $\text{PGF}_{2\alpha}$ nach 10 min war gegenüber dem Kontrollwert um 5 % erhöht, ließ sich aber durch gleichzeitige Inkubation mit FNLNTL verringern (Abb. 30).

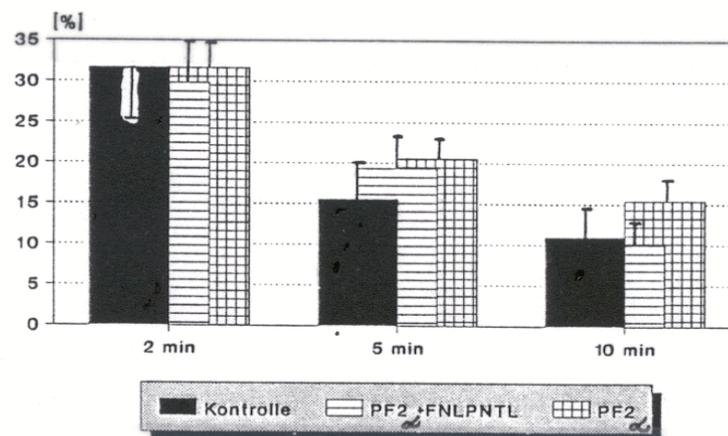
Abb. 29 Anheftungsrate CB/CD- und FNLNPTL- behandelter Granulozyten



Anheftungsrate von 5×10^6 PMNL nach Vorinkubation der Zellen in Suspension (20 min/37°C) ohne Agens und anschließender Behandlung (10 min) mit Cytochalasin B/D (5 μ g/ml), FNLNPTL (10^{-7} M) oder beider Agentien in Gewebekulturschalen (n=9 // 7=Spender):

- Kontrolle:** unbehandelte Kontrollzellen
- Cytochalasin:** mit CB/CD behandelte Zellen
- FNLNPTL:** mit FNLNPTL behandelte Zellen
- Cytochalasin/FNLNPTL:** mit CB/CD+FNLNPTL behandelte PMNL

Abb. 30 Anheftungsrate neutrophiler Granulozyten nach Stimulierung mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ /FNLNPTL



5×10^6 PMNL wurden mit/ohne $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-6} M) in Suspension (20 min/37°C) vorinkubiert und nachfolgend in Gewebekulturschalen (2-10 min) mit FNLNPTL (10^{-7} M), $\text{PGF}_{2\alpha}$ oder beider Agentien behandelt (n=10 // 7 Spender):

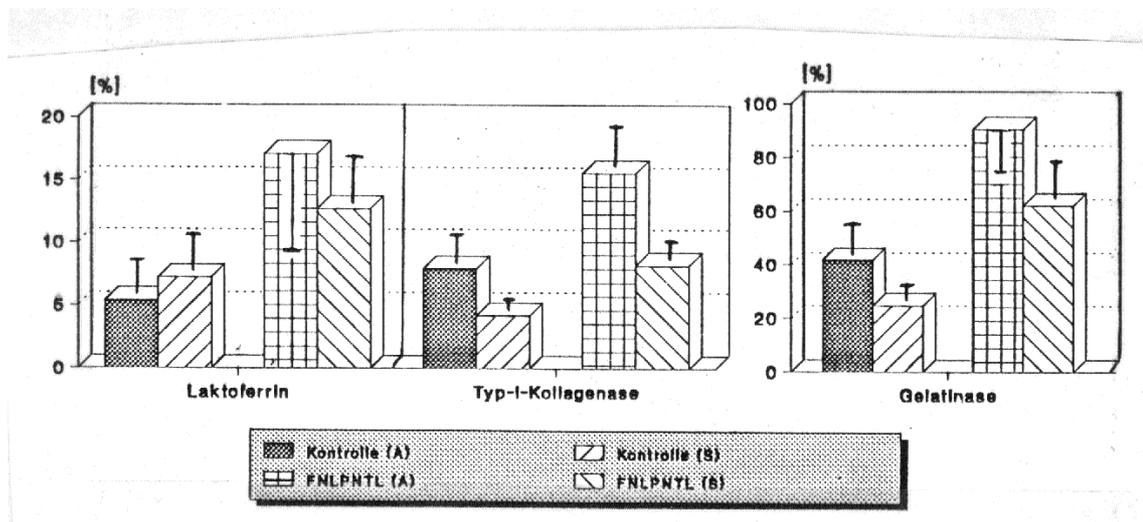
- Kontrolle:** unbehandelte Kontrollzellen
- $\text{PGF}_{2\alpha}$:** Vorinkubation und Behandlung der PMNL mit $\text{PGF}_{2\alpha}$
- $\text{PGF}_{2\alpha}$ /FNLNPTL:** Zellen, die mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ vorinkubiert und mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ +FNLNPTL behandelt wurden

4.3.7.2. Proteinsekretion angehefteter/suspendierter PMNL

Neben der Anheftungsrate stimulierter PMNL wurde auch untersucht, ob angeheftete PMNL (in Gewebekulturschalen) verglichen mit nicht-angehefteten Zellen (in Suspension) eine unterschiedliche Sekretionsrate aufwiesen. Dazu wurden 5×10^6 PMNL in Suspension vorinkubiert und dann für 30 min in Gewebekulturschalen oder Suspension mit/ohne FNLPTL ($10^{-7}M$) stimuliert. Auch die Granulafreisetzung durch angeheftete/suspendierte Granulozyten nach CB/FNLPTL-Behandlung wurde untersucht.

Wie in Abb. 31 dargestellt, lag die Sekretionsrate angehefteter PMNL in bezug auf Typ-I-Kollagenase und Gelatinase (spezifische Granula/C-Partikel) deutlich über der von nicht angehefteten Zellen. Auch die Laktoferrin-Ausschüttung stimulierter Granulozyten zeigte sich durch Anheftung erhöht, bei den Kontrollzellen jedoch leicht erniedrigt.

Abb. 31 Unterschiede in der Granulafreisetzung angehefteter und suspendierter PMNL nach FNLPTL-Stimulierung



5×10^6 PMNL wurden in Suspension (20 min/37°C) inkubiert und nachfolgend in Gewebekulturschalen oder in Suspension 30 min mit/ohne FNLPTL ($10^{-7}M$) behandelt ($n=10-14$ // 5 Spender):

Kontrolle (A): unbehandelte, angeheftete Kontrollzellen

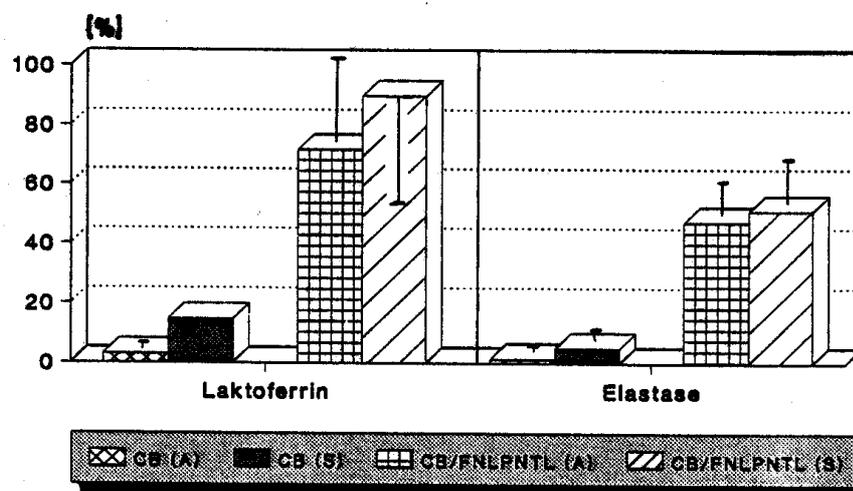
Kontrolle (S): unbehandelte PMNL in Suspension

FNLPTL (A): angeheftete Zellen / FNLPTL behandelt

FNLPTL (S): suspendierte Zellen / FNLPTL behandelt

Im Gegensatz dazu lag die Sekretionsrate der Proteine Elastase und Laktoferrin durch angeheftete CB/FNLPNTL-behandelte Zellen unter der suspendierter PMNL (Abb. 32).

Abb. 32 Unterschiede in der Granulafreisetzung angehefteter und suspendierter PMNL nach CB/FNLPNTL-Behandlung



5×10^6 PMNL wurden in Suspension (20 min/37°C) mit CB (5µg/ml) vorinkubiert und nachfolgend in Gewebekulturschalen oder in Suspension 30 min mit/ohne FNLPNTL ($10^{-7}M$) und CB behandelt (n=14-15 // 5 Spender):

CB (A): mit CB vorinkubierte/behandelte angeheftete Zellen

CB (S): mit CB vorinkubierte/behandelte PMNL in Suspension

CB/FNLPNTL (A): angeheftete Zellen // CB/FNLPNTL behandelt

CB/FNLPNTL (S): suspendierte Zellen // CB/FNLPNTL behandelt

Bei der hier durchgeführten Versuchsreihe zeigte sich wiederum für alle untersuchten Proteine ein voneinander abweichendes Sekretionsmuster: während nach 30-minütiger FNLPNTL-Behandlung angehefteter PMNL bereits nahezu 90 % des Gelatinase-Gehalts von den Zellen freigesetzt wurde, betrug die Sekretionsrate von Laktoferrin bzw. Typ-I-Kollagenase unter diesen Bedingungen nur 17.1 % bzw. 15.6 %. Auch die Elastase- und Laktoferrin-Freisetzung differierte nach CB//FNLPNTL-Behandlung um bis zu 38 %.

4.4. Zusammenfassung der Sekretionsergebnisse

Die unter 4.3. beschriebenen Sekretionsversuche zeigten in bezug auf die Degranulation spezifischer Granula/C-Partikel eine gute Stimulierbarkeit der PMNL durch das Formyl-Peptid FNLNTL. Eine weitreichende Freisetzung der Laktoferrin-, besonders aber der Elastase- bzw. Myeloperoxidase- enthaltenen Kompartimente konnte jedoch erst nach Zerstörung der Mikrofilamente durch Cytochalasin B/D erreicht werden; eine solche Behandlung steigerte auch die Gelatinase-Ausschüttung (C-Partikel/spezifische Granula).

Der Zusatz des körpereigenen Gewebshormons Prostaglandin $F2_{\alpha}$ zu den PMNL rief eine Freisetzung der spezifischen Granula hervor, die Degranulation der azurophilen Granula dagegen nicht. Auch eine eindeutige Steigerung der CB bzw. CB/FNLNTL-induzierten Freisetzung von Myeloperoxidase und Elastase durch $PGF_{2\alpha}$ -Zusatz konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Induzierung der Granulafreisetzung konnte durch Behandlung der Zellen mit verschiedenen Leucin-Enkephalin-Konzentrationen nicht erreicht werden.

Während der Phagozytose wurden bis zu 41 % des Typ-I-Kollagenase-, dagegen nur maximal 4.6 % bzw. 7 % des Elastase- bzw. Laktoferringehalts sezerniert. Es zeigte sich nach FNLNTL/Zymosan-Behandlung eine geringere Laktoferrinausschüttung als die, die durch CB/FNLNTL induziert werden konnte (4.3.1./4.3.3./4.3.5.).

Nach FNLNTL bzw. CB/FNLNTL-Behandlung zeigte sich, wie auch nach Zusatz von Leucin-Enkephalin und Prostaglandin $F2_{\alpha}$, für alle untersuchten Proteine/Enzyme ein unterschiedliches Sekretionsmuster. Dabei war eine relativ hohe Freisetzung von spezifischen Granula bzw. C-Partikeln durch unbehandelte Kontrollzellen zu verzeichnen.

Auffallend war, daß die CB/FNLNTL-induzierte Elastasesekretion in einem Zeitraum von 2 - 40 min mit ca. 40 % konstant blieb; die Freisetzung der anderen untersuchten

Proteine stieg in diesem Zeitraum um ca. 20 % - 45 % an.

Sowohl die durch FNLNTL- als auch die durch CB/FNLNTL- Zusatz hervorgerufene Granulafreisetzung wurde durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels (Zardaverin-Zusatz) stark gehemmt, jedoch war dabei für die untersuchten Proteine ein unterschiedliches Ausmaß der Inhibierung zu verzeichnen (maximal 69 % - 112 %).

Nach FNLNTL-Stimulierung angehefteter/suspendierter PMNL war festzustellen, daß die spezifischen Granula/C-Partikel durch angeheftete Zellen stärker freigesetzt wurden als durch suspendierte Zellen; dies zeigte sich auch in bezug auf unbehandelte Kontrollzellen. Dagegen lag die CB-//CB/FNLNTL-hervorgerufene Exozytose der azurophilen Granula durch suspendierte Granulozyten über der angehefteter Zellen.

Mit Hilfe der Zytoskelett-zerstörenden Agentien Cytochalasin B (Aktinfilamente) und Colcemid (Mikrotubuli) wurde die Beteiligung von Zytoskelett-Komponenten an der Granula-Freisetzung untersucht.

Während die Behandlung mit CB eine deutliche Sekretionssteigerung (besonders in bezug auf die azurophilen Granula) hervorrief, führte die Zerstörung der Mikrotubuli zu einer fast vollständigen Hemmung der FNLNTL-induzierten Granulafreisetzung.

Stichprobenartig wurde überprüft, ob sich die im Überstand gemessene Protein-/Enzymmenge mit dem in den Zellen verbliebenen Gehalt zu 100 % ergänzten. Dies war bei allen untersuchten Proteinen, ausgenommen bei der Elastase, der Fall. Die Unregelmäßigkeiten bei den Elastase-Messungen wurden näher untersucht (siehe 4.7.).

In Tab. 5 sind die wesentlichen Unterschiede im Sekretionsmuster der untersuchten Proteine aus einigen Experimenten gegenübergestellt.

4. Ergebnisse

Tab. 5 *Unterschiede im Protein-Sekretionsmuster neutrophiler Granulozyten*

Behandlung der PMNL	Protein/Enzym			Versuch/Abb.
	Elastase	Myeloperoxidase	Laktoferrin	
CB*/FNLNTL				
2 min	41.3 %	68.5 %	---	4.3.1. / Abb. 11
5 min	42.3 %	77.0 %	---	"
10 min	43.0 %	86.1 %	---	"
10 min	25.5 %	93.7 %	32.6 %	4.3.1. / Abb. 13
10 min	33.7 %	---	54.9 %	4.3.5. / Abb. 24
20 min	37.4 %	---	82.0 %	"
30 min	39.9 %	---	88.0 %	"
40 min	40.7 %	---	86.5 %	"
CB/FNLNTL				
10 min	40.7 %	15.7 %	14.8 %	4.3.1. / Abb. 12
	Gelatinase	Typ-I-Kollagenase	Laktoferrin	
Kontrollen				
10 min	8.9 %	4.6 %	2.4 %	4.3.5. / Abb. 23
20 min	20.6 %	8.0 %	3.9 %	"
30 min	23.7 %	8.8 %	4.9 %	"
40 min	23.0 %	10.6 %	5.6 %	"
CB*/FNLNTL				
10 min	56.0 %	---	32.6 %	4.3.1. / Abb. 11
FNLNTL /Leu-ENK*				
10 min	20.0 %	11.4 %	3.5 %	4.3.1. / Abb. 19
20 min	33.4 %	20.1 %	16.6 %	"
30 min	46.1 %	27.5 %	21.9 %	"
40 min	52.0 %	39.6 %	28.7 %	"
FNLNTL	<i>Mittelwerte aus allen mit FNLNTL durchgeführten Tests</i>			
10 min	27.1 %	16.5 %	4.0 %	
20 min	44.4 %	19.6 %	13.5 %	
30 min	66.3 %	21.8 %	18.0 %	
40 min	56.0 %	45.5 %	25.6 %	

* mit diesen Agentien wurden die PMNL vor der Behandlung 20 min vorinkubiert

4.5. Assoziation der Granula mit dem Zytoskelett

Um eine mögliche Assoziation der Granula mit dem Zytoskelett zu untersuchen, wurden 5×10^6 PMNL/ml DPBS für 20 min in Suspension bei 37°C inkubiert und durch leichte Ultraschall-Behandlung lysiert (3.1.4.). Im Zell-Lysat konnten dabei nicht mehr als 2 % des Elastasegehalts nachgewiesen werden.

Nach mehrfachem Vortexen des Zell-Lysates erfolgte die Abtrennung von Zytoskelett- bzw. zytoskelett-assoziierten Bestandteilen durch Zentrifugation bei 2200 g für 10-15 min [De Duve, 1975 / Willams & Wilson, 1984].

Durch Detergenzbehandlung und starken Ultraschall (3.1.4.) wurden die Granula in Sediment und Überstand zerstört, die Lysate stark gevortext und der Anteil der untersuchten Proteine in den beiden Fraktionen bestimmt (Gehalt beider Fraktionen = 100 %) (n= 9-12 // 7 Spender).

Aus Abb. 33 geht hervor, daß der größte Teil der Proteine/Enzyme Elastase (77 %), Myeloperoxidase (60.3 %) und Laktoferrin (87.7 %) im Sediment, dagegen über > 90 % der beiden Metalloproteinasen im Überstand zu messen waren.

Um auszuschließen, daß der hohe Anteil an Typ-I-Kollagenase und Gelatinase im Überstand durch Sekretion während der Inkubationszeit oder durch Zerstörung der Zellen bzw. Granula bedingt war, wurden 5×10^6 PMNL wie oben beschrieben inkubiert und die Zellsuspension anschließend bei 400 g zentrifugiert (Kontrolltest).

Wie in Abb. 34 dargestellt, konnten dabei nicht mehr als 3.6 % - 9.6 % des Gesamtgehaltes der untersuchten Proteine im Überstand nachgewiesen werden (n= 4-15 // 4-10 Spender).

Abb. 33 *Enzymverteilung nach Zerstörung der PMNL und Zentrifugation (2200 g) der Zell-Lysate*

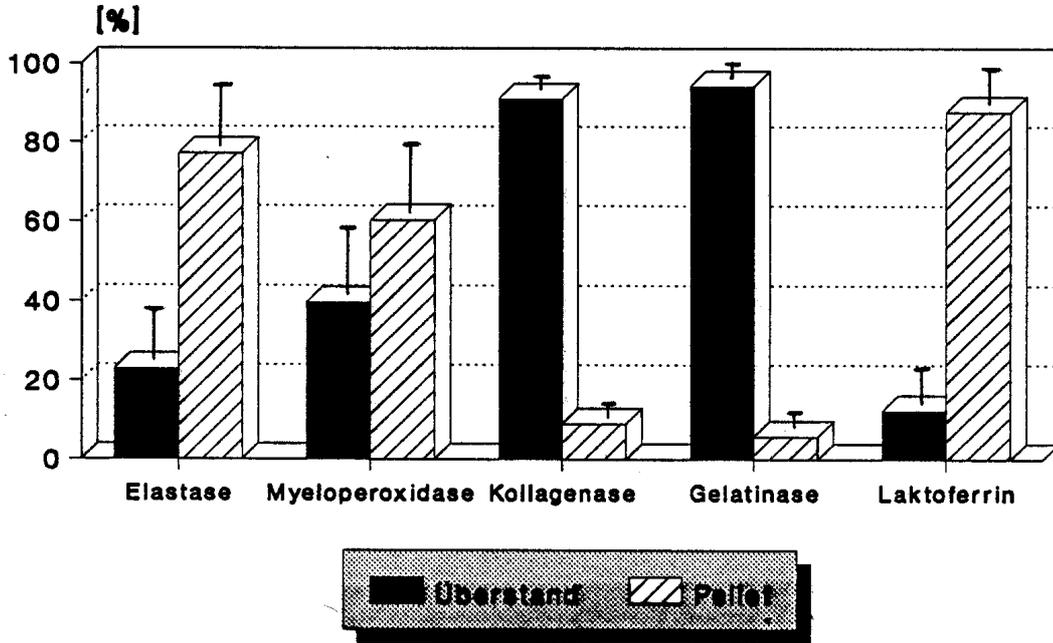
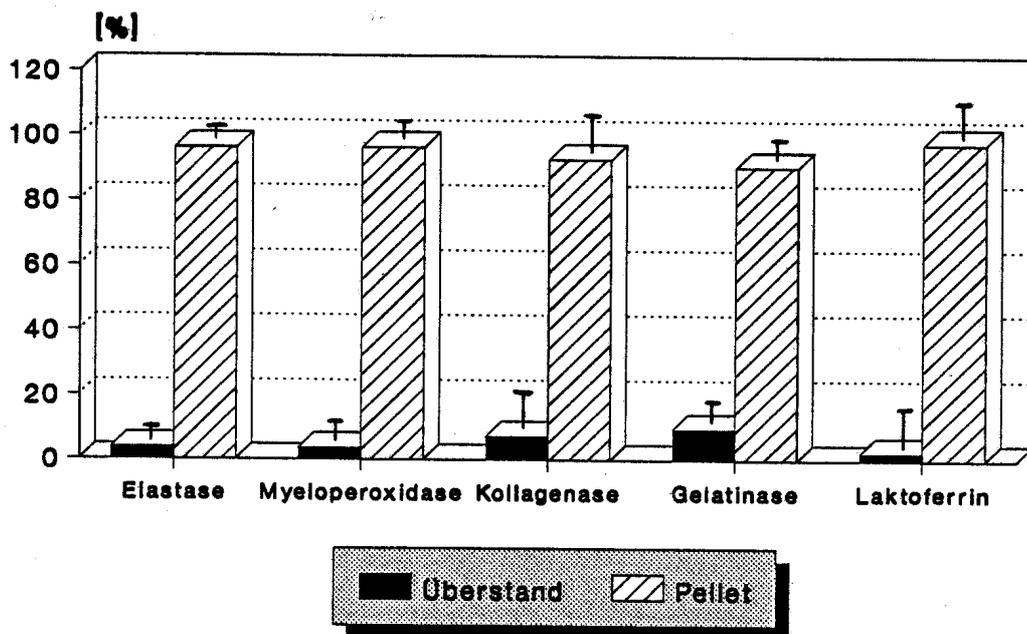


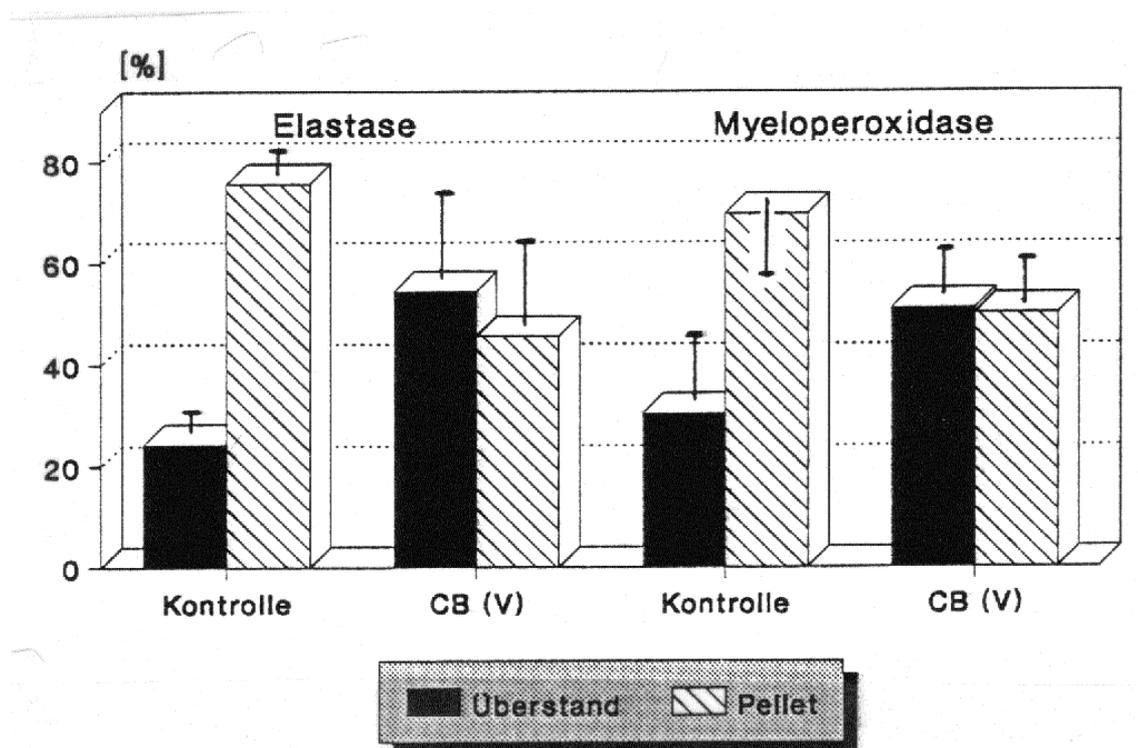
Abb. 34 *Enzymverteilung im Zell-Lysat nach Zentrifugation (400 g) der PMNL (Kontrolltest)*



In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Verteilung der azurophilen Granula nach Inkubation von 5×10^6 PMNL mit CB (5 $\mu\text{g/ml}$) für 30 min untersucht. Die Abtrennung des Zytoskeletts bzw. zytoskelett-assoziiierter Bestandteile nach Lysierung der Zellen erfolgte wie beschrieben durch Zentrifugation bei 2200 g (s.o.).

Abb. 35 zeigt, daß die Zerstörung der Mikrofilamente zu einer Erhöhung des Anteils spezifischer Granula im Überstand, verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen, um 30 % (Elastase) bzw. 21 % (Myeloperoxidase) führte.

Abb. 35 *Enzymverteilung in Zell-Lysaten CB-behandelter PMNL nach Zentrifugation bei 2200 g*



Enzymverteilung in Überstand und Pellet von CB-behandelten (5 $\mu\text{g/ml}$ //in Suspension//30 min) PMNL nach Lyse der Zellen und Zentrifugation der Lysate bei 2200 g (n=6 //Spender 6):

Kontrollen: unbehandelte Kontrollzellen

CB (V): PMNL die 30 min mit CB behandelt wurden

4.6. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

4.6.1. Untersuchungen zu Phagozytose und Darstellung der Granula

Um die Morphologie phagozytischer neutrophiler Granulozyten und die Aufnahme der Zymosan-Partikel durch die Zellen besser untersuchen zu können, wurden REM-Präparate angefertigt (siehe 3.3.2.). Auch die Granula der Neutrophilen wurden auf diese Weise dargestellt.

Wie in Abb. 36 zu sehen, zeigten FNL/PNTL-stimulierte und mit opsoniertem-Zymosan inkubierte neutrophile Granulozyten eine rege phagozytotische Aktivität (Versuchsdurchführung und Sekretionsrate siehe 4.3.4.). Gut waren bei REM-Untersuchungen die Pseudopodien (—) der Zellen zu erkennen, mit denen die Partikel (ZX) eingeschlossen und aufgenommen wurden (Abb. 36 a+b).

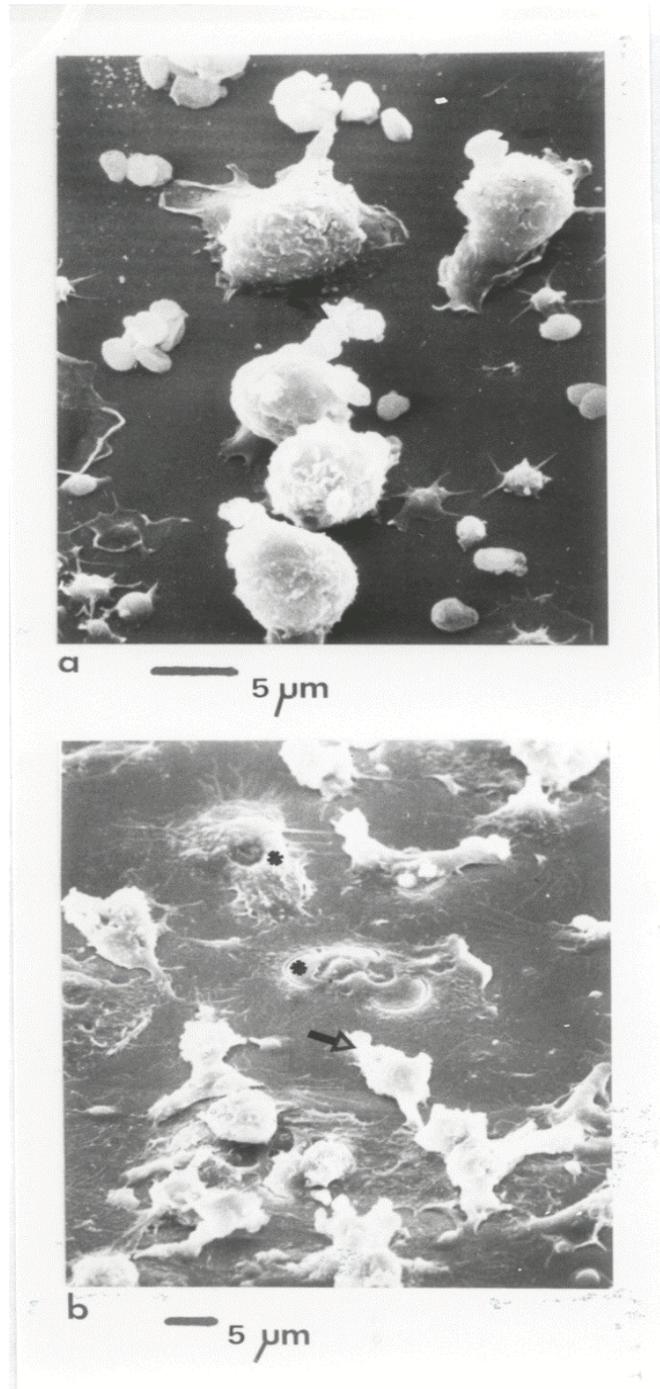
In Abb. 37 a+b ist dieser Vorgang bei 6.000 - 12.000 -facher Vergrößerung dargestellt, deutlich sieht man hier, wie die Partikel von der Membran der PMNL eingeschlossen werden.

Der Anteil abgestorbener PMNL (Abb. 36 a+b) war nach 30 - 40 min relativ hoch, dabei waren "kraterartige" Einsenkungen (—) in den Zellen zu erkennen (Abb. 37 c+d). Unbehandelten Kontrollen wiesen nach dieser Inkubationszeit nur noch zu ca. 40 % eine abgerundete, d.h. unpolarisierte, Zellform auf.

In Abb. 38 a-d sind die Granula in "aufgebrochenen" neutrophilen Granulozyten, an der Unterseite einer PMNL-Membran und unter der Membran einer CB-behandelten Zelle dargestellt.

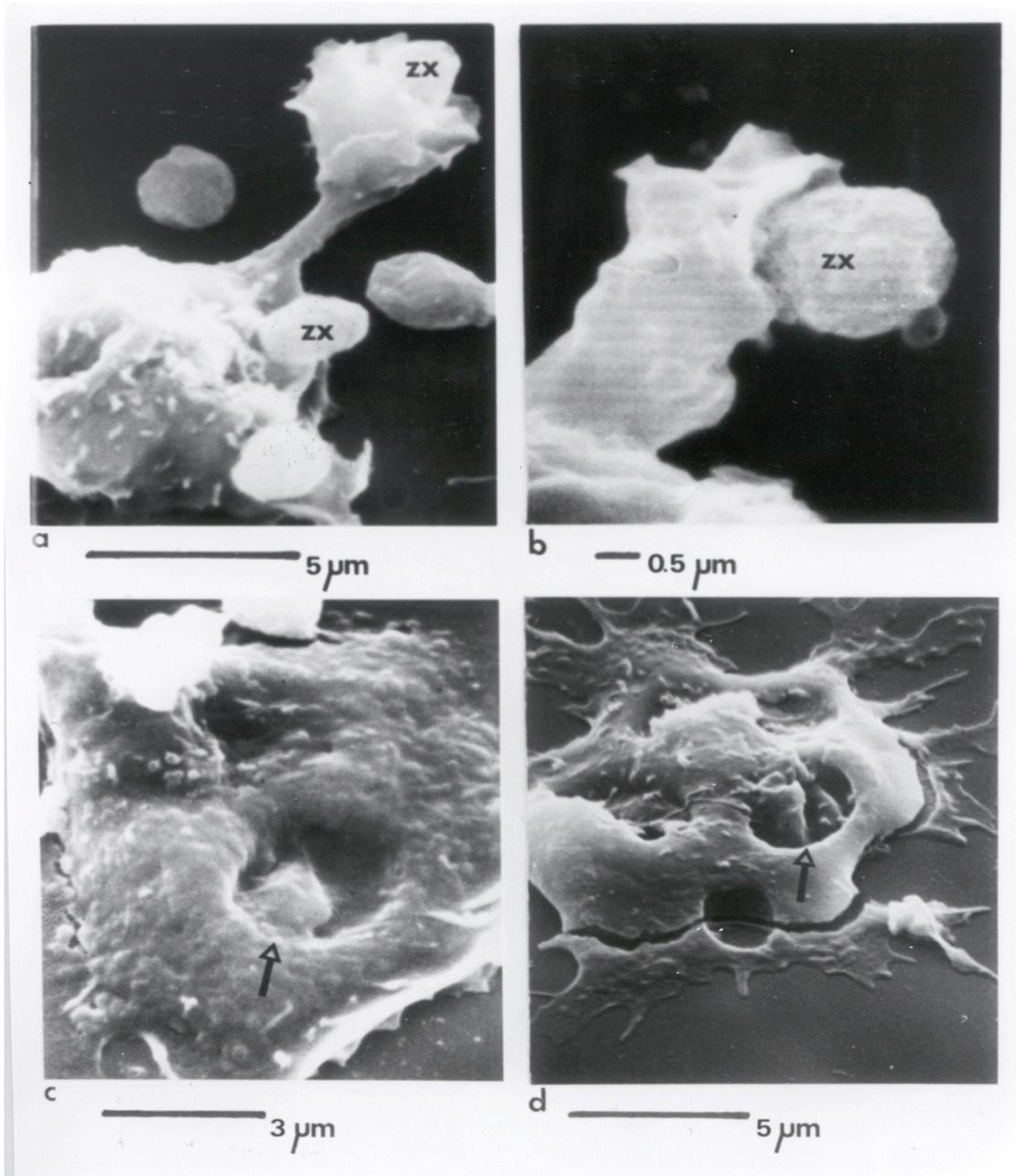
Die REM-Untersuchungen nach Entfernung der Plasmamembran mit Hilfe Polylysin beschichteter Deckgläschen zeigten, in welchem Maß die Neutrophilen mit Granula angefüllt sind (Abb. 38 a) [Baggiolini, 1980]. Bei 3.000 - 21.000 -facher Vergrößerung konnte vielfach eine Assoziation der Granula mit Filamentstrukturen (Abb. 38 b+d) beobachtet werden.

Abb. 36

Phagozytose neutrophiler Granulozyten

Phagozytierende PMNL: die Zellen wurden mit FNLNTL ($10^{-7}M$) in Suspension (20 min/ $37^{\circ}C$) vor-inkubiert und nachfolgend in Gewebekulturschalen mit FNLNTL und opsoniertem Zymosan für 30-40 min behandelt: ZX: opsonierte Zymosan-Partikel
 *: abgestorbene Zellen
 →: Aufnahme der Partikel

Abb. 37

Phagozytose neutrophiler Granulozyten

4×10^6 PMNL wurden mit FNLNPTL ($10^{-7}M$) in Suspension (20 min/37°C) vorinkubiert und nachfolgend in Gewebekulturschalen (30-40 min) mit FNLNPTL und opsoniertem Zymosan (2.5×10^7 Partikel) behandelt:

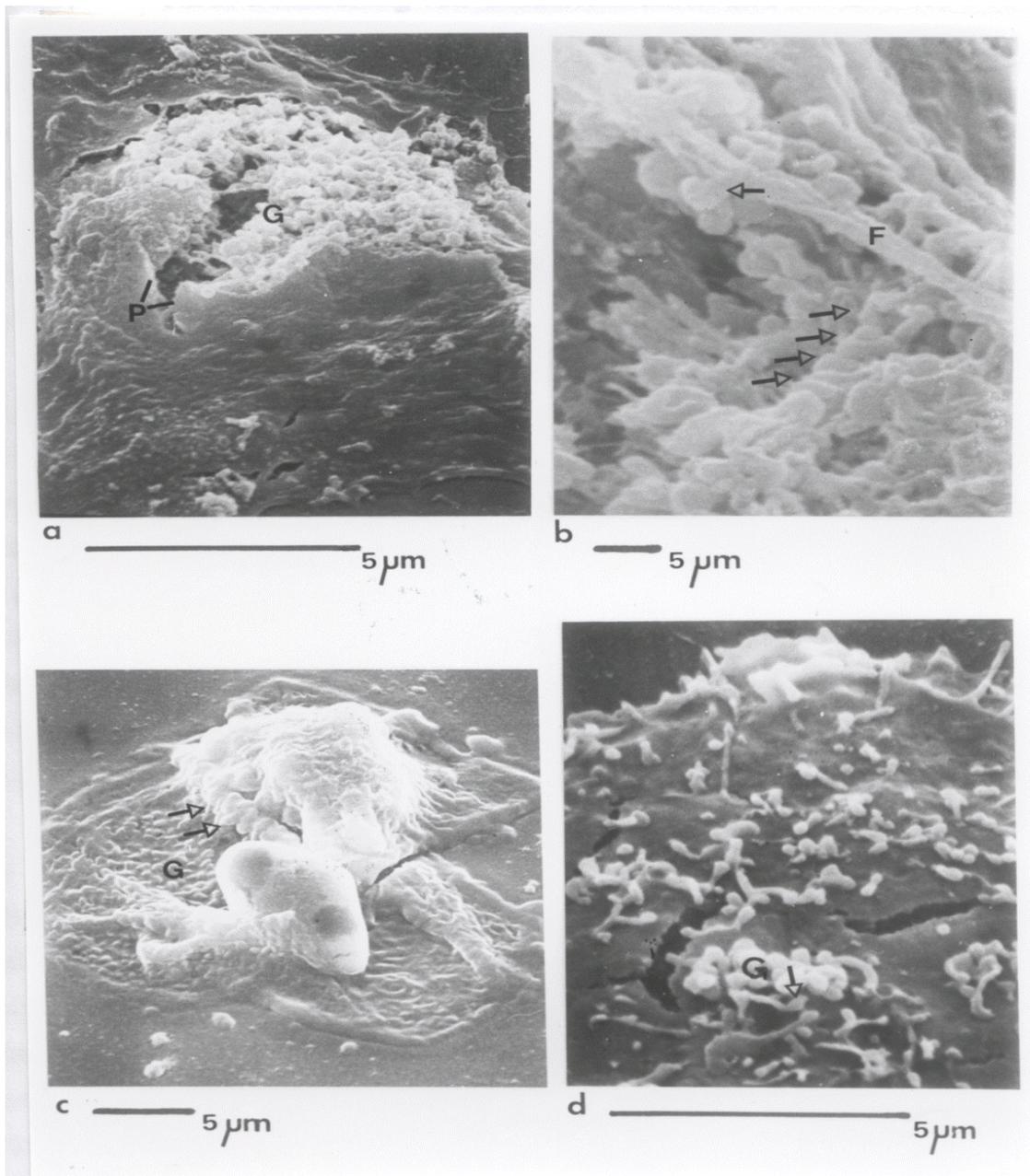
a/b: phagozytierende PMNL

ZX: opsonierte Zymosan-Partikel

c/d: abgestorbene Zellen

----->: Kraterartige Einsenkungen in den Zellen

Abb. 38 Darstellung der Granula neutrophiler Granulozyten



a+b: unbehandelte Zellen, bei denen Teile der Membran entfernt wurden
c: Granula unter der Zellmembran einer CB-vorinkubierten (20 min) Zelle
d: Granula auf der Unterseite einer PMNL-Membran, die mit Lysin beschichteten Deckgläschen entfehrnt wurde
P: Plasmamembran
G: Granula
 \Rightarrow : mit Filamentstrukturen assoziierte Granula

4.7. Untersuchungen zur Elastasesekretion

4.7.1. NaCl-Behandlung von Gesamtextrakten und stimulierten PMNL

Wie unter 4.4. bereits angedeutet, addierte sich nach Stimulierung der Neutrophilen der im Überstand gemessene Elastasegehalt mit dem in den Zellen verbliebenen Anteil nicht zu 100 %. Auch die Elastasekonzentration bei Bestimmung des Gesamtgehaltes war nach Abtrennung der festen Bestandteile aus den Zell-Lysaten durch Zentrifugation (siehe 3.1.4./4.2.) geringer als in unzentrifugierten Lysaten. Dies deutete auf eine Assoziation der Serinprotease mit unlöslichen Zellbestandteilen hin.

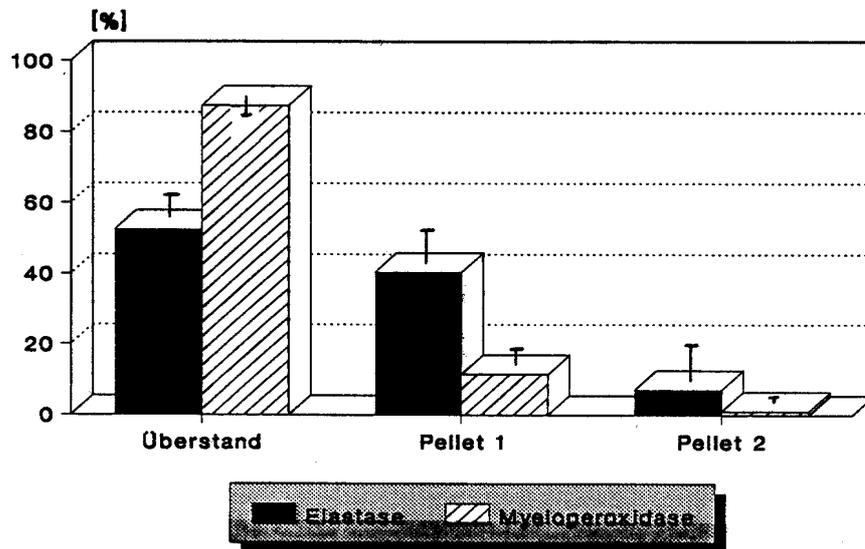
Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde das Sediment der Zell-Lysate jeweils mit 1 M NaCl (PBS/NaCl) behandelt. Dazu wurden Zellen bzw. Granula (5×10^6 PMNL) wie unter 3.1.4. und 4.2. beschrieben durch Ultraschall und Detergenz-Zusatz zerstört, die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 14.000 g aus dem Lysat entfernt und der Überstand abgenommen. Das Pellet (P1) wurde mit PBS/NaCl für 8-10 min bei 4°C behandelt, erneut zentrifugiert und nachfolgend wurden Überstand und Pellet (P2) wiederum getrennt.

In Doppelbestimmungen wurde die Elastase- bzw. Myeloperoxidase-Konzentration der beiden Überständen und im Pellet (P2) gemessen.

Es zeigte sich (Abb. 39), daß 50 % des Elastase- im Gegensatz von nur 15 % des Myeloperoxidase-Gehaltes durch NaCl-Behandlung aus den unlöslichen Zellbestandteilen (P1) zu eluieren war. Auch im Sediment 2 verblieben noch 7 % des gemessenen Elastase-Gesamtgehaltes.

Zum Vergleich wurde der Gehalt der Serinprotease und der Myeloperoxidase in unzentrifugierten Lysaten der jeweils selben Spender von 5×10^6 PMNL bestimmt (Tab. 6).

Abb. 39 *Elution von Elastase und Myeloperoxidase aus unlöslichen Bestandteilen von PMNL-Lysaten durch NaCl-Behandlung*



Enzymverteilung in Lysaten von 5×10^6 PMNL nach Zentrifugation (14.000 g) und NaCl-Behandlung (1 M) für 8-10 min (n=17-18 // 17-18 Spender):

Überstand: Enzymgehalt im Überstand nach Zentrifugation der Zell-Lysate

Pellet 1: Enzymgehalt im Überstand des Pellets nach NaCl-Behandlung

Pellet 2: Enzymgehalt des zweiten Pellets nach erneuter Zentrifugation

Tab. 6 *Enzymverteilung in den Fraktionen zentrifugierter PMNL-Lysate nach NaCl-Behandlung*

Enzym	Überstand	Pellet 1	Pellet 2	Lysat *
Myeloperoxidase	96.5 mU	13.5 mU	1.05 mU = 111.1 mU	130 mU
Elastase	47.2 mU	36.1 mU	6.60 mU = 90.0 mU	93 mU

* Enzym-Gesamtgehalt in unzentrifugierten Zell-Lysaten der jeweils selben Spender

Auf Grund der vorangehend beschriebenen Ergebnisse wurde untersucht, ob die deutlichen Unterschiede im Gehalt freier Elastase und Myeloperoxidase in den Überständen stimulierter PMNL (4.3.1./4.3.2./4.3.6.) möglicherweise durch die Assoziation sezernierter Elastase mit Membranstrukturen bedingt war.

Dazu wurden 5×10^6 PMNL mit CB (5 yg/ml//20 min) in Suspension vorinkubiert und anschließend in Gewebekulturschalen für 10 min mit CB/FNLPNTL (10^{-7} M) behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände (Überstand 1) abgenommen, zentrifugiert und die Zellen 1 x mit vorgewärmten (37°C) DPBS gewaschen. Danach wurden die PMNL für 6 min mit warmem (37°C) DPBS + NaCl 1 M behandelt und der Überstand nach vorsichtigem Abspülen der Zellen entfernt (Überstand 2).

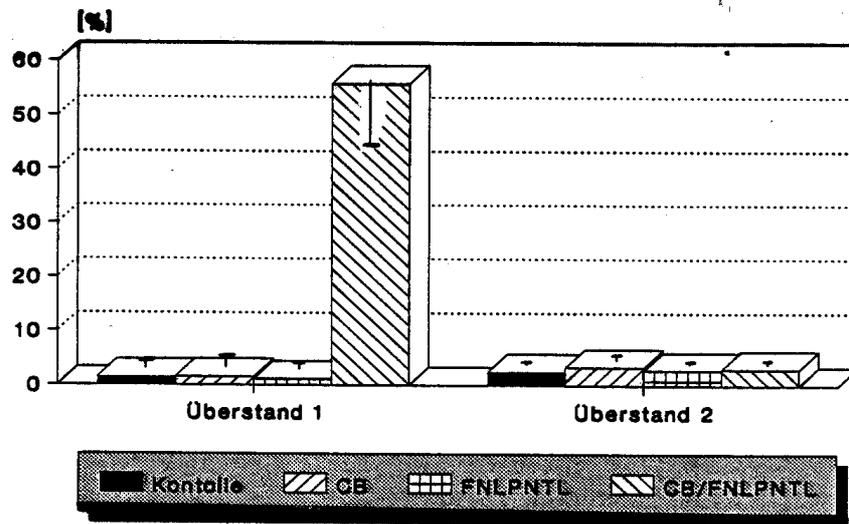
Jeweils in Doppelbestimmungen wurde der Elastasegehalt beider Überstände in Aktivitätstests gemessen, in den Überständen 2 wurde der Gehalt zusätzlich mittels ELISA bestimmt.

Es zeigte sich, daß maximal 50 % des Elastasegehalts (CB/FNLPNTL-Behandlung) sezerniert wurde (Überstand 1), von der Membran der Zellen jedoch nicht mehr als 3.3 % mit 1 M NaCl abzuwaschen waren (Abb. 40). Unterschiede im Elastasegehalt der Überstände 2 nach CB-, CB/FNLPNTL-, FNLPNTL-Behandlung der Neutrophilen im Vergleich zu den Kontrollzellen waren nicht zu messen.

Dabei ergab sich eine gute Übereinstimmung der Konzentrationsbestimmung der Serinproteinase durch ELISA-Messung und Aktivitätstest im Überstand 2 (die im Photometrischen Test bestimmte Elastasekonzentration lag etwa 3 % über dem in Abb. 40 dargestellten, mittels ELISA gemessenen Gehalt).

Der geringe Elastasegehalt im Überstand 2 und mikroskopische Untersuchungen an NaCl-behandelten/DBBS-gewaschenen Zellen belegten, das die PMNL durch die 6-minütige NaCl-Behandlung nicht zerstört oder abgetötet worden waren; die Zellgröße schien allerdings etwas verkleinert.

Abb. 40 Elastasegehalt im Überstand NaCl-behandelter PMNL nach Stimulierung



Elastasegehalt im Überstand von 5×10^6 PMNL nach Vorinkubation der Zellen in Suspension (20 min/37°C) mit/ohne CB (5 µg/ml) und anschließender Behandlung (10 min) mit CB, FNL PNTL (10^{-7} M) oder beiden Agentien in Gewebekulturschalen (n= 10 // 5 Spender):

Kontrolle: unbehandelte Kontrollzellen

CB: mit CB vorinkubierte und mit CB behandelte Zellen

FNL PNTL: mit FNL PNTL behandelte PMNL

CB/FNL PNTL: mit CB vorinkubierte und mit CB+FNL PNTL behandelte Zellen

Überstand 1: Enzymgehalt nach Behandlung der PMNL

Überstand 2: Elastasegehalt nach Behandlung stimulierter Zellen mit 1 M NaCl

4.7.2. Gelelektrophoretische Auftrennung sezernierter Elastase

In den Untersuchungen zur Protein-/Enzymfreisetzung neutrophiler Granulozyten zeigte sich, daß Elastase im Gegensatz zur Myeloperoxidase bzw. Laktoferrin nach Vorinkubation mit CB und CB/FNL PNTL-Behandlung nur zu maximal 50 % von den PMNL ausgeschüttet wurde; eine Assoziation sezernierter Elastase mit Membranstrukturen war dabei nicht nachzuweisen (4.7.1.).

In der Literatur werden drei, durch unterschiedliche Glykosylierung zu trennende

4. Ergebnisse

Formen der Elastase beschrieben [Watorek, 1990 / Green et al., 1991)].

Um festzustellen, ob nur bestimmte oder alle Formen der Serinprotease von den Zellen sezerniert werden, erfolgte die Darstellung freigesetzter Elastase mittels SDS-Gelelektrophorese im Vergleich mit HL-Elastase aus humanem Sputum (Standard).

Die sezernierte Elastase konnte, ebenso wie das als Standard eingesetzte Enzym, nicht in nach Damerval et al. (1987) gefärbten SDS-Gelen nachgewiesen werden, so daß Substrat-Gelelektrophoresen (Nachweis der Elastase über Enzymaktivität) durchgeführt wurden.

6×10^7 - 1.5×10^8 PMNL/10 ml DPBS wurden wie beschrieben mit CB (5 yg/ml) vorinkubiert und mit CB/FNLPNTL (10^{-7} M) in großen Gewebekulturschalen behandelt, der Überstand abgenommen und auf 120-650 μ l eingengt. Die angehefteten PMNL wurden durch Zugabe von 3 ml PBS/NaCl + 1 % Triton vom Schalenboden gelöst und anschließend Zellen bzw. Granula durch zweifachen Ultraschall und Detergenz-Behandlung zerstört (siehe **3.1.12.**).

Auch Gesamtextrakte (in PBS/NaCl) von Zellen der jeweils selben Spender wurden hergestellt (**3.1.4.**); Gesamtextrakte und das Lysat der angehefteten PMNL wurden ebenfalls eingengt.

Die Einengung der 3-10 ml Proben erfolgte durch Zentrifugation von 400 μ l-Aliquots in 6-18 Millipore Ultrafree-MC Röhrchen (Ausschlußvolumen der Membran 10 kDal) für 30-60 min. Dabei war ein relativ hoher Verlust an Enzymaktivität pro Röhrchen (Assoziation des Enzyms mit Ausschlußmembran) zu verzeichnen. Dieser Verlust wurde einer Zentrifugationsdauer von 6-7 Std. bei Verwendung von nur 3-4 Röhrchen vorgezogen, um Veränderungen des Enzyms bei langer Zentrifugationsdauer zu vermeiden.

In 10 %-ige SDS Gele wurden 0.2-0.4 % Gelatin einpolymerisiert und je 8-16 μ l der eingengten Proben von Überstand, Sediment und Gesamtextrakt sowie des

Standards, aufgetragen. Nach Auswaschen des SDS wurden die Gele in Elastasepuffer + 2 % Benzalkoniumchlorid bei 37°C inkubiert, danach erfolgte die Fällung der Proteine und die Färbung der Gele mit Coomassie-Blue (3.1.12.).

Es konnten in den Gesamtextrakten (4 Spender) alle drei Formen der Elastase mit Molekulargewichten von 30-31 kDa / 32-34 kDa / 35-37 kDa im SDS-Gel dargestellt werden (Abb. 41 a-h). Auch in den Überständen CB/FNLPNTL-behandelter PMNL traten, wie auch im Sediment, die drei Formen auf. Dabei war die Form mittlerer Größe (33 kDa) jeweils am stärksten vertreten bzw. zeigte die größte Aktivität. Je nach Inkubationszeit, aufgetragener Enzymmenge und Gelatinanteil des Gels waren die Banden der leichteren und schwereren Form zu erkennen (Abb. 41 a-h).

Besonders bei Verwendung von Gelatin aus Rinderkollagen und bei längerer Inkubationsdauer war ein Verlust der 35 kDa Aktivitätsbande zu verzeichnen.

Bei dem Elastasestandard aus humanem Sputum überwog ebenfalls die Aktivität der mittleren und leichteren Form (Abb. 41 a-c).

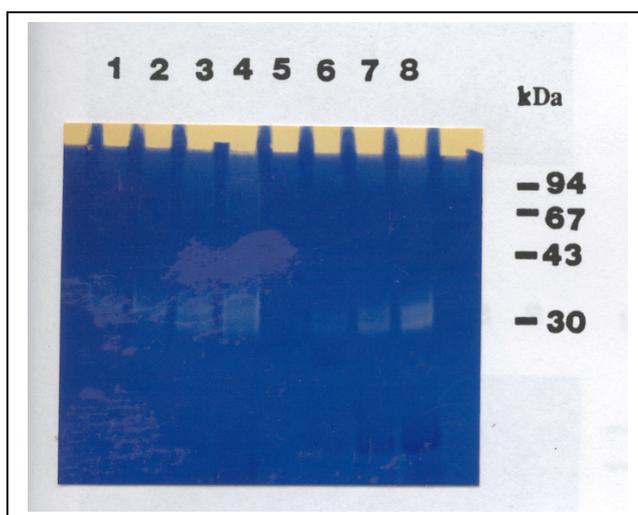
In Tab. 7 sind die ermittelten Werte der Gesamt-Elastaseaktivität (mU) von Gesamtextrakten (G), Überständen (Ü) und Pellets (P) unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Einengungsvolumina (umgerechnet auf 1×10^8 PMNL) sowie die Aktivität in 20 μ l eingengter Probe angegeben.

Tab. 7

Probe	Gesamtaktivität 1 x 10 ⁸ PMNL	Aktivität in 20 μ l Probe
Gesamtextrakt 1	680 mU	8.8 mU
Überstand 1	132 mU	20.2 mU
Gesamtextrakt 2	617 mU	20.0 mU
Überstand 2	78 mU	3.4 mU
Pellet 2	432 mU	28.8 mU
Überstand 3	337 mU	2.4 mU
Pellet 3	77 mU	7.7 mU
Gesamtextrakt 3	880 mU	11.0 mU
Überstand 5	132 mU	6.6 mU
Pellet 5	516 mU	12.9 mU
Gesamtextrakt 4	264 mU	12.4 mU
Überstand 6	154 mU	20.0 mU
Pellet 6	85 mU	3.9 mU

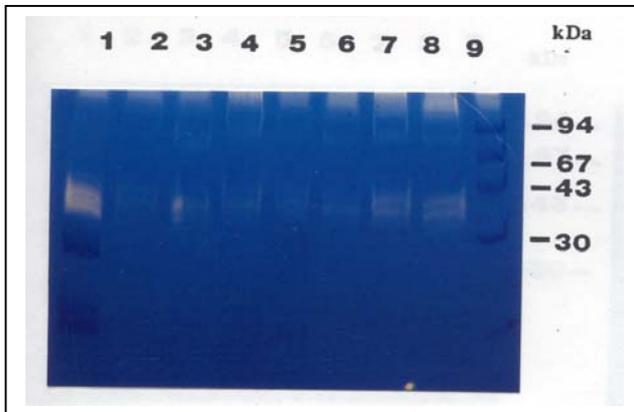
Abb. 41 *Darstellung sezernierter Elastase in SDS-Substratgelen*

- a. **Gelatinanteil des Gels: 0.4 %**
aufgetragene Probe: 13 μ l
Inkubation des Gels: 17 Std.



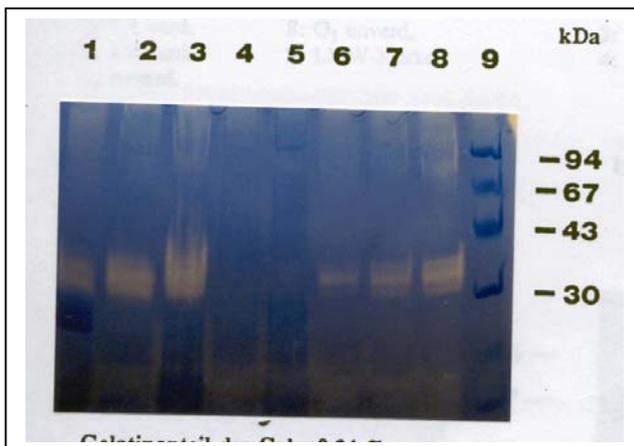
- 1:** Überstand₁ 1:2 verd.
2: Überstand₁ unverd.
3: Gesamtextrakt₁ 1:2 verd.
4: Gesamtextrakt₁ unverd.
5: LMW-Marker
6: Standard 7.5 μ g/ml
7: Standard 15.0 μ g/ml
8: Standard 30.0 μ g/ml

- b.** Gelatinanteil des Gels: 0.4 %
aufgetragene Probe: 16 μ l
Inkubation des Gels: 19.5 Std.



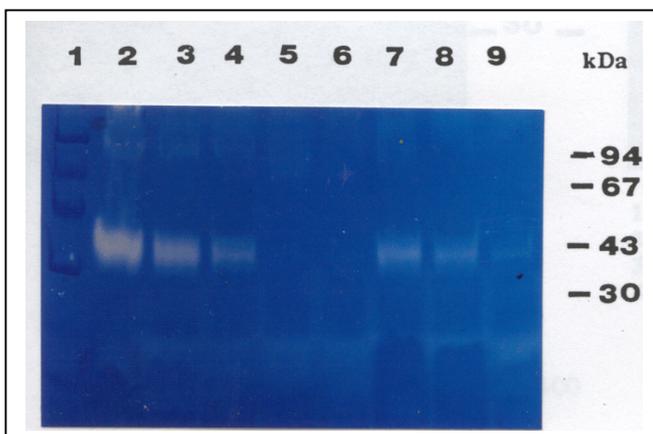
- 1: Standard 30 μ g/ml
- 2: Pellet₃ 1:2 verd.
- 3: Überstand₃ unverd.
- 4: Pellet₂ 1:3 verd.
- 5: Überstand₂ unverd.
- 6: Überstand₁ 1:3 verd.
- 7: Gesamtextrakt₂ 1:4 verd.
- 8: Gesamtextrakt₁ 1:4 verd.
- 9: LMW-Marker

- c.** Gelatinanteil des Gels: 0.34 %
aufgetragene Probe: 16 μ l
Inkubation des Gels: 44 Std.



- 1: Standard 30 μ g/ml
- 2: Pellet₂ unverd.
- 3: Pellet₂ unverd.
- 4: Überstand₂ 1:2 verd.
- 5: Überstand₂ unverd.
- 6: Überstand₁ 1:2 verd.
- 7: Gesamtextrakt₂ 1:4 verd.
- 8: Gesamtextrakt₁ 1:2 verd.
- 9: LMW-Marker

- d.** Gelatinanteil des Gels: 0.34 %
aufgetragene Probe: 13 μ l
Inkubation des Gels: 44 Std.



- 1: LMW-Marker
- 2: Gesamtextrakt₂ unverd.
- 3: Gesamtextrakt₂ 1:2 verd.
- 4: Gesamtextrakt₂ 1:4 verd.
- 5: Überstand₃ unverd.
- 6: Überstand₃ 1:2 verd.
- 7: Pellet₃ unverd.
- 8: Pellet₃ 1:2 verd.
- 9: Pellet₃ 1:4 verd.

4. Ergebnisse

e. Gelatinanteil des Gels: 0.25 %
aufgetragene Probe: 16 µl
Inkubation des Gels: 15 Std.

f. Gelatinanteil des Gels: 0.3 %
aufgetragene Probe: 8 µl
Inkubation des Gels: 70 Std.

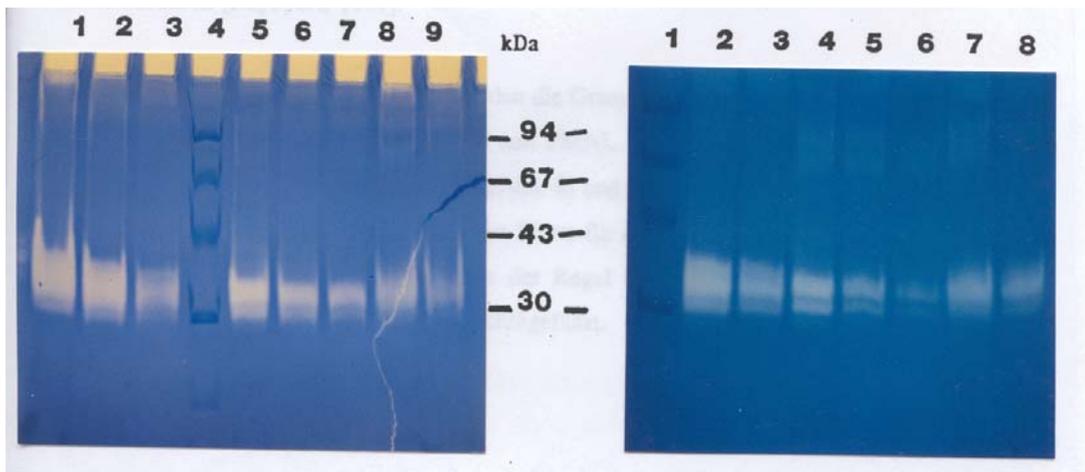


1: P₅ 1:2 verd.
2: P₅ unverd.
3: Ü₅ 1:4 verd.
4: Ü₅ 1:2 verd.
5: Ü₅ unverd.
6: G₃ 1:4 verd..
7: G₃ 1:2 verd.
8: G₃ unverd.
9: LMW-Marker

1: LMW-Marker
2: G₃ 1:2 verd.
3: G₃ 1:4 verd.
4: Ü₅ unverd.
5: Ü₅ 1:2 verd.
6: P₅ unverd.
7: P₅ 1:2 verd.
8: p₅ 1:4 verd.

g. Gelatinanteil des Gels: 0.25 %
aufgetragene Probe: 16 µl
Inkubation des Gels: 15 Std.

h. Gelatinanteil des Gels: 0.3 %
aufgetragene Probe : 8 µl
Inkubation des Gels: 70 Std.



1: G₄ unverd.
2: G₄ 1:2 verd.
3: G₄ 1:4 verd.
4: LMW-Marker
5: Ü₆ unverd.
6: Ü₆ 1:2 verd.
7: Ü₆ 1:4 verd.
8: P₆ unverd.
9: P₆ 1:2 verd.

1: LMW-Marker
2: G₄ 1:2 verd.
3: G₄ 1:4 verd.
4: Ü₆ unverd.
5: Ü₆ 1:2 verd.
6: Ü₆ 1:4 verd.
7: P₆ unverd.
8: P₆ 1:2 verd.

5. Diskussion

5.1. Isolierung der PMNL

Die hier angewendete, nach Böyum (1976) und Schmitt et al. (1986) modifizierte Isolierungsmethode für Granulozyten ermöglicht eine schonende Präparation der Zellen. Dies wird durch eine Lebendrate der PMNL von > 95 % sowie durch die nach Stimulierung schnell einsetzende Aktinreorganisation in den Zellen belegt [Schettler et al., 1991]. Auch zeigen unstimulierte Neutrophile nach der Präparation zum größten Teil eine unpolarisierte, sphärische Zellmorphologie.

Verglichen mit den in der Literatur angegebenen Werten ($2-7 \times 10^6$ PMNL/ ml Vollblut), entspricht die erreichte Zellausbeute von 1.7×10^6 PMNL/ml Vollblut (4.1) einem durch die Isolierung bedingten Zellverlust von > 15 % [Rick, 1977 / Kleesiek, 1989]. Während der zweifachen hypotonen Lyse wurden ca. 8 % des Gelatinasegehalts der Zellen freigesetzt. Trotzdem wurde eine solche Behandlung durchgeführt, da die Messung von Myeloperoxidase im photometrischen Test durch Erythrozyten/-lysate in den Überständen verfälscht wird (4.1). Dies ist wahrscheinlich auf die Substratumsetzung (H_2O_2 /ABTS) durch Erythrozyten-Katalase, ebenfalls eine Häm-bindende Oxidoreduktase, zurückzuführen [Rapoport, 1987].

Bei den durchgeführten Experimenten wurden die Granulozyten von ca. 50 verschiedenen Spendern eingesetzt. Die Sekretionsraten von PMNL verschiedener Spender variierten ebenso wie die erreichte Zellausbeute (4.1./Abb. 8) und Präparationsdauer der Zellen zum Teil sehr stark. Um möglichst repräsentative Werte für die Proteinfreisetzung zu erhalten, wurden deshalb bei den Experimenten in der Regel 8-15 Tests mit den Zellen einer größeren Anzahl verschiedener Spender durchgeführt.

5.2. Sekretionsmuster und Kompartimentierung der untersuchten Proteine

5.2.1. Testbedingungen zur Untersuchung der Granulafreisetzung

Bei den in der Literatur beschriebenen Sekretionsversuchen variiert die Behandlung der PMNL in bezug auf die Zusammensetzung des Puffers, die Inkubationszeiten und die Temperatur sowie die verwendeten Reaktionsgefäße. Um mögliche Diskrepanzen im Sekretionsverhalten der Zellen auf Grund variierender Versuchsbedingungen [Schmitt et al., 1986 / Watts et al., 1991] zu vermeiden, wurde die Stimulierung der Neutrophilen mit verschiedenen Agenzien unter gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt.

Die angegebene Freisetzung der hier untersuchten Proteine Typ-I-Kollagenase, Gelatinase, Laktoferrin, Elastase und Myeloperoxidase bezieht sich auf deren Gesamtgehalt in den Zellen. Die für den jeweiligen Protein-/Enzymgehalt in 5×10^6 PMNL gemessenen Werte (4.1./Tab. 2) liegen im Bereich der in der Literatur angegebenen Gesamtgehalte [Rest et al., 1988 / Neumann & Lang, 1989 / Bentwood & Henson, 1980]. Dabei wurde der während der Erythrozyten-Lyse freigesetzte Anteil einbezogen.

5.2.2. Proteinfreisetzung nach Stimulierung der Neutrophilen mit FNLPTL und körpereigenen Substanzen

Um die Freisetzung von Proteinen/Enzymen durch stimulierte PMNL in bezug auf deren Kompartimentierung interpretieren zu können, wurden mehrere Stimulantien (partikuläre-lösliche // körpereigene-bakterielle) eingesetzt sowie die Sekretion der Proteine nach Eingriff in die Signaltransduktion und unter Einfluß von Zytoskelettzerstörenden Agentien untersucht.

Wie in unter 4.3. dargestellt, induziert das **Formyl-Peptid** FNLPTL die Degranulation der Neutrophilen, dabei weist die erreichte Freisetzung von Typ-I-Kollagenase, Gelatinase und Laktoferrin Unterschiede von bis zu 50 % auf (4.3./Abb. 11/17/19/23/26). Eine Freisetzung der in den azurophilen Granula gespeicherten

Enzyme Elastase und Myeloperoxidase von über 6 % wird erst bei gleichzeitigem Zusatz von Cytochalasin B erreicht.

[Auf die sekretionssteigernde Wirkung von Cytochalasin wird unter 5.5.2. eingegangen. Die Bestimmung der Typ-I-Kollagenase in CB-haltigen Zellüberständen mittels ELISA war nicht möglich].

Auch die Freisetzung der Proteine aus unbehandelten PMNL ist unterschiedlich. Die durch Kontrollzellen freigesetzte Proteinmenge steigt mit der Inkubations- bzw. Anheftungsdauer (bis 40 min) auf 16 % (Typ-I-Kollagenase), 20 % - 40 % (Gelatinase) bzw. 8 % - 10 % (Laktoferrin) an (Abb. 19/23/31/32). Die Degranulation der Elastase/Myeloperoxidase-enthaltenden Kompartimente durch unstimulierte PMNL ist mit maximal 5 % am geringsten und verändert sich mit andauernder Inkubationszeit kaum.

Auch nach Stimulierung der PMNL mit dem von ihnen selbst synthetisierten Entzündungsmediator **Prostaglandin F_{2α}** ergeben sich unterschiedliche Sekretionsmuster für die untersuchten Proteine (4.3.2./Abb. 17/18). Während der Zusatz des Agens eine Steigerung der Typ-I-Kollagenase- Freisetzung hervorruft, wird die Gelatinase-Ausschüttung teilweise verringert, teilweise erhöht. Die Degranulation der azurophilen Granula (Elastase/Myeloperoxidase) kann durch PGF_{2α}- Zusatz nicht erreicht werden, die CB bzw. CB/FNLPNTL-induzierte Sekretion wird dabei durch das Agens nicht - oder nur geringfügig - gesteigert (4.3.2./Abb. 18). Aus der Literatur sind keine vergleichbaren Untersuchungen zur Wirkung von PGF_{2α} auf die Degranulation neutrophiler Granulozyten bekannt.

Die dargestellten Ergebnisse belegen den Unterschied in der Sezernierung azurophiler Kompartimente und C-Partikel/spezifischer Granula. Die Freisetzung der Elastase- und Myeloperoxidase- enthaltenden Granula aus stimulierten PMNL wird, wie auch in der Literatur beschrieben [Goetzl & Goldstein, 1985 / Henson et al., 1978], nur durch gleichzeitige Zerstörung der Mikrofilamente erreicht.

Innerhalb der Granula-Hauptgruppen scheinen Subpopulationen zu existieren, die jeweils unterschiedliche Proteine bzw. unterschiedliche Anteile der Proteine speichern. So weichen alle nach CB- und FNLPNTL-Behandlung aufgenommenen

Sekretionsmuster der Elastase und Myeloperoxidase (azurophile Granula) stark voneinander ab (Abb. 11-13).

Damiano et al. (1988) beschreiben nach TEM-Untersuchungen zwei Subpopulationen azurophiler Granula, die im Mengenverhältnis 1:3 auftreten; ein Unterschied in der Granulagröße wird dabei nicht beobachtet. Der häufiger auftretende Typus enthält große Mengen an Myeloperoxidase und keine Elastase; die Serinprotease wird neben kleineren Mengen an Peroxidase in der anderen Subpopulation gespeichert. Parmley et al. (1987) dagegen beschreiben eine Mikrogranula-Fraktion, die große Mengen an Myeloperoxidase enthält. Die Granula dieser Fraktion sind durch Dichte, Größe und Sekretionsverhalten von den azurophilen Granula zu unterscheiden.

Die hier dargestellten Versuchsergebnisse unterstützen die Befunde von Damiano et al. (1988), d.h. sie zeigen ebenfalls, daß Elastase und Myeloperoxidase in verschiedenen Subpopulationen der azurophilen Granula gespeichert werden.

Auch die Proteine Typ-I-Kollagenase, Gelatinase und Laktoferrin scheinen in unterschiedlichen Mengenverhältnissen in den PMNL- Kompartimenten gespeichert zu werden (4.3./Abb.11/23/26/31/Tab.5).

Von Dewald et al. (1982) werden die C-Partikel als Gelatinase speichernden Granula beschrieben; Hibbs & Bainton (1989) stellten dagegen eine 80 % -ige Kolokalisation von Laktoferrin und Gelatinase in spezifischen Granula fest. Die hier bestimmten 20-30 %-igen Unterschiede in der Sekretionsrate belegen eine Kolokalisation der beiden Proteine in einer Größenordnung von 80 % nicht.

Auch eine "deckungsgleiche" Kompartimentierung von Typ-I-Kollagenase und Laktoferrin in den spezifischen Granula scheint nicht gegeben zu sein. Die großen Unterschiede in der Laktoferrin-Ausschüttung durch FNLNTL- und CB/FNLNTL-behandelten Neutrophilen deuten auf eine Speicherung von Anteilen des Proteins in den azurophilen Granula hin. Diese Annahme wird durch die Laktoferrin-Verteilung in Sediment und Überstand bei Untersuchungen zur Assoziation der Granula mit dem Zytoskelett (4.5./Abb.33) unterstützt. Auch Parmley et al. (1982) beschreiben das Vorkommen des Proteins in azurophilen Granula.

Leucin-Enkephalin ist ein zu den endogenen Opiaten gehörendes Pentapeptid, dessen Konzentration im Blutplasma - bedingt durch unterschiedliche physische oder psychische Belastung - größeren Schwankungen unterliegt.

Auch durch Zusatz hoher Leu-Enk- Konzentrationen ist keine gesteigerte Degranulation der PMNL zu verzeichnen (4.3.3./Abb. 19). Möglicherweise wird der Einfluß einer schwankenden bzw. steigenden Leu-Enk -Konzentration auf die Neutrophilen durch eine membranständige Peptidase moduliert. Diese neutrale Endopeptidase (= Enkephalinase) spaltet kurze Peptide, u.a. auch Leu-Enk [Painter et al., 1988]. Auch der Zusatz von Bradykinin, ebenfalls ein Substrat der Enkephalinase [Erdös et al., 1989], führt nicht zu einer weitreichenden Steigerung der Proteinsekretion durch neutrophile Granulozyten [Schettler, 1988].

5.2.3. Granulafreisetzung phagozytierender PMNL

Die Sekretion durch FNLPTNL- vorstimulierte und phagozytierende PMNL zeigt ebenfalls starke Unterschiede in bezug auf die untersuchten Proteine (4.3.4./Abb. 20). Die Laktoferrinsekretion ist hierbei, möglicherweise spenderabhängig, auffallend gering. Bentwood & Henson (1980) beschreiben eine 30 %-ige Laktoferrin-freisetzung während der Phagozytose. Hierbei wurden die Versuche jedoch in Suspension durchgeführt, so daß eine Proteinfreisetzung auf Grund "frustrierter Phagozytose" (siehe 2.2.1.4.) nicht ausgeschlossen werden kann. Desweiteren wurden die PMNL für längere Zeit bei 40°C inkubiert, was zur Depolymerisierung der Mikrotubuli und Abnahme des F-Aktin Gehalts in den Zellen führt [Keller et al., 1985 / Cassimeris et al., 1990].

Zymosan, vor allem opsoniertes Zymosan, erhöht die FNLPTNL- induzierte Degranulation. Lichtmikroskopische und REM- Untersuchungen zeigen die Aufnahme einer Vielzahl von Partikeln und deren intrazelluläre Verdauung durch die Zellen (4.3.4./Abb. 22 // 4.6.1./Abb. 36/37). Die dabei in geringem Maß auftretende Elastase- und Laktoferrinausschüttung (keine Myeloperoxidasesekretion) belegt, daß diesen Proteinen vor allem bei der intrazellulären "Verdauung" bzw. Abtötung von

Mikroorganismen Bedeutung zukommt [Hoffstein, 1980 / Neuman & Lang, 1989 / Hamers & Roos, 1985]. Trotz des großen Anteils abgestorbener Zellen ist auch nach 60 min nur ein geringer Anteil an Myeloperoxidase, Laktoferrin und Elastase in den Überständen zu messen (Abb. 22/36/37).

Wahrscheinlich ist dies u.a. auf den intrazellulären Abbau bzw. die Inaktivierung der Proteine durch Autoproteolyse und/oder toxische Sauerstoffmetabolite (siehe 2.2.1.3./2.2.2.1) zurückzuführen.

5.2.4. Hemmung der Degranulation durch Erhöhung des cAMP- Spiegels

In der Literatur wird nach Erhöhung des intrazellulären cAMP- Spiegels ein sekretionshemmender Effekt in bezug auf die β -Glukoronidase neutrophiler Granulozyten beschrieben [Nourshargh & Hoult, 1986]. Bei den hier durchgeführten Sekretions-experimenten wurde die Erhöhung des cAMP_{intrazell.}- Spiegels durch Zusatz des Phosphodiesterase-Inhibitors Zardaverin erreicht. Die Stimulierung der PMNL ruft bei gleichzeitiger Hemmung der Phosphodiesterase eine 10- fache Erhöhung des cAMP_{intrazell.}- Spiegels hervor [Schudt et al., 1991]. Die sekretionshemmende Wirkung eines erhöhten cAMP_{intrazell.}- Spiegels ist wahrscheinlich auf die Aktivierung cAMP- regulierter Kinasen (A- Kinasen) [Alberts et al., 1989] und auf den verringerten Ca²⁺- Influx [Takenawa et al., 1986 / Schudt et al., 1991] zurückzuführen.

Wie unter 4.3.5. (Abb. 23/Tab. 4) dargestellt, wird auch die FNLNTL- induzierte Degranulation der Gelatinase-, Typ-I-Kollagenase- und Laktoferrin- enthaltenden Granula durch einen erhöhten cAMP_{intrazell.}- Spiegel gehemmt, dies jedoch in einem unterschiedlichen Ausmaß (60 % - 112 %). Diese Unterschiede in bezug auf die Sekretionshemmung der einzelnen Proteine/Enzyme sind ein weiterer Beleg für die unterschiedliche Kompartimentierung der hier untersuchten Proteine.

Die CB/FNLNTL- induzierte Degranulation wird ebenfalls durch Zardaverin-

Behandlung inhibiert, eine 100 % -ige Hemmung kann jedoch dabei nicht erreicht werden (Abb. 24/Tab. 4).

5.3. Einfluß des Zytoskeletts auf die Granulafreisetzung neutrophiler Granulozyten

5.3.1. Assoziation der Granula mit dem Zytoskelett

Bei Lyse der Zellen durch leichte Ultraschall-Behandlung und Abtrennung von Zytoskelett / Zytoskelett-assoziierten Bestandteilen durch Zentrifugation (2200 g) zeigt sich nach Zerstörung der Granula in Sediment und Überstand ein deutlicher Unterschied in der Granula- bzw. Proteinverteilung (4.5./Abb. 33). Die Assoziation spezifischer Granula/C-Partikel mit dem Zytoskelett ist, verglichen mit den Laktoferrin-/Elastase-/Myeloperoxidase- enthaltenden Kompartimenten, wesentlich schwächer (Abb. 33).

Nach Zentrifugation des Zell-Lysates befinden sich nur 15 % - 40 % der azurophilen Granula (Elastase/Myeloperoxidase) und Laktoferrin-speichernden Kompartimente - im Gegensatz zu > 90 % der Typ-I-Kollagenase- und Gelatinase- enthaltenden Granula - im Überstand.

Auf Grund der Ergebnisse des Kontrolltests (Abb. 34) ist auszuschließen, daß der hohe Gelatinase-/Kollagenaseanteil im Überstand durch Sekretion während der Inkubationszeit bedingt ist. Eine weitreichende Kosedimentation der größeren azurophilen Granula mit dem Zytoskelett durch bloßes "Herunterdrücken" durch Filamentnetzwerke etc. während der Zentrifugation ist auf Grund der Ultraschall-Behandlung und des mehrfachen Vortexens (nach Lyse der PMNL) auszuschließen.

Die Messung von weniger als 2 % des Elastasegehaltes im Überstand und mikroskopische Untersuchungen belegen, daß die Granula im Gegensatz zu den Zellen durch leichte Ultraschall-Behandlung nicht zerstört werden. Dies ist auf die hohe Stabilität der Granula zurückzuführen, die nach ihrer Isolierung noch für 24 Std. intakt bleiben (bei RT/in Puffer) [Baggiolini, mündliche Mitteilung].

Die Depolymerisation der Aktinfilamente (30-minütige CB-Behandlung) vor Lysierung der Zellen bedingt eine Erhöhung des Anteils freier azurophiler Granula im Überstand um 20 % - 30 % (Abb. 35). Ein für die C-Partikel/spezifischen Granula ermittelter Wert von > 90 % wird jedoch auch dabei nicht erreicht.

5.3.2. Beteiligung der Mikrotubuli an der Granulafreisetzung

Der Einfluß der Mikrotubuli an der Degranulation wurde durch Inkubation der PMNL mit Colcemid (Col), einem Colchicin-Derivat, untersucht. Colchicin, ein Alkaloid der Herbstzeitlosen, führt durch Bindung an Tubulin zur Depolymerisierung der Mikrotubuli (MT) [Wilson et al., 1974].

Wie in der Literatur für die β -Glukoronidase der PMNL nachgewiesen [Zurier et al., 1973], läßt sich auch die FNLNTL- induzierte Freisetzung von Typ-I-Kollagenase, Gelatinase und Laktoferrin durch ein Mikrotubuli- zerstörendes Agens zu 70 % - 100 % inhibieren; die Proteinausschüttung durch unbehandelte Kontrollzellen wird ebenfalls durch die Zerstörung der Mikrotubuli reduziert. Weiterhin zeigte sich (4.3.6./Abb. 27+28), daß auch die nach CB/FNLNTL-Zusatz einsetzende Degranulation fast vollständig durch Col zu inhibieren ist (Spendergruppe 1).

Für eine Reihe von Zelltypen wurde gezeigt, daß die Mikrotubuli zusammen mit sog. "**Motorproteinen**" (Dynein/Kinesine) das Transportsystem für sekretorische Vesikel und Organellen darstellen [Gelfand, 1989].

Auch bei PMNL scheint sowohl die FNLNTL- induzierte, als auch die durch CB/FNLNTL- Behandlung hervorgerufene Proteinsekretion von intakten Mikrotubuli abhängig zu sein. So beschreiben Rothwell et al. (1989) den Anstieg von MT-Granulakomplexen nach FMLP- Stimulierung von PMNL sowie die Isolierung einer MT-aktivierten ATP-ase aus den Zellen. Das Molekulargewicht und die immunologischen Eigenschaften dieser ATP-ase entsprechen denen des "Motorproteins" Kinesin.

5.3.3. Mikrofilamente und Granulafreisetzung

Die Zerstörung der Mikrofilamente durch Cytochalasin B führt zu einer Steigerung bzw. Induzierung der Proteinsekretion neutrophiler Granulozyten.

Aunis et al. (1988) haben an chromaffinen Zellen gezeigt, daß Aktinfilamente eine Barriere der Exozytose, d.h. der Granulafreisetzung, darstellen. Dabei wird einem submembranären Aktinfilamentnetz diese Funktion zugeschrieben. Auch andere motile Zellen besitzen einen dreidimensionalen Aktin-Cortex, der größere Partikel und Organellen im darunterliegenden Zytoplasma zurückhält [Burgoyne & Cheek, 1987 / Alberts et al., 1989]. Ein solches unter der Plasmamembran gelegenes Filamentnetz wird auch für PMNL beschrieben [Boyles & Bainton, 1979 / Roschger, 1990].

Die stark sekretions- steigernde Wirkung und die belegte Verringerung des F-Aktinanteils durch Cytochalasin B (4.3.1.) weisen darauf hin, daß auch bei PMNL die Mikrofilamente (vor allem ein intaktes kortikales Aktinnetzwerk) in Abhängigkeit von der Granulagröße eine Sekretionsbarriere darstellen. So erfolgt die Degranulation der kleinsten Protein-speichernden Kompartimente (C-Partikel/Gelatinase) bei Stimulierung mit FNLNTL am stärksten; sie tritt auch während der Lyse und bei unstimulierten Kontrollen in einem deutlich höheren Maß auf als die der größeren Granula. Auch wird eine weitreichende Freisetzung ($> 6\%$) des größten der drei beschriebenen Granulatypen (azurophile Granula) trotz Stimulierung der Zellen mit verschiedenen Agentien erst nach Zerstörung der Aktinfilamente erreicht. Eine der CB- induzierten Steigerung vergleichbare Elastase-/Myeloperoxidasefreisetzung kann auch durch ein weiteres Mikrofilament-zerstörendes Agens (Cytochalasin D) erreicht werden (4.3.1.1.).

Wie hier gezeigt (4.3.1./Abb. 11/12/13) ist das Ausmaß der CB-induzierten Proteinsekretion von der Inkubationsdauer mit dem Cytochalasin abhängig und korreliert mit der Abnahme von F-Aktin (4.3.1.1./Tab.3) [Henson et al., 1978].

Mikroskopischen Untersuchungen an CB- behandelten PMNL und die starke Inhibierung der CB- induzierten Degranulation durch Erhöhung des $cAMP_{intrazell.}$ - Spiegels und Zerstörung der Mikrotubuli belegen, daß die Sekretionssteigerung durch eine solche Behandlung nicht auf der spontanen Verschmelzung mit der Zellmembran oder durch Zerstörung der Zellen bedingt ist.

Die Mikrofilament-zerstörende Wirkung von Cytochalasin B und die damit verbundene Veränderung der Zellmorphologie konnte durch lichtmikroskopische Untersuchungen (4.3.1.) und Darstellung der Aktinfilamente mittels Fluoreszenzmarkierung (4.3.1.1./Abb. 16) gezeigt werden. Die nach CB-Zusatz zu beobachtende dünne, dem Substrat aufliegende Zytoplasmasschicht weist nur einen geringen F-Aktin Gehalt auf. Die Zerstörung der Mikrofilamente durch Cytochalasin (Zerstörung des kortikalen Aktinnetzwerks) führt offenbar zu einem Verlust der Zellspannung und zum "Zerfließen" des Zytoplasmas über das Substrat. Dieser Vorgang ist auch in REM-Aufnahmen deutlich zu erkennen (4.6.1./Abb. 38 c), dabei zeigen sich unter der Membran globuläre Strukturen, die in ihrer Größe den Granula entsprechen [Baggiolini, 1980 / Damiano et al., 1988]. Möglicherweise ist die erhöhte Proteinsekretion nach CB-Zusatz und Stimulierung vor allem durch Degranulation aus diesen Zytoplasmabereichen bedingt.

Mit CB vorinkubierte PMNL weisen auch nach 20-minütiger FNLNTL-Stimulierung keine Polarisierung auf, sondern zeigen blasenartige Ausstülpungen auf ihrer Oberfläche ("round-blebbed-shape"), die nur einen geringen Anteil an F-Aktin aufweisen. Auch Watts et al. (1991) beschreiben nach Vorbehandlung mit Cytochalasin und anschließendem FMLP-Zusatz das Verbleiben der Zellen in einem "round-blebbed-shape" Stadium, was auf die Verringerung der initialen Aktinpolymerisation zurückgeführt wird.

5.3.4. Anheftung und Proteinsekretion

Die Anheftungsrate der PMNL variiert bei Behandlung mit verschiedenen Agentien: Cytochalasine und FNLNTL erhöhen die Adhärenz, Prostaglandin $F_{2\alpha}$ dagegen setzt sie herab (4.3.7.1./Abb. 30/29).

Eine Erhöhung der Adhäsion durch Formyl-Peptide wird auch in der Literatur beschrieben und auf die Aktivierung der Proteinkinase C, in Zusammenhang mit einem ansteigenden F-Aktin-Gehalt und veränderten Ca^{2+} -Spiegel zurückgeführt [Davies et al., 1990]. Die Steigerung der Anheftungsrate nach Cytochalasin-Behandlung scheint nicht auf den gleichen intrazellulären Mechanismen zu beruhen, denn CB/CD und

FNLPNTL zeigen in bezug auf die Adhärenz der Zellen keinen synergistischen Effekt (Abb. 29). Auch führt der Zusatz von Cytochalasinen nicht zu einem Anstieg der Ca^{2+} -intrazell.-Konzentration und bedingt eine Abnahme des F-Aktin Gehalts [White et al., 1983 / Omann & Sklar, 1988]. Möglicherweise beruht die gesteigerte Adhärenz der Neutrophilen nach Behandlung mit Cytochalasinen auf der Vergrößerung der dem Substrat aufliegenden Membranbereiche (4.3.1.1./Abb. 16 // 4.6.1./Abb. 38), und damit auf einer erhöhten Anzahl Adhärenz-vermittelnder Rezeptoren [Mege et al., 1990 / Osborn, 1990], die mit dem Substrat wechselwirken können.

Aus der Literatur sind keine Untersuchungen über die Wirkung von $\text{PGF}_2\alpha$ auf die Adhäsion oder das Zytoskelett von PMNL bekannt. Die hier verzeichnete (Abb. 30) Verringerung der Anheftungsrate steht wahrscheinlich ebenfalls mit einer Reorganisation des Zytoskeletts in Zusammenhang.

Die an suspendierten/angehefteten PMNL durchgeführten Sekretionsexperimente zeigen eine durch Anheftung deutlich erhöhte Gelatinase-/Typ-I-Kollagenase-Ausschüttung durch stimulierte und nicht stimulierte Zellen (4.3.7.2./Abb. 31). Dies ist wahrscheinlich auf die Aktivierung der Proteinkinase C und die gleichzeitig erfolgende Erhöhung des Ca^{2+} -intrazell.- Spiegels bei länger andauernder Anheftung zurückzuführen [Boyles & Bainton, 1979 / Davies et al., 1990].

Die CB- bzw. CB/FNLPNTL- induzierte Proteinfreisetzung (Elastase/Laktoferrin) wird dagegen durch Anheftung der PMNL eher verringert (Abb. 32). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß der bei andauernder Adhärenz beobachtete, sehr stabile Anstieg von F-Aktin im Cortex [Boyles & Bainton, 1979 / Southwick et al., 1989] dem Mikrofilament-zerstörenden und sekretionssteigernden Effekt ("Barrierefunktion" des Aktinnetzwerkes) des Cytochalasins entgegenwirkt.

5.4. Untersuchungen zur Elastasesekretion

5.4.1. Assoziation der Elastase mit unlöslichen Zellbestandteilen

Bei der Bestimmung des Protein-Gesamtgehalts in **Zell-/Granulalysaten** (Gesamtlysate) war ein 40-50 % -iger Aktivitätsverlust in bezug auf die Elastase nach Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen (verglichen mit nicht zentrifugierten Lysaten) zu verzeichnen. Dieses Ergebnis deutet auf eine Assoziation des Enzyms mit Membran- bzw. Zellbestandteilen hin. Auch bei den von Postma et al. (1986) durchgeführten Experimenten werden Diskrepanzen bei der in Überstand/Sediment und Gesamtextrakt gemessenen Enzymmenge beschrieben.

Nach Behandlung des Sediments mit 1 M NaCl zeigt sich, daß eine Assoziation der Elastase mit unlöslichen Zellbestandteilen vorliegt (**4.7.1./Abb. 39**). Durch Behandlung mit 1 M NaCl sind 40 % des Enzyms aus dem Pellet (P1) zu eluieren, wobei nach erneuter Zentrifugation noch etwa 8 % des Elastasegehalts im Pellet (P2) verbleiben. Die Summe der im Überstand (1/2) und Sediment zu messenden Elastaseaktivitäten stimmt dabei gut mit dem in nicht zentrifugierten Gesamt-Lysaten derselben Spender ermittelten Werten überein (**4.7.1./Tab. 6**).

Die beobachtete Assoziation der Serinprotease mit unlöslichen Zellbestandteilen, könnte durch die von Stein et al. (1985) beschriebene Wechselwirkung des Enzyms mit der Kernmembran bedingt sein.

Wie unter **4.3.** dargestellt, kann bei Stimulierung der Neutrophilen trotz Zusatz von CB eine Elastasefreisetzung über 50 % nicht induziert werden. Dies ist jedoch nicht durch eine Assoziation des sezernierten, bei pH 7 positiv geladenen Enzyms mit der Zellmembran (negativ geladen) bedingt. Nur 2-5 % der Gesamtaktivität der Serinprotease sind nach Abnahme des Überstandes durch NaCl (Ü 2) von der Membran stimulierter PMNL zu eluieren (**4.7.1./Abb. 40**).

Die Konzentration von Elastase im Überstand 2 wurde im photometrischen Test und mittels ELISA bestimmt, wobei die in beiden Testverfahren gemessenen Werte gute

Übereinstimmung zeigten (4.7.1.). Mikroskopische Untersuchungen konnten belegen, daß die PMNL durch eine 5-6 - minütige Salzbehandlung nicht zerstört werden.

5.4.2. Darstellung sezernierter Elastase

Elastase kommt in drei verschiedenen Formen vor, die sich durch variierende Glykosylierung unterscheiden; Aktivitätsunterschiede der drei Formen sind nicht festzustellen [Green et al., 1991].

Die Darstellung der Aktivität sezernierter Elastase in SDS-Substratgelen (4.7.2./Abb. 40) belegt, daß die durch Stimulierung der Neutrophilen erreichte Freisetzung alle drei Formen (30 kDa/ 33 kDa/ 36 kDa) des Enzyms umfaßt (bei der Präparation bzw. Einengung der Proteinase wurde DPBS + 1 M NaCl verwendet).

Dabei ist die Aktivität der 33 kDa- Form Elastase in den Proben am größten, die der 36 kDa- Form am schwächsten. Dies stimmt z.T. mit den in der Literatur angegebenen Mengenverhältnissen der drei Elastaseformen (aus Zellextrakten) überein [Baught & Travis, 1976]. Von Watorek wird ebenfalls ein geringer Anteil der schwersten Form beschrieben; dagegen soll die Isoform mit dem kleinsten Molekulargewicht den größten prozentualen Anteil ausmachen. Möglicherweise ist der Unterschied zwischen den hier dargestellten und in der Literatur ermittelten Anteilen der 33 kDa- und 30 kDa- Form durch den Abbau der Zuckerseitenketten (33 kDa ---> 30 kDa) bedingt. Auch bei dem eingesetzten Standard (HL-Elastase aus humanem Sputum) zeigt sich eine schwache Aktivität der 35 kDa- Form, während die Aktivität der mittleren (33 kDa) und kleinsten Form (30 kDa) etwa gleich groß ist (Abb. 40 a-c).

Das Auftreten der einzelnen Elastase- Banden ist abhängig von der jeweiligen Gesamtaktivität in den eingeengten Proben (4.7.2./Tab.7), vom Gelatinanteil der Gele sowie von der Inkubationsdauer bei 37°C. Die im oberen Bereich der Gele auftretenden Aktivitätsbanden (70-100 kDa) sind auf den Gelatinabbau durch Gelatinase bzw. Typ-I-Kollagenase zurückzuführen [Knäuper, 1989 / Oberhoff, 1990].

Zusammenfassend ist festzustellen: die durchgeführten Sekretionsexperimente belegen, daß die Proteine/Enzyme Typ-I-Kollagenase, Gelatinase, Elastase, Myeloperoxidase und Laktoferrin nicht "deckungsgleich" in den Granula neutrophiler Granulozyten gespeichert werden. So ergibt sich nach Stimulierung der PMNL mit verschiedensten Agentien für alle untersuchten Proteine ein voneinander abweichendes Sekretionsmuster. Ebenso variiert die prozentuale Hemmung der FNLPTL-induzierten Freisetzung der Proteine durch Erhöhung des cAMP_{intrazell.}-Spiegels.

Die Sekretion der Proteine/Enzyme, die in der Hauptgruppe der azurophilen Granula gespeichert werden, ist nur durch gleichzeitige Zerstörung der Mikrofilamente mittels Cytochalasin B zu induzieren. Die dieser Gruppe zugeordneten Enzyme Myeloperoxidase und Elastase werden jedoch in unterschiedlichen Subpopulationen der azurophilen Granula kompartimentiert. Auch ein Teil der Gesamtmenge an Laktoferrin scheint in dieser Granulagruppe gespeichert zu werden; in der Literatur wird dieses Protein häufig den spezifischen Granula zugeordnet.

Weiterhin deuten auch Unterschiede bei der Assoziation der Proteine bzw. der sie speichernden Kompartimente mit dem Zytoskelett und die variierende Freisetzung durch suspendierte/angeheftete PMNL auf die Existenz mehrerer Subpopulationen der Granula-Haupttypen mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung hin.

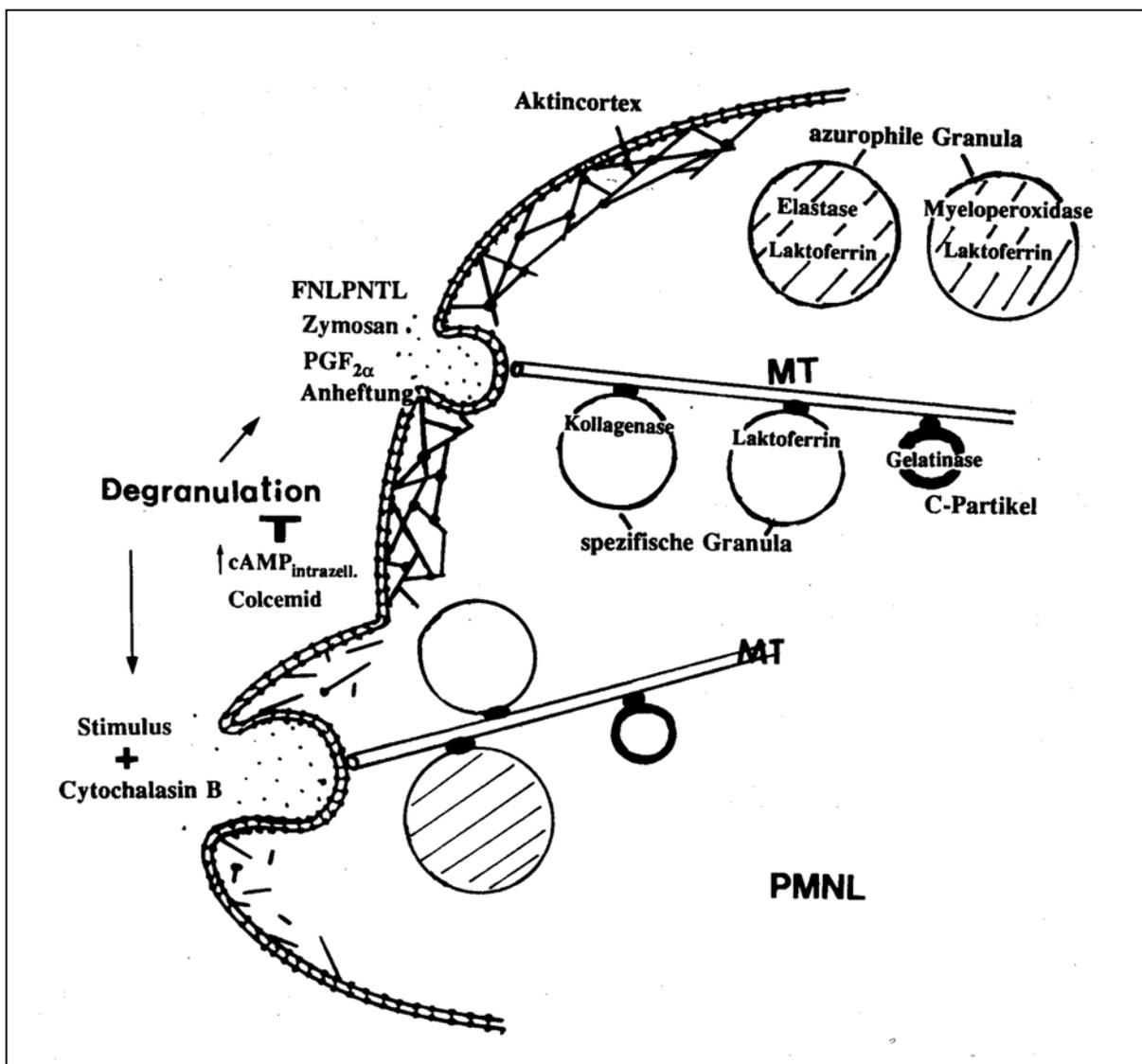
Das Zytoskelett der PMNL hat großen Einfluß auf die Degranulation der neutrophilen Granulozyten. Die Mikrofilamente (F-Aktin) bzw. das corticale Aktinfilamentnetz der PMNL stellt, in Abhängigkeit von der Granulagröße, eine Sekretionsbarriere dar. So erfolgt die Freisetzung der in den kleinsten Kompartimenten gespeicherten Metalloproteinase Gelatinase durch stimulierte und unstimulierte Zellen am stärksten. Die Sekretion der größten Granula (azurophile) wird - im Gegensatz zu den spezifischen Granula/C-Partikeln - erst nach Zerstörung der Mikrofilamente erreicht. Dabei steigt die Sekretionsrate bei verlängerter Inkubationsdauer mit dem F-Aktin-zerstörenden Agens CB an und korreliert mit der Zunahme an monomerem Aktin im Überstand von Zell-Lysaten (Abnahme von F-Aktin in den Zellen).

Auch nach längerer Behandlung mit CB ist der Anteil an freier Elastase (azurophile Granula) im Überstand wesentlich geringer, als der, der anderen Proteine. Dies ist jedoch nicht auf die Assoziation des positiv geladenen Enzyms mit der Zellmembran zurückzuführen. Auch ein Ausschluß einer der drei Formen der Serinproteinase aus den

nur zu maximal 50 % freigesetzten, Elastase- speichernden Kompartimenten ist nicht festzustellen.

Mikrotubuli, eine weitere Hauptgruppe von Zytoskelettproteinen, sind notwendig für die Degranulation neutrophiler Granulozyten. So führt die Zerstörung der Mikrotubuli durch Colcemid zu einer fast vollständigen Inhibierung der FNLNTL- und CB/FNLNTL- induzierten Degranulation.

Abb. 42 *Proteinfreisetzung und -kompartmentierung neutrophiler Granulozyten*



6. Literaturverzeichnis

- Aaku, E., Sorsa, T., Wikström, M. (1990). Human immunoglobulin G potentiates superoxide production induced by chemotactic peptides and causes degranulation in isolated human neutrophils. *Biochem. Biophys. Acta* 1052, 243-247.
- Adeyemi, E.O., Hodgson, H.J.F. (1988). Augmented release of human leucocyte lactoferrin (and elastase) during coagulation. *J. Clin. Lab. Immunol.* 27,1-4.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., Watson, I.D. (1989). The cytoskeleton. In: *Molekularbiology of the Cell*, 2nd edition; pp. 613-679. Garland Publ. Inc./New York.
- Anderson, D.C., Wible, L.J., Hughes, B.J., Smith, C.W., Brinkley, B.R. (1982). Cytoplasmic microtubules in polymorphonuclear leukocytes: effects of chemotactic stimulation and colchicine. *Cell* 31, 719-729.
- Aunis, D., Bader, M.-F. (1988). The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *J. exp. Biol.* 139, 253-266.
- Babior, B.M. (1987). The respiratory burst oxidase. *TIBS* 12, 241-243.
- Baggiolini, M., (1980). The neutrophils. In: *The Cell Biology of Inflammation* (Weissmann, G., ed.); pp. 163-188. Elsevier, North Holland Biomedical Press/Amsterdam, New York.
- Bainton, D.F. (1973). Sequential release of the two types of polymorphonuclear leukocyte granules during phagocytosis of microorganisms. *J. Cell Biol.* 58, 249-264.
- Bakkenist, A.J., Wever, R., Vulsma, T., Plat, H., Van Gelder, B.F. (1978). Isolation procedure and some properties of myeloperoxidase from human leucocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 524, 45-54.
- Bakowski, B. (1990). Untersuchungen zur Migration menschlicher polymorphkerniger neutrophiler Granulocyten durch Basalmembranen. Dissertation am Lehrstuhl für Biochemie (I) der Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld.
- Baugh, R., Travis, J. (1976). Human leukocyte granule elastase: rapid isolation and characterization. *Biochem.* 15, 836-841.
- Bauldry, S.A., Wykle, R.L., Bass, D.A. (1988). Phospholipase A₂ activation in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 263, 16787-16795.
- Bentwood, B.J., Henson, P.M. (1980). The sequential release of granule constituents from human neutrophils. *J. Immunol.* 124, 855-862.
- Bergmann, U., Michaelis, J., Oberhoff, R., Knäuper, V., Beckmann, R., Tschesche, H. (1989). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative determination of human leucocyte collagenase and gelatinase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27, 351-359.
- Berridge, M.J. (1985). Die Signalübertragung in die Zelle. *Spektrum der Wissenschaft*, 136-147.

6. Literaturverzeichnis

- Berridge, M.J., Weeds, A. (1986). Calcium and the cytoskeleton. *British Med. Bull.* 42, 385-390.
- Bode, W. (1988). The specific interaction of human leukocyte elastase with various protein inhibitors. In: 39. Colloquium Mosbach, Protein Structure and Protein Engineering, pp. 75-85. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Bode, W. (1990). Structural requirements of efficient inhibition of human leukocyte elastase by native and modified inhibitors. In: Proteinases and their Inhibitors: regulation of allular metabolism. 19 th winter school of the institute of biology/Jagellonian University (Dubina, A., ed.); pp.33-37.
- Bonney, R.J., Smith, R.I. (1986). Evidence for the role of neutral proteases in chronic inflammatory diseases in humans. In: Advances in Inflammation Research, Vol.11 (Otterness, I., ed.); pp. 127-133. Raven Press/New York.
- Boyles, J., Bainton, D. (1979). Changing patterns of plasma membrane-associated filaments during the initial phases of polymorphonuclear leukocyte adherence. *J. Cell Biol.* 82, 347-368.
- Böyum, A. (1976). Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.* 5, Suppl.5, 9-15.
- Bretz, U., Baggiolini, M. (1974). Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophil polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 63, 251-269.
- Burck, H-C. (1981). Fixierung. In: Histologische Technik (Burck, H-C., Hrsg.); S. 27-49. Georg Thieme Verlag/Stuttgart.
- Burgoyne, R.D., Check, T. (1987). Role of fodrin in secretion. *Nature* 326, 418.
- Carson, M., Weber, A., Zigmond, S.H. (1986). An actin-nucleating activity in polymorphonuclear leukocytes is modulated by chemotactic peptides. *J. Cell Biol.* 103, 2707-2714.
- Cassimeris, L., McNeil, H., Zigmond, S.H. (1990). Chemoattractant-stimulated polymorphonuclear leukocytes contain two populations of actin filaments that differ in their spatial distributions and relative stabilities. *J. Cell Biol.* 110, 1067-1075.
- Chenoweth, D.E., Rowe, I.G., Hugli, T.E. (1979). A modified method of chemotaxis under agarose. *J. Immunol. Meth.* 25, 337-353.
- Cooper, J.A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 105, 1473-1478.
- Damerval, C., le Guilloux, M., Blaisomeau, J., de Vienne, D. (1987). A simplification of Heukeshoven and Dernick's Silver staining of proteins. *Elektrophoresis* 8, 158-159.
- Damiano, V. V., Kucich, U., Murer, E. (1988). Ultrastructural quantitation of peroxidase- and elastase-containing granules in human neutrophils. *Am. J. Pathol.* 131, 235-243.

6. Literaturverzeichnis

- Davies, P.A., Hallam, T.J., Merritt, J.E. (1990). A role for calcium and protein kinase C in agonist-stimulated adhesion of human neutrophils. *Biochem. J.* 267, 13-16.
- De Duve, C. (1975). Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189, 186-194.
- Devreotes, P.N., Zigmond, S.H. (1988). Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and *Dictyostelium*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4, 649-86.
- Dewald, B., Bretz, U., Baggiolini, M. (1982). Release of gelatinase from a novel secretory compartment of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 70, 518-525.
- Dexter, D., Rubins, J.B., Manning, E.C., Khachatryan, L., Dickey, B.F. (1990). Compartmentalization of low molecular mass GTP-binding proteins among neutrophil secretory granules. *J. Immun.* 145, 1845-1850.
- Docherty, A.J.P., Murphy, G. (1990). The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteins. *Ann. Rheum. Dis.* 49, 469-479.
- Erdős, E.G., Wagner, B., Harbury, C.B., Painter, R.G., Skidgel, R.A., Xiang-Guang, F. (1989). Down-regulation and inactivation of neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 264, 14519-14523.
- Fechtheimer, M., Zigmond, S.H. (1983). Changes in cytoskeletal proteins of polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic peptides. *Cell Motility* 3, 349-361.
- Fink, P.C., Suin de Boutemard, C., Gaitzsch, A. (1988). Bestimmung von Endotoxinämie und Leukozyten-Elastase bei Patienten mit Sepsis. *Labor-Medizin* 11, 409-415.
- Freye, E., Leopold, C. (1991) Opiate und Opiatantagonisten, I. theoretische Grundlagen der Opioidwirkung. *Deutsche Apothekerzeitung* 131. Jahrg., 1517-1523.
- Galvan, M., Schudt, C. (1990). Actions of the phosphodiesterase inhibitor zaraverine on guinea-pig ventricular muscle. *Arch. Pharmacol.* 342, 221-227.
- Gelfand, V.I. (1989). Cytoplasmic microtubular motors. *Current Opinion in Cell Biol.* 1, 63-66.
- Goetzl, J.E., Goldstein I.M. (1985). Cellular components of inflammation: granulocytes. In: *Textbook of inflammation*, Vol. 1, (Kelley, Harris, Ruddy, Sledge, eds.); pp: 115-143, WB Saunders/Karger/Basel.
- Golditz, I.G., Movat, H.Z. (1984 a). Kinetics of neutrophil accumulation in acute inflammatory lesions induced by chemotaxins and chemotaxinogens. *J. Imm.* 133, 2168-2173.
- Green, B.G., Weston, H., Ashe, B.M., Doherty, J., Finke, P., Hagman, W., Lark, M., Mao, J., Maycock, A., Moore, V., Mumford, R., Sha, S., Walakovits, L., Knight, W.B. (1991). PMN elastase: a comparison of the specificity of human isoenzymes and the enzyme from other species toward substrates and inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* 286, 284-292.

6. Literaturverzeichnis

- Gresham, H.D., Goodwin, J.L., Allen, P.M., Anderson, D.C., Brown, E.J. (1989). A novel member of the integrin receptor family mediates Arg-Gly-Asp-stimulated neutrophil phagocytosis. *J. Cell Biol.* 108, 1935-1943.
- Hamers, M.N., Roos, D. (1985). Oxidative stress in neutrophilic granulocytes. In: *Oxidative Stress* (Sies, H., ed.); pp: 351-376. Academic Press/New York.
- Harboe, J., Ingild, A. (1973). Immunization, isolation of immunoglobins, estimation of antibody titre. *Scand. J. Immunol.* 3, 11a-11c.
- Harrison, J.E., Pabalan, S., Schultz, J. (1977). The subunit structure of crystalline canine Myeloperoxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 493, 247-259.
- Haston, W.S. (1987). F-actin distribution in polymorphonuclear leucocytes. *J. Cell Sci.* 88, 495-501.
- Hasty, K.A., Pourmotabbed, T.F., Goldberg, G.I., Thompson, J.P., Spinella, D.G., Stevens, R.M., Mainardi, C.L. (1990). Human neutrophil collagenase. *J. Biol. Chem.* 265, 11421-11424.
- Henson, P.M., Zanolari, B., Schwarzmann, N.A., Hong, S.R. (1978). Intracellular control of human neutrophil secretion. *J. Immunol.* 121, 851-855.
- Hibbs, M.S., Hasty, K.A., Seyer, J.M., Kang, A.H., Mainardi, C.L. (1985). Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* 260, 2493-2500.
- Hibbs, M. S., Bainton, D. F. (1989). Human neutrophil gelatinase is a component of specific granules. *J. Clin. Invest.* 84, 1395-1402.
- Hoffstein, S.T. (1980). Intra- and extracellular secretion from polymorphonuclear leukocytes. In: *The Cell Biology of Inflammation* (G. Weissmann, ed.); pp. 387-430. Elsevier/North Holland Biomedical Press/Amsterdam/New York/Oxford.
- Hopwood, D. (1972). Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation. *Histochem. J.* 4, 267-303.
- Janoff, A. (1988). Emphysema: Proteinase -Antiproteinase imbalance. In: *Basic principles und clinical correlates*, (Gallin, J.I., Goldstein, M., Snyderman, R., eds.); pp. 803-814. Raven Press/New York.
- Jesaitis, A.J., Tolley, J.O., Bokoch, G.M. (1989). Regulation of chemoattractant receptor interaction with transducing proteins by organizational control in the plasma membrane of human neutrophils. *J. Cell Biol.* 109, 2783-2790.
- Kaplan, A.P., Silverberg, M. (1988). Mediators of inflammation: an overview. In: *Methods in Enzymology*; Vol. 163: *Immunochemical Thechniques, Part M. Chemotaxis and Inflammation* (Di Sabato, G., ed.); pp. 3-23. Academic Press Inc./New York.
- Kavelaars, A., Ballieux, E.R., Heijnjen, C.J. (1990). β -Endorphin secretion by Human peripheral blood mononuclear cells: regulation by glucocorticoids. *Life Science* 46, 1233-1240.

6. Literaturverzeichnis

- Keller, H.U., Zimmermann, A., Schmitt, M., Cottier, H. (1985). Shape and motility of leukocytes and tumor cells.
Prog. appl. Microcirc. 7, 1-14.
- Kleesiek, K. (1989). Blutzellen und Blutbildende Organe. In: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 2. Auflage (H. Greiling, A. M. Gressner, Hrsg.);
S.635-713. Schattauer Verlag/Stuttgart.
- Klein, T.O. (1989). Nervensystem. In: Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie (Greiling, H., Gressner, A.M., Hrsg.); pp. 860-889. Verlag Schattauer/Stuttgart.
- Knäuper, V. (1989). Charakterisierung von Prokollagenase und rheumatoidem Kollagenaseaktivator aus menschlicher Synovialflüssigkeit. Dissertation am Lehrstuhl für Biochemie (I) der Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld.
- Knäuper, V., Krämer, S., Reinke, H., Tschesche, H. (1990). Characterization and activation of procollagenase from human polymorphonuclear leucocytes.
Eur. J. Biochem. 189, 295-300.
- Kokot, K., Teschner, M., Schaefer, R.M., Heidland, A. (1987). Stimulation and inhibition of elastase release from human neutrophil-dependence on the calcium messenger system.
Mineral Electrolyte Metab. 13, 189-195.
- Lacal, P., Pulido, R., Sanchez-Madrid, F., Cabanas, C., Mollinedo, F. (1988). Intracellular localization of a leukocyte adhesion glycoprotein family in the tertiary granules of human neutrophils.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 154, 641-647.
- Lackie, J. M. (1988). The behavioral repertoire of neutrophils requires multiple signal transduction pathways. J. Cell Sci. 89, 449-452.
- Lang, S. (1983). Blut. In: Pathophysiologie und Pathochemie. S. 92-128; Ferdinand Enke Verlag/Stuttgart.
- Maderazo, E.G., Woronick, C.L., Ward, P.A. (1988). Inhibitors of chemotaxis. In: Methods in Enzymology, Vol. 162: Immunochemical Techniques, Part L. Chemotaxis and Inflammation (di Sabato, G., ed.);
pp. 223-236. Academic Press/San Diego.
- Matheson, N.R., Wong, P.S., Schuyler, M., Travis, J. (1981). Isolation and properties of human neutrophil myeloperoxidase. Biochemistry 20, pp. 235-336.
- Mege, J-L., Capo, C., Andre, P., Bongrand, B., Bongrand, P. (1990). Mechanisms of leukocyte adhesion. Biorheology 27, 433-444.
- Metcalf, J.A., Gallin, I.J., Nauseef, W.A., Root, R.K. (1986). In: Laboratory Manual of Neutrophil Function. (Metcalf et al., eds.); pp. 87. Raven Press/New York.
- Mohr, W., Wild, A., Wolf, H.P. (1981). Role of polymorphs in inflammatory cartilage destruction in adjuvant arthritis of rats.
Ann. Rheum. Dis. 40, 171-176.
- Müller, J., Botzenhardt, U., Lemmel, E.- M. (1982). Studies on the mechanism of PMNL activation II. by triggering the alternative pathway of complement activation.
Blut 45, 13-22.

6. Literaturverzeichnis

- Murphy, G., Cawston, T.E., Galloway, W.A., Barnes, M.J., Bunning, R.A.D., Mercer, E., Reynolds, J.J., Burgeson, R.E. (1981). Metalloproteinases from rabbit bone culture degrades types IV and V collagens, laminin and fibronectin. *Biochem. J.* 199, 807-811.
- Nakajima, K., Powers, J.C., Ashe, B.M., Zimmermann, M. (1979). Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. *Biol. Chem.* 254, 4027-4031.
- Neumann, S., Lang, H. (1989). Entzündung. In: *Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie* (Greiling, H., Gressner, A.M., Hrsg.); S.1022-1054. Verlag Schattauer.
- Nitsch, M., Gabrijelcic, D., Tschesche, H. (1990). Separation of granule subpopulations in human polymorphonuclear leukocytes. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371, 611-615.
- Nourshargh, S., Hoult, J.R.S. (1986). Inhibition of human neutrophil degranulation by Forskolin in the presence of phosphodiesterase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 122, 205-212.
- Oberhoff, R. (1990). Gelatinase polymorphkerniger Leukozyten: Charakterisierung, Untereinheitenstruktur und Substratspezifität. Dissertation am Lehrstuhl für Biochemie (I) der Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld.
- Olmsted, J.B. (1986). Microtubule-associated Proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 2, 421-457.
- Olsson, I., Venge, P. (1980). The role of human neutrophil in the inflammatory reaction. *Allerg.* 35, 1-13.
- Omann, G.M., Allen, R.A., Bokoch, G.M., Painter, R.G., Traynor, A.E., Sklar, L.A. (1987). Signal transduction and cytoskeletal activation in the neutrophil. *Physiological Reviews* 67, 285-322.
- Omann, G.M., Sklar, L.A., (1988). Response of neutrophils to stimulus infusion: differential sensitivity of cytoskeletal activation and oxidant production. *J. Cell Biol.* 107, 951-958.
- Osborn, L. (1990). Leucocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 62, 3-6.
- Painter, R., Dukes, R., Sullivan, J., Carter, R., Erdös, E.G., Johnson, A.R. (1988). Function of neutral endopeptidase on the cell membrane of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 263, 9456-9461.
- Parmley, R.T., Takagi, M., Barton, J.C., Boxer, L.A., Austin, R.L. (1982). Ultrastructural localization of laktoferrin and iron-binding protein in human neutrophils and rabbit heterophils. *Am. J. Pathol.* 109, 343-358.
- Parmely, R.T., Rice, W.G., Kinkade, J.M., Gilbert, C., Barton, J.C. (1987). Peroxidase-containing microgranules in human neutrophils: physical, morphological, cytochemical and secretory properties. *Blood* 70, 1630-1638.
- Perez, H. D., Marder, S., Elfman, F., Ives, H. E. (1987). Human neutrophils contain subpopulations of specific granules exhibiting different sensitivities to changes in cytosolic free calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 976-981.

6. Literaturverzeichnis

- Peter, C., Haston, W., Haston, W.S. (1988). Chemotaxis. In: Immunochemical Techniques, Vol 162: Part L: Chemotaxis and Inflammation (di Sabato, G.; ed.); pp. 3-17. Academic Press, Inc./New York.
- Plattner, H., Zingsheim, H.P. (1987). Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. Gustav Fischer Verlag/Stuttgart.
- Postma, D.S., Folkers, B., Sliuter, H.J., Kauffman, H.F. (1986). Discrepancies in release of elastase from human peripheral polymorphonuclear leukocytes. Eur. J. Respir. Dis. 69, 217-224.
- Pschyrembel, W. (1989). Klinisches Wörterbuch. 256. Auflage, (Zink, C., Hsrg); Verlag Walter de Gruyter/Berlin.
- Püttner, J., Becker, R. (1983). Peroxidases. In: Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.); pp. 286-293. Verlag Chemie GmbH/Weinheim.
- Rapoport, S.M. (1987). Hormone. In: Medizinische Biochemie; S. 648-707. Verlag Volk und Gesundheit/Berlin.
- Rapoport, S.M. (1987). Erythrozyten. In: Medizinische Biochemie; S. 552-561. Verlag Volk und Gesundheit/Berlin.
- Rest, R.F. (1988). Human neutrophil and mast cell proteases implicated in inflammation. In: Methods of Enzymology, Vol.163 : Part M, Chemotaxis and Inflammation (di Sabato, ed.); pp. 309-327. Academic Press/New York.
- Retran, A., Johnson, K.J., Wiggins, R.C., Kunkel, R.G., Ward, P.A. (1984). Evidence for the role of oxygen radicals in acute nephrotoxic nephritis. Lab. Invest. 51, 396-403.
- Rice, W.G., Kinkade, M., Parmely, R.T. (1986). High resolution of heterogeneity among neutrophil granules: biochemical, and ultrastructural properties of isolated fractions. Blood 68, 541-555.
- Rice, W.G., Ganz, T., Kinkade, M., Selsted, M.E., Lehrer, R.I., Parmley, R.T. (1987). Defensin-rich dense granules of human neutrophils. Blood 70, 757-765.
- Rick, W. (1977). Hämatologie. In: Klinische Chemie und Mikroskopie; S. 11-86. Gustav Thieme Verlag/Stuttgart.
- Roschger, P., Graninger, W., Klima, H. (1990). Different influences of cytochalasin B on the activation of human neutrophils settled onto petri dishes displayed by simultaneously detected native and luminol-dependent luminescence. J. of Bioluminescence and Chemiluminescence 5, 171-177.
- Rothwell, S. W., Nath, J., Wright, D. G. (1989). Interactions of cytoplasmic granules with microtubules in human neutrophils. J. Cell Biol. 108, 2313-2326.
- Schalkwijk, J., Joosten, L.A.B., van den Berg, W.B., van de Putte, L.B.A. (1988) Elastase secreted by activated polymorphonuclear leukocytes causes chondrocyte damage and matrix degradation in intact articular cartilage. Agents and Action, 23, 1/2.

6. Literaturverzeichnis

- Schapira, M., Despland, E., Scott, C.F., Boxer, L.A., Colman R.W. (1982). Purified human kallikrein aggregates human blood neutrophils.
J. Clin. Invest. 69, 1199-2002.
- Schettler, A., Thorn, H., Jockusch, B.M., Tschesche, H. (1990). Release of proteinases from stimulated polymorphonuclear leucocytes.
Eur. J. Biochem. 197, 197-202.
- Schettler, A. (1988). Korrelation zwischen chemotaktischer Stimulierung und Proteinasesekretion bei humanen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie (Abt. Zellbiologie) der Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld.
- Schmitt, M., Keller, H. U., Cottier, H. (1986). Qualitative and quantitative assessment of human polymorphonuclear leukocyte (PMNL) functions.
Beitr. Infusionstherapie klin. Ernähr. 15, 196-230.
- Schudt, C., Winder, s., Forderkunnz, S., Hatzelmann, A., Ulrich, V. (1991). Influence of selektive phosphodiesterase inhibitors on human neutrophil functions and levels of cAMP and Ca_i.
Naumyer Schniedeberg Arch. Pharmacol. (submitted).
- Simchowitz, L., Spilberg, I., Atkinson, J.P. (1980). Superoxid and granule enzyme release induced by ionophore A 23187.
J. Lab. Clin. Med. 96, 408-424.
- Singer, I. I., S. Scott, D. W. Kawka, D. M. Kazazis (1989). Adhesomes: Specific granules containing receptors for laminin, C3bi/fibrinogen, fibronectin, and vitronectin in human polymorphonuclear leukocytes and monocytes.
J. Cell Biol. 109, 3169-3182.
- Sinha, S., Watorek, W., Karr, S., Giles, J., Bode, W., Travis, J. (1990). Primary structure of human neutrophil elastase.
Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 2228-2232.
- Smith, W.C., Hollers, J.C., Patrick, R.A., Hassett, C. (1979). Motility and adhesiveness in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 63, 221-229.
- Smith, E.M., Harbour-McMenamin, D., Balock, E.J. (1985). Lymphocyte production of endorphin-mediated immunoregulatory activity.
J. Immunol. 135, 779-782.
- Southwick, F.S., Dabiri, A.G., Paschetto, M., Zigmond, S.H. (1989). Polymorphonuclear leukocytes adherence induces actin polymerisation by a transduction pathway which differs from that used by chemoattractants.
J. Cell Biol. 109, 1561-1569.
- Stein, R.L., Trainor, D.A., Wildonger, R.A. (1985). Neutrophil elastase. In: *Annula Reports in Medical Chemistry*, chapter 24.; pp. 237-246. Academic Press, Inc/New York.
- Takenawa, T., Ishitoya, J., Nagai, Y. (1986). Inhibitory effect of prostaglandin E₂, dibutyryl cAMP on archidonic acid release and inositol phospholipid metabolism in guina pig neutrophils.
J. Biol. Chem. 261, 1092-1098.
- Tao, W., Molski, T., Sha-afi, R.I. (1989). Arachidonic acid release in rabbit neutrophils.
Biochem. J. 257, 633-637.

6. Literaturverzeichnis

- Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P. (1991). Leukozyten. In: Anatomie/Physiologie/Pathophysiologie des Menschen (Thews, G., ed.); S. 103-110. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH/Stuttgart.
- Till, G.O., Hatherill, J.R., Tourtellotte, W.W., Lutz, M.J., Ward, P.A. (1985). Lipide peroxidation and acute lung injury after thermal trauma to skin. *Am. J. Path.* 119, 376-384.
- Tijssen, P. (1985). Preparation of enzyme-antibody or other enzym-molecules conjugates. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol.15 (Burdon, R.H., van Knippenberg, P.H., eds.); pp. 221-277. Elsevier/North Holland Biomedical Press/Amsterdam.
- Valerius, N.H., Stendal, O., Hartwig, J.H. (1981). Distribution of actin-binding Protein and Myosin in polymorphonuclear leukocytes during locomotion and phagocytosis. *Cell* 24, 195-202.
- Watorek, W. (1990). Heterogeneity of human neutrophil elastase and cathepsin G. In: Proteinases and their Inhibitors: Regulation of Cellular Metabolism. 19 th winter school of the institute of biology/Jagellonian University (Dubina, A., ed.); pp.15-19.
- Watts, R.G., Crispens, M.A., Howard, T.H. (1991). A quantitative study on the role of F-actin in producing neutrophil shape. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 19, 159-168.
- Weber, K., Osborn, M. (1985). Die Moleküle des Zytoskeletts. *Spektrum der Wissenschaft*, S. 102-114.
- Weiss, S.J., Peppin, G., Ortiz, H., Ragsdale, C., Test, S.I. (1985). Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science* 227, 747-749.
- White, J.R., Naccache, P.H., Sha'afi, R.J. (1983). Stimulation by chemotactic factor of actin association with the cytoskeleton in rabbit neutrophils. *J. Biol. Chem.* 258, 1041-14047.
- Williams, B.L., Wilson, K. (1984). Zentrifugation. In: Methoden der Biochemie (Fashold, H., Hrsg.); S. 48-82. Georg Thieme Verlag/Stuttgart.
- Wilson, L., Bamburg, J.R., Mizel, S.B., Grisham, L.M., Creswell, K.M. (1974). Interaction of drugs with microtubule proteins. *Fed. Proceed.* 33, 158-166.
- Wright, D. G. (1988). Human Neutrophil Degranulation. In: Methods in Enzymology, Vol. 162: Immunochemical Techniques; Part L. Chemotaxis and Inflammation. (Di Sabato, G., ed.); pp. 538-551. Academic Press/New York.
- Yassin, R., Shefcyk, J., White, J.R., Tao, W., Volpi, M., Molski, T.F.P., Naccache, P.H., Feinstein, M.B., Sha'afi, R.I. (1985). Effects of chemotactic factors and other agents on the amounts of actin and a 65.00-mol-wt protein associated with the cytoskeleton of rabbit and human neutrophils. *J. Cell Biol.* 101, 182-188.
- Zigmond, S.H. (1977). Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J. Cell Biol.* 75, 606-616.
- Zingsheim, H.P., Plattner, H. (1976). Electron microscopic biology. In: Methods in Membrane Biology, Vol. 7 (E.D. Korn, ed.); pp. 1-146. Plenum Press/New York.
- Zurier, R.B., Hoffstein, S., Weissmann, G. (1973). Cytochalasin B: effect on lysosomal enzyme release from human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 844-848.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 1989 bis November 1991 am Lehrstuhl für Biochemie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. B.M. Jockusch (Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie/Abt. Zellbiologie, Fakultät für Biologie) und Herrn Prof. Dr. H. Tschesche (Lehrstuhl für Biochemie, Fakultät für Chemie).

Frau Prof. Dr. B.M. Jockusch danke ich für die Bereitstellung des Themas, ihre Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. H. Tschesche danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine Hilfe beim Fortgang der Arbeit.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die kollegiale Arbeitsatmosphäre und Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. B. Bakowski für die Einführung in die Rasterelektronen-Mikroskopie, sowie Frau V. Süwer für die Aufarbeitung der Antikörper.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 223) danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit und Herrn Dr. C. Schudt (Byk Gulden Pharmaceuticals) für die Bereitstellung des Phosphodiesterase-Inhibitors.

Weiterhin gilt mein Dank den Blockpraktikanten Iris, Dirk, Christian, Oliver und Susanne für ihre Unterstützung und die aufmunternde Atmosphäre im Labor.

Besonders zu danken ist allen Blutspendern, ohne die diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.

Hiermit versichere ich, daß diese Arbeit selbstständig verfaßt wurde. Fremde Hilfe, soweit sie

in Anspruch genommen wurde, ist vermerkt.

Bielefeld im November 1991

Almut Schettler

