

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
- Direktor: Univ. - Prof. Dr. med. W. Stoll -

Neutrophilen-chemotaktische Proteine in Nasenpolypen

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von Timur Sellmann
aus Essen

2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. C. Rudack
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. J. Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. Stoll -
Referent: Priv.-Dr. C. Rudack
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Meyer

Zusammenfassung

Neutrophilen-chemotaktische Proteine in Nasenpolypen
Timur Sellmann

Zusammenfassung:

Die Histopathologie der Polyposis nasi ist charakterisiert durch entzündungstypische Veränderungen des nasalen Gewebes, zum Beispiel dem Auftreten eines massiven Stromaödems, einer gestörten Epithelproliferation und -regeneration, sowie der konstanten Akkumulation inflammatorischer Zellen wie eosinophiler und neutrophiler Granulozyten. Ursachen dieses spezifischen histopathologischen Bildes sind zur Zeit noch nicht bekannt. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die Präsenz lokal durch ortsständige Zellen produzierter Chemokine, die eine selektive Migration von Granulozyten induzieren. Diese Arbeit hatte das Ziel, Chemokine aus Nasenpolypengewebe zu extrahieren, sie bezüglich ihrer biologischen Aktivität auf neutrophile Granulozyten zu überprüfen und sie zu identifizieren. Nasenpolypen- und Muschelgewebe wurde nach einem speziell dafür entwickelten dreistufigen Verfahren mittels Heparin-Affinitätssäule, präparativer Umkehrphasen-HPLC und Kationenaustausch-HPLC aufgereinigt und nach jeder chromatographischen Auftrennung mittels eines Boydenkammer-Assays auf das Vorliegen neutrophilen-chemotaktischer Aktivität untersucht. Die in den Fraktionen enthaltenen chemotaktisch aktiven Peptide wurden schließlich mittels Sandwich und Festphasen ELISA als NAP-2 identifiziert. NAP-2 ist ein thrombozytär synthetisiertes, neutrophilen-stimulierendes und chemotaktisch wirksames Chemokin der C-X-C Familie, das durch proteolytische Spaltung von Vorläuferproteinen entsteht. Mit dieser Arbeit wurde NAP-2 als für die Polyposis nasi wesentlicher, neutrophilen-chemotaktischer Faktor bestimmt.

1.	Einleitung	1 – 20
1.1.	Chemokine	1 – 4
1.2.	Chemotaxis neutrophiler Granulozyten	4 – 7
1.3.	Polyposis nasi	8 – 13
1.4.	Histopathologische Kennzeichen der Polyposis nasi	14 – 19
1.5.	Fragestellung und Ziele der Arbeit	20
2.	Methodik	21 – 30
2.1.	Isolierung neutrophilen-chemotaktischer Mediatoren	21 – 22
2.1.1.	<i>Patienten</i>	21
2.1.2.	<i>Extraktion und Aufreinigung neutrophilen-chemotaktischer Faktoren aus den Gewebeproben</i>	21
2.1.3.	<i>Isolierungsmethoden</i>	22
2.2.	Affinitätstrennung heparinbindender Proteine und HPLC	23 – 25
2.2.1.	<i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von Peptiden</i>	23
2.2.2.	<i>Affinitätstrennung heparinbindender Proteine (Heparin-Säule)</i>	23 – 24
2.2.3.	<i>Umkehrphasen HPLC (RP-8 Säule)</i>	24
2.2.4.	<i>Kationenaustausch-Chromatographie (Mono-S Säule)</i>	25
2.3.	Durchführung eines Boydenkammer-Assays zur Bestimmung biologischer Aktivität von Chemokinen	25 – 28
2.3.1.	<i>Isolierung neutrophiler Granulozyten aus peripher-venösem Blut</i>	26 – 27
2.3.2.	<i>Boydenkammer-Assay</i>	27 – 28
2.4.	Charakterisierung und Bestimmung der Chemokine	29 – 30
2.4.1.	<i>Festphasen-ELISA</i>	29
2.4.2.	<i>Quantitativer GRO-α und IL-8 Sandwich-ELISA</i>	29 – 30
2.5.	Chemotaxis-Inhibitionstest	30

3.	Ergebnisse	31 – 49
3.1.	Untersuchung neutrophilen-chemotaktischer Polypeptide aus Nasenpolypen und Nasenmuschelschleimhaut	31 – 35
3.1.1.	<i>Isolierung der Proteinfractionen, Heparinaffinitätschromatographie</i>	31
3.1.2.	<i>Charakterisierung neutrophilen-chemotaktischer Polypeptide durch eine Umkehrphasen-Ausschlusschromatographie (RP-8-HPLC)</i>	32 – 34
3.1.3.	<i>Aufreinigung von biologisch aktiven neutrophilen-chemotaktischen Proteinen durch Kationenaustausch-Chromatographie (Mono-S-HPLC)</i>	35
3.2.	Ergebnisse der Chromatographie von Nasenmuschelextrakten	35 – 39
3.3.	Ergebnisse der Chromatographie von Nasenpolypenextrakten	40 – 47
3.4.	Identifizierung des NAP-2 und seiner biologischen Aktivität in den HPLC-Fractionen	47 – 48
3.4.1.	<i>Festphasen-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)</i>	47 – 48
3.4.2.	<i>Sandwich-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)</i>	48
3.5.	Chemotaxis-Inhibitionstest	48 – 49
4.	Diskussion	50 – 58
4.1.	Neutrophilen-chemotaktische Proteine aus Nasenpolypenextrakten	52 – 55
4.2.	Die pathogenetische Bedeutung von NAP-2 für die Polyposis nasi	55 – 58
5.	Literaturverzeichnis	59 – 70

Inhaltsverzeichnis

6.	Danksagung	71
7.	Lebenslauf	72 – 74

1. Einleitung

1.1. Chemokine

Verschiedene Erkrankungsbilder sind durch ganz bestimmte Verteilungs- respektive Akkumulationsmuster von Leukozyten und deren Subpopulationen geprägt, zum Beispiel das Asthma bronchiale³¹, die zystische Fibrose und auch die Polyposis nasi. Über Mechanismen, die die Rekrutierung von Zellen bei der Polyposis regulieren, wurden im wesentlichen bisher nur für eosinophile, nicht aber für neutrophile Granulozyten Untersuchungen durchgeführt. In diesen Studien konnte unter anderem nachgewiesen werden, daß Fibroblasten, Epithelzellen und T-Lymphozyten durch Sekretion von Proteinen wie RANTES (released upon activation T-cell secreted; Freisetzung aus T-Zellen nach Aktivierung) und Eotaxin den Einstrom eosinophiler Granulozyten in nasales Gewebe unterstützen^{4 13 15 70 89 96}. Ferner kommt es durch Aktivierung und Sekretion von Interleukin (IL)-3, IL-5, IFN- γ (Interferon-Gamma) und GM-CSF (Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor) zu einer Umstellung des Zellstoffwechsels der Eosinophilen, der unter anderem die Verzögerung der Apoptose bewirkt^{8 25 95 103 108}. Dadurch wird die Lebensdauer eosinophiler Granulozyten verlängert. Ergebnisse anderer Studien kommen zu dem Ergebnis, polypoides nasales Gewebe (sowohl Stroma als auch Epithel) aufgrund der darin enthaltenen EG2-positiven eosinophilen Granulozyten generell als aktiviert zu bezeichnen^{8 99 115}. EG2 ist ein monoklonaler Antikörper, der mit der sezernierten Form des ECP (Eosinophilic Cationic Protein, ein Produkt aktivierter Eosinophiler) reagiert.

Zur Zeit existieren nur wenige vergleichbare Studien bezüglich des Verhaltens neutrophiler Granulozyten in Nasenpolypen. Vancheri et al¹²⁷ konnten nachweisen, daß nasale Fibroblasten die Differenzierung myelopoetischer Stammzellen in neutrophile Granulozyten in vitro durch die Produktion und Freisetzung von GM-CSF induzierten und bewiesen damit zumindest experimentell, daß ortsständiges Gewebe einen lokalen Entzündungsprozess

beeinflussen kann. Ferner wurden bisher Bestimmungen neutrophilen-assoziiertes Zytokine wie IL-8 oder GRO- α durchgeführt^{5 100}. Somit findet sich hier ein zusätzliches Forschungsfeld, das die bisher nicht eindeutig geklärten pathogenetischen Aspekte der Polyposis nasi um die Betrachtung neutrophiler Granulozyten und ihrer assoziierten Chemokine erweitert.

Chemokin (chemokine) ist ein aus dem Anglo-Amerikanischen übernommenes Kunstwort und bedeutet eigentlich chemoattractant cytokine. Chemokine, oder auch Zellmigrationsstoffe, sind Bestandteil der Familie der Zytokine, die auch Zellbotenstoffe genannt werden. Chemokine bilden eine Gruppe von Polypeptiden mit einem Gewicht zwischen 6 und 15 kDa und einer Länge zwischen 70 und 130 Aminosäuren. Ihre Funktion ist für die gerichtete Migration von Zellen entscheidend, sie haben sowohl zellaktivierende als auch zellselektierende Wirkungen⁹⁶. Mit bisher über fünfzig differenzierten Vertretern gehören sie zu der größten Gruppe der Zytokine¹¹⁰. Zytokine, auch als Interleukine, Monokine oder Lymphokine bezeichnet, sind Mediatoren, die praktisch von allen Zellpopulationen sezerniert werden können und die an der Immunmodulation und der Hämatopoese beteiligt sind. Ihre biologischen Wirkungen sind pleiotrop, redundant oder synergistisch. Pleiotropie ist die Entfaltung mehrerer biologischer Effekte an verschiedenen Zielzellen. Redundanz bedeutet den ähnlichen oder gleichen Effekt unterschiedlicher Zytokine an einer Zielzelle, und Synergismus ist das unterschiedliche Ergebnis des zeitgleichen oder sequenziellen Einwirkens mehrerer Zytokine auf eine Zielzelle im Vergleich zur Summe der Einzeleffekte. Im weiteren soll kurz auf den Unterschied zwischen Zytokinen (Chemokinen) und Hormonen eingegangen werden. Im Gegensatz zu Zytokinen werden Hormone ausschließlich von spezialisierten Zellen synthetisiert, Hormone haben einen einmaligen und zugleich limitierten biologischen Effekt, während Zytokine, wie erwähnt, redundant und pleiotrop sind. Hormone wirken über weite Distanzen systemisch auf eine beschränkte Zahl von Zielzellen, während Zytokine lokalisiert eine Vielzahl von Zielzellen ansprechen. Ähnlich den Chemokinen können auch die Zytokine eine die Synthese regulierende Wirkung haben.

Durch eine Struktur- bzw. vorgegebene Proteinsequenz lassen sich bisher vier Gruppen von Chemokinen unterscheiden¹²³.

1. C-X-C Chemokine
2. C-C Chemokine
3. C Chemokine
4. C-X-X-X-C Chemokine

C ist das Symbol der Aminosäure Cystein, die Bestandteil (Baustein) eines jeweils gruppenspezifischen, aus bis zu vier Cysteinen aufgebauten Motivs (Aminosäuresequenz) ist. α - und β - Chemokine enthalten vier Cysteine in einer bestimmten Anordnung; sie bilden die Familie der vier Cystein Chemokine, der bisher größten Unterfamilie der Chemokine. In der Struktur der Chemokine der C-X-C Gruppe, oder auch α - Chemokine, werden die ersten beiden der vier Cysteine durch eine andere Aminosäure getrennt. Die C-C, oder auch β - Chemokin Gruppe, erhielt ihren Namen aufgrund der in ihrer Anfangssequenz direkt nebeneinander liegenden Cysteine. Der einzige bisher identifizierte Vertreter der dritten Familie ist das Lymphotactin, ein Chemokin mit insgesamt nur zwei Cysteinen⁵¹. Fractalkin, ein membrangebundenes Glykoprotein, stellt einen Vertreter der vierten Familie dar; es hat in seiner Sequenz drei Aminosäuren zwischen zwei flankierenden Cysteinen; schematisch C-X-X-X-C^{11 43 64}.

Diese Strukturunterschiede spiegeln sich auch in unterschiedlichem chemotaktischen Verhalten wider. Während die C-X-C Chemokine, die nochmals in ELR⁺ und ELR⁻ Untergruppen unterteilt werden, vornehmlich auf neutrophile Granulozyten (ELR⁺) bzw. T-Zellen (ELR⁻) wirken, haben die Chemokine der C-C Gruppe ein weiteres chemotaktisches Wirkungsspektrum, das unter anderem Makrophagen, Monozyten, teilweise aber auch Lymphozyten, basophile und eosinophile Granulozyten umfaßt^{26 34 50 64}. Ferner wurde nachgewiesen, daß Chemokine neben ihrer chemotaktischen Funktion auch noch einen stimulatorischen Effekt auf verschiedene Zellpopulationen wie Endothelzellen, Fibroblasten und Chondrozyten haben, indem sie diese

aktivieren und im Anschluß daran eine Mediatorfreisetzung dieser Zellen initiieren^{2 11 16 18 84}. Als Ursprung der Chemokine werden Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten, (T- und B-) Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen, Monozyten und Neutrophile genannt^{62 74 75 78 102}.

Die Gruppe der C-X-C Chemokine umfaßt ENA-78, GCP-2, IL-8, MGSA/ GRO- α , GRO- β , GRO- γ (MGSA = Melanocyte Growth Activating Protein, GRO = Growth Related Oncogene), PF-4 (Platelet Factor), PBP (Platelet Basic Protein) und dessen Folgeprodukte^{11 60 79 81 123 128 129}.

C-X-C Chemokine	
SDF-1	(Stroma cell Derived Factor 1)
IL-8	(Interleukin 8; früher NAP-1)
GRO- α , - β , - γ	(Growth Related Oncogene)
NAP-2	(Neutrophil Activating Peptide 2)
ENA-78	(Epithelial cell-derived Neutrophile-Activating Protein; 78 Aminosäuren)
GCP-2	(Granulocyte Chemotactic Protein 2)
PF-4	(Platelet factor 4)
IP 10	(Interferon Gamma induziertes Chemokin)
MIG	(Monokine Induced by IFN-Gamma)
CK α 1 und 2	(Bisher nicht näher benannte Chemokine der CXC Familie)

Abb. 1.1.1. Die Familie der C-X-C Chemokine

1.2. Chemotaxis neutrophiler Granulozyten

Aus chemotaktischer Sicht gehören Monozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten zu den aktivsten Zellen des menschlichen Körpers. Aktiv deshalb, da sie auf eine Vielzahl der bekannten Chemokine reagieren können und da sie zu den mobilsten Zellen zählen, die es gibt. So bewegen sich Leukozyten mit

einer Geschwindigkeit von 30 bis 40 $\mu\text{m}/\text{min}$, Fibroblasten hingegen nur mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ ⁶⁷.

An dieser Stelle sei auf einen grundlegenden Unterschied im migratorischen Verhalten von Zellen hingewiesen. Zellen können auf drei verschiedene Arten migrieren. Als Chemotaxis wird die durch Chemotaxine stimulierte, gerichtete Wanderung entlang eines Konzentrationsgradienten einer als Lockstoff wirkenden, chemischen Substanz bezeichnet. Ferner gibt es die Chemokinese, bei der die Zellen zwar auch durch Chemokine stimuliert werden, die Wanderung jedoch nicht entlang eines Konzentrationsgefälles stattfindet. Schließlich muß noch die komplett ungerichtete, zufällig stattfindende Bewegung migratorischer Zellen hiervon abgegrenzt werden.

Zu den charakteristischen, speziellen Leistungen der Chemokine und anderer Entzündungsmediatoren gehört die Induktion von Zelladhäsionsmolekülen, die allerdings auch konstitutiv exprimiert werden können. Zelladhäsionsmoleküle dienen in erster Linie der Anhaftung verschiedener Zellen aneinander, ferner ermöglichen sie dadurch weitere Funktionen wie die Zellkooperation, die Antigenerkennung und die Diapedese verschiedener Zellpopulationen und deren weitere Orientierung im Gewebe. Neben diesen eher für Leukozyten spezifischen Aufgaben verhelfen sie speziell den Lymphozyten zu einer als *homing* bezeichneten, organgerichteten Zellwanderung⁴⁶.

Leukozytäre Zellen zirkulieren ständig im Körper und dienen der eher unspezifischen Immunüberwachung; sie initiieren und medieren die Entzündungsreaktion auf körperfremde Antigene. Die verschiedenen Subpopulationen zeichnen sich durch individuell unterschiedliche Migrationsmuster aus. So werden neutrophile Granulozyten schnell und in großen Mengen an Inflammationsherden zusammengezogen, die sie aus dem intravasalen Raum heraus erreichen können.

Die transendotheliale Migration, ein nur in bestimmten Geweben zu beobachtendes, sehr komplexes Geschehen, läuft unter Beteiligung

verschiedener Zelladhäsionsmoleküle, Zytokine und Chemokine ab^{1 16 63 84} und geht mit einer mediatorvermittelten, entzündlichen Vasodilatation einher. Dieser Vorgang wird innerhalb des lymphatischen Gewebes in hohen Venolenendothelien (HEV, high endothelial venules) und außerhalb des lymphatischen Gewebes in postkapillären Venolen beobachtet. Hierbei handelt es sich um spezialisierte Venolen mit einer aufgefalteten Oberfläche und einem plumpen, fast kubischen Endothel. Die transendotheliale Migration umfaßt nach heutigem Wissen vier bekannte, aufeinanderfolgende Teilaktionen, deren Abfolge kaskadenförmig verläuft.

Der erste für die Einleitung der transendothelialen Migration notwendige Schritt, die Selektin-Induktion auf den Endothelzellen, geschieht innerhalb weniger Minuten durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 (IL-1) und TNF- α ⁸⁹. Innerhalb von zehn Minuten wird das erste Selektin, P-Selektin, nachweisbar auf der Zelloberfläche von Thrombozyten und Endothelien exprimiert, jedoch nach kurzer Zeit durch E-Selektin, ein wesentlich stärker bindendes Selektin auf der Oberfläche von Endothelien, ersetzt^{36 41}. Die Selektine überragen aufgrund ihrer Länge die Glykokalix der Endothelzellen. So können die neutrophilen Granulozyten aus dem Blutstrom gebunden werden, um dann zunächst locker an den Endothelzellen entlang zu rollen⁴².

Der nächste Schritt, die feste (firme) Adhäsion wird durch Integrine, eine Gruppe leukozytärer, heterodimerer Membran-Glykoproteine, vermittelt. Sie bestehen aus einer α - und einer β - Untereinheit; ihre Einteilung basiert auf unterschiedlichen β - Untereinheiten. Die wichtigsten leukozytären Integrine sind β 1-Integrin, auch VLA (Very Late Antigen) Protein genannt, und β 2-Integrin, auch als leukozytäres Zelladhäsionsmolekül bekannt.

VLA-4, ein β 1-Integrin, mediiert die lymphozytäre und monozytäre (Monozyten, Eosinophile und Basophile) Bindung an VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule)⁴⁶, jedoch nicht die von neutrophilen Granulozyten. Im Gegensatz

dazu binden β 2-Integrine bevorzugt an endotheliales ICAM-1 (Interstitial Cell Adhesion Molecule) und -2.

Neutrophile Granulozyten werden durch Chemokine aus der Endothelzell-Glykokalix, zum Beispiel IL-8 oder GRO- α (Growth Related Oncogene; aus der C-X-C Chemokin Familie mit IL-8 ähnlichen Wirkungen) stimuliert^{34 109}. Durch die Ausprägung von ICAM-1, einem Protein aus der Superfamilie der Immunglobuline, werden die neutrophilen Granulozyten immobilisiert; ein weiteres Entlangrollen an der Gefäßwand wird somit unterbunden¹²⁰. Im Anschluss verändern sie ihre Form und lagern sich flach an die Gefäßwand an. Das Interaktionsmuster leukozytärer und endothelialer Membranproteine ist jeweils spezifisch für einzelne Subpopulationen. So interagieren neutrophile Granulozyten vorrangig mit β 2-Integrinen und ICAM-1, um eine Adhäsion auszulösen^{1 16}. Im Gegensatz hierzu werden eosinophile Granulozyten durch die Bindung an VLA-4, ein β 1-Integrin, und VCAM-1 an der Gefäßwand fixiert. VCAM-1 ist ebenfalls ein Protein aus der Superfamilie der Immunglobuline. Sowohl ICAM-1 als auch VCAM-1 werden durch proinflammatorische Zytokine auf entzündetem Endothel exprimiert¹⁷.

Der letzte Schritt der Diapedese, die eigentliche transendotheliale Migration, wird nach Stimulation durch proinflammatorische Zytokine ebenfalls durch Integrine und die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie vermittelt^{16 63}.

Der Ablauf der transendothelialen Migrationskaskade bietet ein Beispiel für einen selektiven, an mehreren Punkten exakt steuerbaren, schnell zu beeinflussenden Prozess leukozytärer Adhäsion, bei dem das Fehlen oder die gestörte Ausführung einzelner Bestandteile, zum Beispiel im Bereich der Adhäsion, bereits Krankheitswert haben kann.

Nach der transendothelialen Migration können die neutrophilen Granulozyten am eigentlichen Einsatzort ihre zellspezifischen Aufgaben ausführen, zu denen unter anderem die Freisetzung toxischer Produkte aus cytosolischen Granula und die Induktion des respiratorischen Burst zählen.

1.3. Polyposis nasi

Zu den häufigsten Leiden des Menschen gehören neben den bösartigen Tumoren, den kardiovaskulären und den muskulo-skelettal bedingten Krankheiten auch die Erkrankungen des oberen und unteren Respirationstraktes¹¹². Einen besonderen Stellenwert nehmen die Entzündungen der oberen Atemwege (speziell Nasenschleimhaut und Nasennebenhöhlen) ein, bei denen zwischen akuten und chronischen Erkrankungen differenziert werden kann. Kennzeichen sowohl der akuten als auch der chronischen Entzündung einer oder mehrerer Nasennebenhöhlen sind eine gestörte Ventilation und ein behinderter Schleimabfluß. Die akute Sinusitis wird als Infektionsfolge viraler oder bakterieller Genese, die chronische Sinusitis als eine durch Gewebeproliferation im ostiomeatalen Komplex hervorgerufene Obstruktion definiert^{12 53 70 82}. Der ostiomeatale Komplex stellt die anatomische Schlüsselstelle der Sinusventilation und Drainage dar.



Abb. 1.3.1. CT- Aufnahmen zweier Patienten mit Polyposis nasi

Als Polyposis nasi werden blaß-grau gestielte Nasenpolypen bezeichnet, die klinisch-diagnostisch entweder im Bereich des mittleren Nasenganges, der unteren Nasenmuschel oder im Siebbeinbereich sichtbar werden⁹⁸. Tos⁷¹ und Stammberger¹¹¹ lokalisierten übereinstimmend den Ursprung dieser Gewebeausstülpungen in der Schleimhaut des mittleren Nasenganges. Offensichtlich handelt es sich hierbei um die einzige Proliferationsstelle; die Schleimhaut der unteren Nasenmuschel trägt, soweit bekannt, nicht zur Polypenbildung bei^{72 118}.

Die Polyposis nasi ist seit über 3000 Jahren bekannt und gehört damit zu den ältesten beschriebenen Erkrankungen des Menschen. Es handelt sich hierbei um eine Erkrankungsform der oberen Atemwege mit bislang ungeklärter bzw. kontrovers diskutierter Ätiologie. Die Prävalenz wird mit ca. 4% in einer Population angegeben^{45 69 70}, jedoch muss davon ausgegangen werden, daß die Prävalenz in speziellen Gruppen wesentlich höher ist^{45 106 107}.

Darüber hinaus existieren deutliche regionale Unterschiede in der Inzidenz einzelner Polypenarten. So wurden zum Beispiel in einer 1984 durchgeführten Studie die Häufigkeit eosinophiler Nasenpolypen in verschiedenen Regionen miteinander verglichen: 85 % aller Polypen in Wien, 83,6 % aller Polypen in Finnland und 83,3 % aller Polypen in Deutschland waren eosinophil, aber nur 26 % aller Polypen in Chiba, Japan¹⁰⁵. Seitdem steigt die Häufigkeit dieser Polypenart in Japan kontinuierlich an. Alle bis zu diesem Zeitpunkt gewonnenen Ergebnisse deuten auf eine nicht spezifisch zuzuordnende Entzündung hin, da in Gewebeproben aus Nasenpolypen sowohl eosinophile (85-80%) als auch neutrophile (10-15%) Granulozyten nachgewiesen werden konnten. Aufgrund neuerer physiologischer und pathophysiologischer Aspekte konnten weitere Ansätze zum Verständnis entzündlicher Nasennebenhöhlenerkrankungen entwickelt werden. Diese wurden vor allem durch aktuelle Erkenntnisse auf den Gebieten der Morphologie, Physiologie (speziell Strömungsphysiologie und mukoziliäre Clearance) und Mikrobiologie ermöglicht. Aus diesen Erkenntnissen ergaben sich auch neue Behandlungsschemata der Polyposis nasi. Die früher

praktizierte radikal operative Nasennebenhöhlenchirurgie ist heute einer mehr Schleimhaut erhaltenden Operationstechnik gewichen, die die funktionellen Aspekte sowohl der Nasen- und Nasennebenhöhlenanatomie als auch ihrer Physiologie berücksichtigt. Die endoskopischen Operationen (FES = functional endoscopic surgery) der ethmoidalen Engstellen und Kompartimente verfolgen das Ziel der Wiederherstellung der Drainage- und Ventilationsfunktion der erkrankten größeren Sinus (diese benötigen per se selten weitere Manipulationen)¹¹¹. Ungeachtet dieser Fortschritte in der Behandlung der Polyposis nasi werden auch heute noch schwere, therapierefraktäre Fälle beobachtet, in denen es trotz moderner operativer und konservativer Maßnahmen zu Rezidiven kommt, die nicht auf die üblichen Behandlungsstrategien ansprechen⁴⁵.

Neben dem Nachweis von Chemokinen, im speziellen NAP-2, und dem Beweis ihrer Bedeutung für die chemotaktische Aktivität neutrophiler Granulozyten in Nasenpolypen, soll es das Ziel dieser Arbeit sein, die so gewonnenen Ergebnisse zur Klärung der unzulänglichen ätiologischen und pathogenetischen Kenntnisse über die Polyposis nasi einzusetzen. Ferner sollen diese Erkenntnissen dazu beitragen, die angewendeten Therapieoptionen kritisch zu betrachten.

Die unklare Ätiologie und Pathogenese der Polyposis nasi spiegelt sich auch in der teils kontroversen Diskussion verschiedener Autoren wider. Einige favorisieren die Acetylsalicylsäureintoleranz^{41 45 72}, andere bevorzugen Auslöser immunologischer Natur, zum Beispiel Allergien gegen inhalative Allergene oder Bestandteile verschiedener Bakterienspezies, als Erklärungsversuch dieser häufig vorkommenden Erkrankung²⁷.

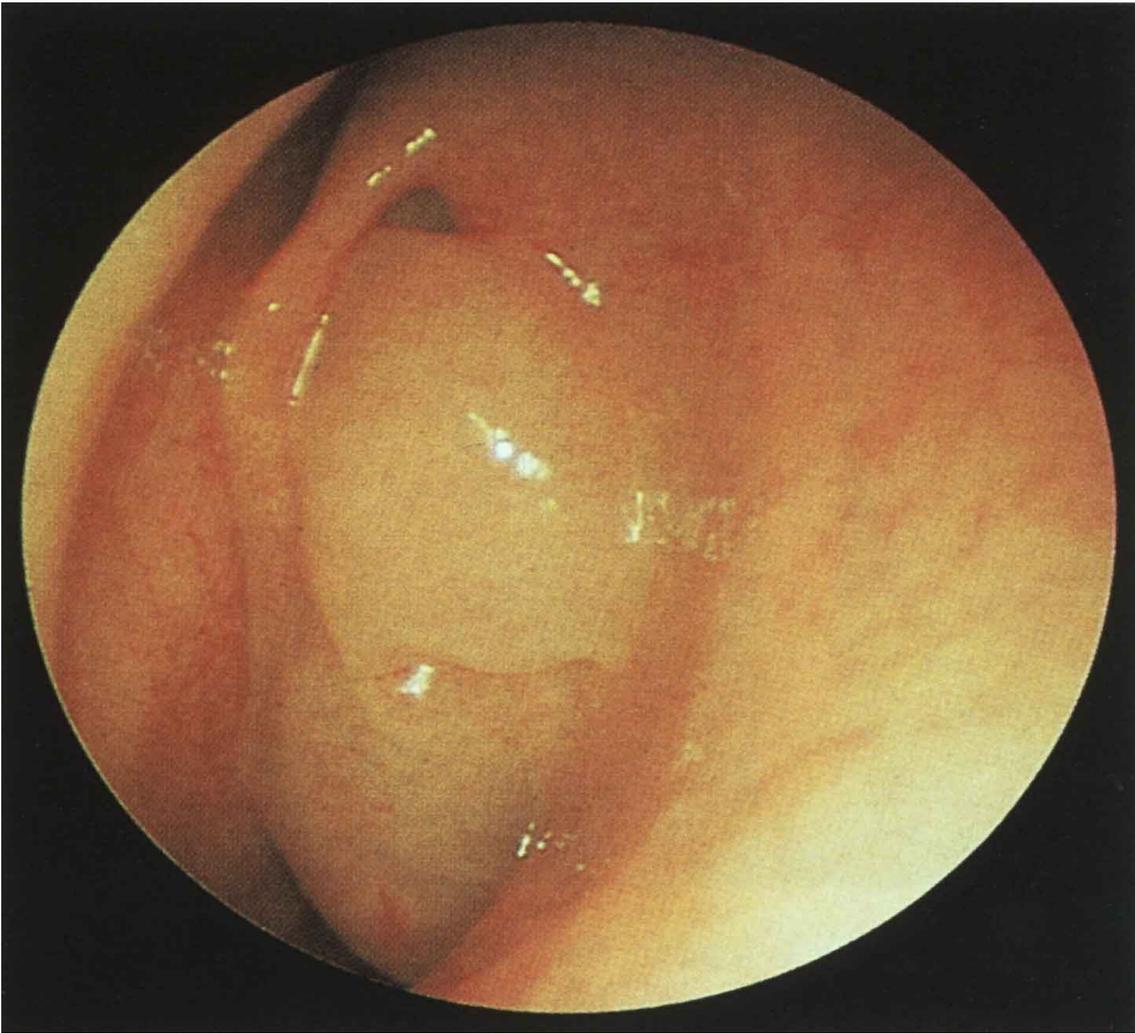


Abb. 1.3.2. Endoskopische Aufnahme einer Polyposis nasi im mittleren Nasengang

Für eine immunologische Genese spricht zum Beispiel die Erkenntnis, daß die Polypenbildung bei der allergischen Nasennebenhöhlenmykose, einer lokalen Immunreaktion, durch Immunglobuline, spezifische IgE- und IgG-Antikörper, hervorgerufen werden kann^{50 104}. Ein weiterer Hinweis auf einen möglichen immunologischen Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung und Polypenbildung lässt sich im Tiermodell finden. Hier gelang es experimentell, in bakteriell infizierten Kieferhöhlen polypoides Gewebe zu erzeugen⁸⁸. Trotzdem bleibt es weiterhin fraglich, ob den spezifisch gegen Bakterien oder deren Bestandteile gerichteten IgE Antikörpern hierbei eine Schlüsselrolle zukommt,

wie es typisch für eine Erkrankung allergischer Genese wäre, da sich diese ubiquitär in einer Population, das heißt auch bei Patienten ohne Atemwegserkrankungen, nachweisen lassen²⁷. Die Polyposis nasi tritt jedoch bei Patienten, die unter anderen allergischen Erkrankungen wie allergischer Rhinitis oder atopischer Dermatitis leiden, selten in Kombination auf^{66 107}. Die Tatsache, daß diese Erkrankungen aber offenbar ein hyperreagibles Immunsystem voraussetzen, spricht daher gegen eine allergische Genese der Polyposis nasi^{87 106 118}. Eine Erkrankung auf dem Boden einer viralen Genese ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht nachzuweisen; die Suche nach auslösenden Viren respektive ihrer DNA durch Hybridisierungen ist bis jetzt für alle untersuchten Virusspezies negativ⁶⁹. Auch Theorien bezüglich der Aerodynamik, der Hämodynamik und der Polypeninduktion durch Epithelschädigungen mit konsekutiver Granulationsgewebebildung sind immer noch Gegenstand der Diskussion um Ätiologie und Pathogenese¹²¹ der Polyposis nasi. Selten jedoch tritt sie solitär auf; klinisch betrachtet gibt es Assoziationen mit anderen, teilweise systemischen Erkrankungen, die gehäuft in Kombination mit der Polyposis nasi auftreten⁹⁴. Zum Beispiel ist sie in bis zu 40 % mit intrinsischem Asthma assoziiert, in bis zu 25 % aller Polyposis Erkrankungen findet sich eine Acetylsalicylsäureintoleranz, deren pathogenetische Ursache vermutlich durch einen erhöhten Leukotrien- und einen erniedrigten Prostaglandinspiegel als Konsequenz der Cyclooxygenaseinhibition gekennzeichnet ist. Bis zu 20 % an zystischer Fibrose Erkrankter leiden zusätzlich an einer Polyposis nasi, wobei ein Zusammenhang zwischen den hierbei häufig auftretenden *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen der Atemwege und einer Reaktion auf die toxischen Stoffwechselprodukte der Erreger angenommen wird (zum Beispiel die deutliche Reduktion der mukociliären Clearance durch Pyocyanin)⁵⁴. Weitere gesicherte Assoziationen der Polyposis bestehen zu dem Kartagener-Syndrom, einem Ziliendyskinesiesyndrom, das durch die Trias situs inversus, Bronchiektasien und aplastische Nasennebenhöhlen gekennzeichnet ist^{37 55 92}, dem Churg-Strauss-Syndrom, einer allergischen, granulomatösen Immunvaskulitis¹²² und dem Young-Syndrom (auch sinubronchiales Syndrom; Vorkommen in Kombination

mit obstruktiver Azoospermie⁵²). Das Auftreten einer massiven Polyposis nasi bei Aplasie des Sinus frontalis in der Kindheit wird als Woakes-Syndrom bezeichnet; bei Persistenz kommt es in seltenen Fällen zur Entwicklung viscerocranialer Verformungen, die zur Auftreibung des Nasengerüsts (bis zum Hypertelorismus), und zu Verdrängungserscheinungen gegen Orbita, Nervus Opticus und Neurocranium führen können⁶⁸. Das Auftreten von kortikosteroid-sensiblen Asthma bronchiale, Acetylsalicylsäureintoleranz und Polyposis nasi wird als Samter`s Trias bezeichnet¹³⁰. Die Erstbeschreibung erfolgte 1922 durch Widal, Abrami und Lermoyez; typischerweise tritt das Asthma zuerst auf, die Acetylsalicylsäureintoleranz folgt nach einem Jahr; Nasenpolypen entstehen innerhalb von 10 Jahren. Häufig finden sich nur zwei der Komponenten, zum Beispiel Asthma und Acetylsalicylsäureintoleranz.

Erkrankung	Häufigkeit (%)
Allergische Pilz Sinusitis	bis 85%
Churg- Strauss- Syndrom (granulomatöse Immunvaskulitis)	bis 50%
Acetylsalicylsäureintoleranz	bis 36%
Zystische Fibrose	bis 20%
Asthma bronchiale des Erwachsenen	insgesamt bis 7%
a) Intrinsisch	bis 13%
b) Atopisch (allergisch, extrinsisch)	bis 5%
Chronische Rhinosinusitis	insgesamt bis 2%
a) nicht allergisch	bis 5%
b) allergisch	bis 1,5%
Asthma bronchiale im Kindesalter	bis 0,1%
Kartagener Syndrom	unbekannt
Young Syndrom	unbekannt

Tabelle 1.3.1. Häufigkeit der Polyposis nasi bei systemischen Erkrankungen modifiziert nach Settipane

1.4. Histopathologische Kennzeichen der Polyposis nasi

Aufgrund der nach heutigem Wissensstand gesicherten Vielzahl möglicher Auslöser einer Polyposis nasi muß von einer multifaktoriellen Genese dieser Erkrankung ausgegangen werden; die Hypothese eines einzeln ausgelösten, solitären Krankheitsgeschehen wird zunehmend verlassen. Aus histopathologischer Sicht scheint es zunächst sinnvoll, nach Aufarbeitung des Operationsgutes eine grobe Einteilung in eosinophile (80 - 85%) und neutrophile (10 - 15%) Polypen vorzunehmen. Jedoch bedarf diese ursprüngliche Einteilung nach den heutigen Erkenntnissen einer genaueren Klassifikation. Zur Zeit unterscheidet man vier verschiedene Arten von Nasenpolypen, je nach vorherrschendem histopathologischen Befund. Es gibt allergische Polypen (diese sind mit 80 - 85 % aller untersuchten Polypen am häufigsten) und fibroinflammatorische Polypen, die durch eine chronische Entzündung mit Metaplasien gekennzeichnet sind. Ferner existiert ein nicht näher benannter dritter Typ, der allergischen Polypen ähnelt, darüber hinaus jedoch eine Hyperplasie seromuköser Drüsen zeigt. Schließlich gibt es Polypen mit Stromaatypien, die sehr selten auftreten und aufgrund der Atypien das Risiko beinhalten, mit malignen Neoplasien verwechselt zu werden⁵⁹.

Eine verminderte Vaskularisation mit Ödem oder Fibrose und eine verminderte Anzahl an submukösen Drüsen bei oftmals geschädigtem Epithel sind histologische Charakteristika eosinophiler Nasenpolypen. Ferner finden sich Lymphozyten, Plasmazellen, Mastzellen, neutrophile Granulozyten und, als Folge der chronischen Entzündungsreaktion, eine erhöhte Anzahl von Makrophagen und anderen antigenpräsentierenden Zellen wie zum Beispiel dendritische Zellen^{73 114 115 116}.

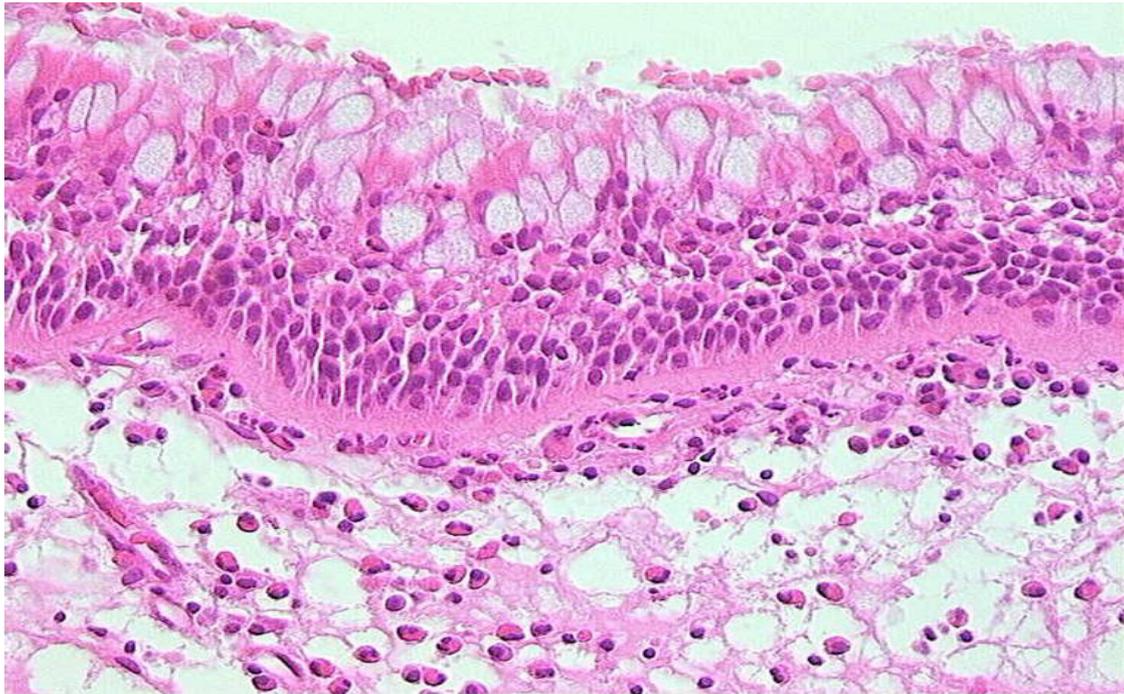


Abb. 1.4.1. HE gefärbtes Schnittbild eines Nasenpolypen

Immunhistologisch lässt sich durch Einsatz verschiedener Antikörper MHC II (Major Histocompatibility Complex) positives Epithel nachweisen, das zur Antigenpräsentation befähigt ist³³; vermutlich wird es in Folge der chronischen Entzündung aktiviert. Zusätzlich findet sich eine erhöhte Anzahl von Mastzellen im Polypengewebe, unabhängig vom Vorliegen einer allergischen Sensibilisierung¹⁰¹. Durch immunhistochemische Färbungen können generell zwei verschiedene Mastzellpopulationen differenziert werden, von denen die eine, formalinsensitive und CAE- (Chloralazetatesterase) negative Population im Epithel, die andere, formalinresistente und CAE-positive Population im Stroma sowohl des Polypen als auch des Polypenstieles anzutreffen ist^{65 85}. Die in der überwiegenden Anzahl aller Polypen vorherrschende starke Gewebeeosinophilie gilt seit Jahren als entscheidender Faktor bei der Entstehung der Polyposis nasi. Die mutmaßliche Pathogenese der eosinophilen Polyposis beinhaltet chronische Infektionen, T-Zell-Funktionsstörungen und Staphylokokken Enterotoxin Superantigen Reaktionen. Den eosinophilen spezifischen Granula, deren Anzahl mit dem Aktivierungsgrad der Zelle

korreliert und die unter anderem basische zytotoxische Proteine wie MBP (Major Basic Proteine) ECP (Eosinophil Cationic Protein), EPO (Eosinophilenperoxidase) und EDN (Eosinophil Derived Neurotoxin) enthalten, kommt hierbei die ausschlaggebende Rolle zu^{20 77}. Das potente Pyotoxin MBP wirkt helminthotoxisch und bakterizid, es kann Histamin aus basophilen Granulozyten freisetzen, neutrophile Granulozyten aktivieren und somit zu Gewebeschäden, zum Beispiel der Desquamation von Epithelien, beitragen^{47 48}. Harlin et al⁵⁸ konnten eine positive Korrelation zwischen Epithelschäden und MBP-Ablagerungen in der Schleimhaut des Sinus maxillaris nachweisen.

Protein	Wirkung
MBP (Major Basic Proteine)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Potentes Pyotoxin 2. Helminthotoxische und bakterizide Wirkung 3. Histaminfreisetzung aus Basophilen 4. Aktivierung neutrophiler Granulozyten
ECP (Eosinophil Cationic Proteine)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Stärkstes Toxin Eosinophiler 2. Schleimproduktion in Luftwegen 3. Exfoliation respiratorischer Zellen
EPO (Eosinophilenperoxidase)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Je nach Anwesenheit verschiedener Stoffe Wirkung als Kation oder als Peroxidase 2. Toxisch für Parasiten, Bakterien, Viren, Mikroplasmen und sogar Pilze
EDN (Eosinophil Derived Neurotoxin)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Relativ schwache toxische Wirkung 2. Homolog zur pankreatischen Ribonuklease 3. Bei Alkalisierung wird das gesamte toxische Potential aufgehoben

Tabelle 1.4.1. Proteine eosinophiler Granulozyten und ihre Wirkungen

Neutrophile Granulozyten werden in ungefähr 15-20 % der histologisch aufbereiteten Polypen gefunden¹⁰⁷. Im Falle einer Assoziation der Polyposis nasi mit anderen Erkrankungen wie dem Young-Syndrom, dem Kartagener-Syndrom und der zystischen Fibrose gelten die neutrophilen Granulozyten als die histologisch vorherrschende Zellart im Entzündungsgeschehen. Neben Neutrophilen werden in diesen Präparaten aber auch eosinophile Granulozyten im Verhältnis 3:1 (Neutrophile : Eosinophile) gefunden⁹³. Ergänzt wird dies durch die Beobachtung, daß in bis zu 70% ursprünglich als eosinophil bezeichneter histologisch aufgearbeiteter Polypen ein umgekehrtes Verhältnis von 1:3 (Neutrophile : Eosinophile) existiert.

Neutrophile Granulozyten weisen weitaus mehr Fähigkeiten auf als die bis vor einiger Zeit angenommene reine Phagozytoseaufgabe einer zur Diapedese befähigten, terminal differenzierten Zelle. So kann diese Zellart zum Beispiel Elastasen, Kollagenasen, Gelatinasen und über 20 weitere, verschiedene proteolytische und potentiell destruktiv wirkende Enzyme und Sauerstoffradikale bilden und speichern¹⁹. Es sind protektiv wirkende Plasmaenzyme wie die α 1-Antiproteinase (auch α 1-Antiprotease genannt; ein Proteaseinhibitor, der Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und auch Elastase hemmt) oder α 2-Makroglobulin (ein Plasmininhibitor) nötig, um eine durch Neutrophilenenzyme eingeleitete Gewebedestruktion zu unterbinden, deren Freisetzung, zum Beispiel durch Stimulation, sekundenschnell erfolgen kann und einen sogenannten „respiratory burst“ oder „oxidative burst“, die Freisetzung toxischer Radikale und aggressiver Enzyme, verursacht^{61 119}. Neben der Synthese dieser destruktiv wirkenden Enzyme haben neutrophile Granulozyten auch die Fähigkeit zur Produktion sogenannter Lipidmediatoren. Bei diesen Mediatoren handelt es sich um Derivate mehrfach ungesättigter Fettsäuren, insbesondere der Arachidonsäure; sie werden auch unter dem Begriff der Eicosanoide zusammengefaßt und spielen eine Rolle bei Überempfindlichkeits- und Entzündungsreaktionen. Zu ihnen zählen unter anderem Leukotrien B₄, PAF (Platelet Activating Factor) oder Thromboxan A₂. Zusätzlich werden auch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 β (IL-1 β) oder Interleukin 6 (IL-6)

und IL-8 synthetisiert. Die IL-8 Synthese ermöglicht den Neutrophilen wiederum die Stimulation eosinophiler Granulozyten, die zuvor durch Interleukin 5 (IL-5), zum Beispiel autokrin durch Eosinophile selbst, „geprimt“ wurden²⁸.

Die zuvor beschriebene Gewebedestruktion durch die aus neutrophilen Granulozyten freigesetzte Elastase konnte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie auch für die Polyposis nasi nachgewiesen werden, so daß ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten Neutrophiler während der Erkrankung zumindest als genauso wahrscheinlich angenommen werden darf wie die Rolle der eosinophilen Granulozyten für die Pathogenese der Polyposis nasi⁴⁴. Die Untersuchung über die Funktion von Zytokinen beim Mechanismus neutrophiler Entzündungsreaktionen in der Nasenschleimhaut, unter anderem bei zystischer Fibrose, belegte eine führende pathogenetische Rolle dieser Mediatoren, andere Untersuchungen ergaben sogar, daß IL-8 in der akuten Entzündungsreaktion das dominierende Zytokin ist. Sowohl bei der chronischen Sinusitis als auch bei der Polyposis nasi hingegen stehen andere Mediatoren im Vordergrund, zum Beispiel IL-5 bei der Polyposis oder Interleukin 3 (IL-3) bei der chronischen Sinusitis^{7 8 100}.

Produkte	Wirkung
Elastasen	Gewebedestruktion
Kollagenasen	Gewebedestruktion
Gelatinasen	Gewebedestruktion
Sauerstoffradikale	Variable Schädigung von Biomolekülen
Lipidmediatoren:	
1. Leukotrien B4	a) Erhöhung der Kapillarpermeabilität b) Chemotaktischer Einfluß auf Leukozyten
2. PAF (platelet activating factor)	a) Steigerung kutaner Permeabilität b) Steigerung der Kontraktionen glatter Muskulatur c) Aktivierung von Neutrophilen, Makrophagen und Thrombozyten
3. Thromboxan A2	a) Vasokonstriktion b) Plättchenaggregation
Proinflammatorische Zytokine	TNF- α , IL-1 β oder IL – 6
Interleukin 8 (IL-8)	1. Stimulation eosinophiler Granulozyten 2. Veränderung der Morphologie neutrophiler Granulozyten 3. Exozytose azurophiler Granula; Freisetzung aggressiver Enzyme 4. Induktion der NADPH-Oxidase; Produktion von Wasserstoffsuperoxyd 5. Produktionssteigerung von Leukotrien B4

Tabelle 1.4.2. Syntheseprodukte neutrophiler Granulozyten

1.5. Fragestellung und Ziele der Arbeit

Die Polyposis nasi wird heute nicht als ein solitär entstandenes Erkrankungsbild verstanden, sondern wird vielmehr als eine multifaktoriell ausgelöste entzündliche Erkrankung der Nase und der Nasennebenhöhlen unklarer Ätiologie erklärt. Histologisch ist die Polyposis nasi durch eine Infiltration mit verschiedenen Arten von Leukozyten und ihren Subtypen gekennzeichnet, wobei vor allem der Mechanismus der selektiven Migration der unterschiedlichen Zellarten unklar ist. Neben panleukotaktischen Faktoren werden zellspezifische Chemokine beschrieben, die entscheidend die Art der Entzündung bestimmen und die für das jeweilige Erkrankungsbild eine biologische Relevanz darstellen. Das Ziel der Arbeit ist, neutrophilen-chemotaktische Proteine aus Nasenpolypen- und Nasenmuschelgewebe zu extrahieren. Hierfür wurde mittels der HPLC (High pressure liquid chromatography) eine Methode entwickelt, die es erlaubt, Chemokine aus Polypengewebe zu extrahieren und aufzureinigen, um ihre biologische Aktivität in einem Neutrophilen-Chemotaxis-Assay zu überprüfen. Desweiteren erlaubt diese schrittweise Aufreinigung der Chemokine die Charakterisierung neuer Substanzen bis zu ihrer Proteinstruktur.

Die vorliegende Arbeit umfaßt folgendes Arbeitsprogramm:

1. Extraktion neutrophilen-chemotaktischer Proteine aus Nasenpolypen- und Kontrollgewebe (Nasenmuschel) mittels HPLC (High Pressure Liquid Chromatography).
2. Überprüfung der biologischen Aktivität der in der HPLC aufgereinigten Chemokine im Chemotaxis-Assay.
3. Identifizierung der eluierten Chemokine durch ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) und Chemotaxis-Inhibitionstests.

2. Methoden

2.1. Isolierung neutrophilen-chemotaktischer Mediatoren

2.1.1. Patienten

Nach Überprüfung und Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster und schriftlicher Zustimmung aller beteiligten Patienten wurden die für diese Arbeit benötigten Gewebeproben bei 35 Patienten mit Nasenpolypen während routinemäßiger Operationen entnommen, gefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für weitere Untersuchungen gelagert. Kontrollproben von 30 Patienten, die sich einer Septumplastik mit Reduktion der Nasengangsmucosa unterzogen, wurden ebenfalls gesammelt, wobei eine vorbestehende chronische Sinusitis ein Ausschlusskriterium bedeutete.

2.1.2. Extraktion und Aufreinigung neutrophilen-chemotaktischer Faktoren aus den Gewebeproben

Die in den Polypen- und Nasenmuschelgewebe enthaltenen Chemokine wurden mit Hilfe einer dreistufigen Hochdrucks-(Hochleistungsleistungs-) Flüssigkeitschromatographie [High Pressure (Performance) Liquid Chromatography (HPLC)] aufgereinigt und charakterisiert, ergänzt durch mehrfache Leukozyten Chemotaxis-Assays zur Testung der biologischen Aktivität sowie die Verwendung eines Festphasen- und Sandwich-ELISA zur genauen Identifikation der enthaltenen Chemokine. Darüber hinaus wurde ein Chemotaxis-Inhibitionstest zum Nachweis eines eventuell vorliegenden, chemokin-spezifischen Hemmmusters verwendet.

2.1.3. Isolierungsmethoden

Infolge der biochemischen Eigenschaften der Chemokine (stark kationische, basische, ausgesprochen hydrophobe Proteine mit einem Molekulargewicht von 6 - 10 kDa) kommt es bei der Extraktion zu quantitativen Verlusten aufgrund ihrer Anhaftung an den Oberflächen der Auffanggefäße. Um diesem Problem besser begegnen zu können, wurde für die Extraktion aus nasalem Gewebe ein saurer ethanolischer Puffer gewählt; hierdurch konnten die an der extrazellulären Matrix gebundenen Chemokine besser extrahiert und die Verluste minimiert werden. Darüber hinaus erlaubt dieser Puffer die weitere Applikation des Probenmaterials an bestimmte Chromatographiesäulen, die im weiteren Ablauf verwendet wurden. Ferner wird die Konzentration störender hochmolekularer Proteine durch Verarbeitung der Proben in einem sauren ethanolischen Puffer deutlich gesenkt.

Direkt nach der Exzision des Muschel- und Polypengewebes wurden die Proben mit einem Gewicht von jeweils ca. 500 mg in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C zwischengelagert. 200 mg des jeweiligen Probenvolumens wurden im Rahmen der Aufbereitung in gefrorenem Zustand pulverisiert, anschließend in 2 ml 0,1 M Zitronensäure (pH 2,5) aufgenommen und mit 96%igem Ethanol versetzt. Diese Lösung wurde im Eiswasserbad mittels eines Ultraschallhomogenisators eine Minute lang mit 20 Impulsstößen homogenisiert. Nach zehnteiliger Zentrifugation (1000 G, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und für die weitere Prozessierung vorbereitet. Die chemotaktischen Peptide wurden durch verschiedene Verfahren, wie zum Beispiel die Affinitätstrennung durch HPLC mit heparinbindenden Säulen, die RP-(reversed phase) HPLC, sowie die Kationenaustausch-Chromatographie, isoliert und anschließend mittels verschiedener Chemotaxis-Assays auf ihre biologische Aktivität untersucht.

2.2. Affinitätstrennung heparinbindender Proteine und HPLC

2.2.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von Peptiden

Die HPLC unterscheidet sich von der herkömmlichen Chromatographie, bei der die mobile Phase nur durch geringen Überdruck oder nur der Schwerkraft folgend bewegt wird, durch den hierbei angewendeten hohen Druck, mit der die mobile durch die stationäre Phase gepumpt wird. Bei der Extraktion der C-X-C Chemokine können verschiedene Trennmechanismen angewendet werden, die aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkung zwischen der mobilen und der verwendeten stationären Phase (Verpackungsmaterial) zustande kommen.

Die Verteilungschromatographie, zu der auch die reversed phase (RP) HPLC zählt, nutzt die unterschiedliche Löslichkeit von Proben in den beiden Phasen zur Trennung aus. Es werden hierbei grundsätzlich zwei Methoden unterschieden: In der Normalphasen-Verteilungschromatographie ist die stationäre Phase polarer als die mobile Phase, in der reversed Phase Verteilungschromatographie verhält es sich genau umgekehrt. Die stationäre Phase kann entweder an ein Trägermaterial chemisch gebunden werden, oder das Trägermaterial wird einfach mit der stationären Phase belegt.

2.2.2. Affinitätstrennung heparinbindender Proteine (Heparin-Säule)

Die zunächst durchgeführte Überdruckfiltration (Ausschlussgrenze 3 kDa) in einer Amicon-Kammer führte zu einer Reduktion des Probenvolumen auf 4 ml. Die konzentrierte Proteinlösung wurde auf eine Heparinsäule aufgetragen, die gegen einen Puffer A (0,01 M Tris und 0,01 M Zitronensäure, pH 7,4) äquilibriert wurde. Die nicht heparinbindenden Fraktionen aus den Durchläufen wurden für spätere Untersuchungen bei -20 °C gelagert. Im Anschluss wurden die heparinbindenden Fraktionen mit Hilfe eines 2 molaren NaCl Gradienten

eluiert. Die so gewonnene Fraktion wurde aufgefangen und ebenfalls bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung im Chemotaxis-Assay gelagert.

2.2.3. Umkehrphasen HPLC (RP-8 Säule)

Die HPLC Trennung der Polypeptide wurde bei Raumtemperatur mit einer Spectra-Physics-HPLC-Pumpe (SP 8700+R), einem Kratos Spectro-Flow 783 UV Detektor (Kratos, Westwood, NJ) und einem Spectra-Physics-Rechner-Integrator (SP 4270) durchgeführt. Nur die heparinbindenden Proteine wurden in Amicon-Kammern mit einem Volumen von ca. 2 ml unter Verwendung von Filtern mit einer Ausschlussgrenze von 3 kDa bis auf ein Volumen unter $300\text{ }\mu\text{l}$ konzentriert und, nach vorheriger Äquilibrierung mit 0,1 % TFA (Trifluoressigsäure) in HPLC-Wasser (Promochem), über eine vorgepackte RP-8 HPLC Säule (300-7 C₈ Nucleosil, 250 x 12,6 mm, Marcherey und Nagel, Düren, Deutschland) gegeben. Der UV-Detektor wurde auf 215 nm eingestellt, die Proben mit einer Flussrate von 1 ml pro Minute gegen Acetonitril und 0,1 % TFA eluiert. Die Eluate wurden manuell fraktioniert aufgefangen und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Da die chemotaktische Aktivität der Chemokine konzentrationsabhängig einen glockenförmigen Verlauf zeigt, die in den Proben enthaltene Menge an Chemokinen quantitativ jedoch unbekannt war, wurden sowohl Aliquote mit einem Volumen von $30\text{ }\mu\text{l}$ als auch $60\text{ }\mu\text{l}$ getestet, um mit möglichst hoher chemotaktischer Aktivität arbeiten zu können. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der $60\text{ }\mu\text{l}$ Aliquote verwendet.

2.2.4. Kationenaustausch-Chromatographie (Mono-S Säule)

Nachdem die Eluate des ersten Umkehrphasen-HPLC-Laufs auf ihre biologische Aktivität getestet waren, wurden diejenigen mit einer biologischen Aktivität erneut mittels der Kationenaustausch-Chromatographie aufgetrennt. Bei dieser Form der Chromatographie besteht die stationäre Phase aus einer polymeren Matrix (z.B. Kieselgel mit einer definierten Porengröße), an deren Oberfläche saure oder basische Gruppen gebunden sind. Geladene Teilchen in der mobilen Phase werden durch die entsprechenden funktionellen Gruppen unterschiedlich stark angezogen und damit getrennt.

Die Proben mit einem durchschnittlichen Volumen zwischen 100 und 400 µl wurden über eine Mono-S PC 1,65 HPLC-Säule (Pharmacia Freiburg, Deutschland) mit einer Smart HPLC-Anlage (Pharmacia Freiburg, Deutschland) gegeben, um die Trennung der unterschiedlichen Gruppen durchzuführen. Die Proteine wurden gegen einen ansteigenden HCL-Gradienten mit einem Maximum von 1 Molar (1M) mit einer Durchflussrate von 100 µl/ Min. äquilibriert. Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte bei 280 nm. Die Proteineluate wurden mechanisch fraktioniert aufgefangen.

2.3. Durchführung eines Boydenkammer-Assays zur Bestimmung biologischer Aktivität von Chemokinen

Das Prinzip des Chemotaxis-Assay mit Boydenkammern basiert auf der Fähigkeit neutrophiler Granulozyten zur aktiven Migration durch Filter mit vorgegebener Porengröße. Zunächst erfolgte die Extraktion neutrophiler Granulozyten aus peripher-venös entnommenem Blut. Das untere Kompartiment der Boydenkammern wurde mit 100 µl der aufgereinigten Chemokin-Fractionen aus den Gewebeproben befüllt und durch Auflage eines vorbehandelten Polykarbonatfilters vom oberen Kompartiment, das in den Verschluss der Boydenkammer eingelassen ist, abgetrennt. Danach erfolgte die

Pipettierung der isolierten Granulozyten, die zuvor in eine genau definierte Konzentration gebracht wurden, in das obere Kompartiment. Durch den chemotaktischen Gradienten, der durch die aufgereinigten Chemokin-Fractionen im unteren Kompartiment erzeugt wird, kommt es zur Migration der Granulozyten durch den Filter.

2.3.1. Isolierung neutrophiler Granulozyten aus peripher-venösem Blut

40 ml frisch entnommenes peripher-venöses Blut wurden mit einer sauren, antikoagulatorisch wirkenden Citratdextran Lösung versetzt [2,5 g Natriumcitrat, 1,366 g Zitronensäure und 2,0 g Dextran T-70 (Sigma, München, Deutschland) auf 100 ml Aqua dest.]. Anschließend wurde das Blut 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (1800 U/ min). Die überstehende Schicht, bestehend aus Plasma und Zellen mit niedrigeren Sedimentationskonstanten, wurde vorsichtig abgesaugt. Danach wurde die gelöste, auf Körpertemperatur vorgewärmte Gelatine (37 °C) auf das Sediment gegeben und vorsichtig gemischt. Die Gefäße wurden locker verschlossen zur Inkubation 30 Minuten in ein Wasserbad bei 37 °C gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Gelatineüberstand abgenommen, in neue Gefäße überführt und zehn Minuten bei 1600 Umdrehungen zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde verworfen und das nunmehr mit Leukozyten angereicherte Sediment vorsichtig in Ammoniumchlorid suspendiert, auf 10 ml aufgefüllt und sieben bis zehn Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte eine erneute Mischung und der Ammoniumchloridhaltige Überstand wurde 10 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert (1200 U/ min). Der Überstand wurde abgesaugt und das Leukozytenpellet mit PBS (Phosphatpuffer) gewaschen und nochmals zehn Minuten bei 1200 Umdrehungen zentrifugiert; dieser Schritt wurde im Anschluß wiederholt. Das Sediment wurde in ein definiertes Volumen Komplettpuffer (BSA 1%) aufgenommen, verdünnt und eine Probe auf eine Zählkammer gebracht, um die Konzentration der Granulozyten zu ermitteln. Anhand der so ermittelten Anzahl konnte die für die Boydenkammer-Assays

benötigte Konzentration errechnet werden und die Lösung gegebenenfalls weiter verdünnt werden. Durch den Trypanblau-Ausschlußtest konnte nachgewiesen werden, daß in der durch diese Methode erhaltenen Zellsuspension 90% neutrophile Granulozyten enthalten sind, die zu 98 % vital sind.

2.3.2. *Boydenkammer-Assay*

Stephen Boyden hat diese Methode zum Nachweis zellulärer Migration bereits 1962 entwickelt. Das Verfahren wurde jedoch durch Schroeder 1987 modifiziert. In dieser Arbeit wurden Polyacrylatkammern der Firma Costar, Deutschland, verwendet, deren Füllmenge des unteren Kompartiments 100 µl beträgt. Da die durch HPLC aufgereinigten, chemotaktischen Fraktionen nicht ohne weiteres im Chemotaxis-Assay verwendet werden können, erfolgte zunächst die Lyophilisierung der Proben und anschließend eine Mischung mit 300 µl PBS. Daraufhin wurde der untere Kammeranteil zunächst mit 130 µl der chemotaktischen Fraktionen gefüllt und 100 µl der Granulozytensuspension nach Auflage eines Filters und Verschluss des unteren Kompartiments in die dafür vorgesehene Vertiefung des Deckels gegeben. Die Trennung zwischen unterem und oberem Kompartiment erfolgte durch vorbehandelte Polykarbonatfilter mit einer Porengröße von 3 µm, deren Durchmesser passend für die Kammern auf 8 Millimeter gestanzt wurden. Durch die Vorbehandlung mit 1 M NaOH und 50 %igem (V/V; Volumen pro Volumen) wässrigem Ethanol entsteht innerhalb der Filter eine anionische Ladung, die ihre Bedeutung bei dem Transport kationischer Chemokine hat. Der Überstand des unteren Kammeranteils, ca. 20 bis 30 µl, wurde nach Auflage des Filters abgesaugt und verschlossen. In den Deckel wurden 100 µl der Granulozytensuspension mit einem Gehalt von je 200.000 Zellen gegeben, die in 1%igem Rinderserum aufgenommen waren. Die Boydenkammern wurden eine Stunde lang im feuchten Milieu im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß wurde die Zellsuspension abgesaugt, die Deckel wurden abgeschraubt und die Filter vorsichtig entfernt.

Nach Zugabe von 10 µl 1 %iger Triton-X-Lösung in das untere Kompartiment wurden die gewanderten Zellen innerhalb von fünf Minuten lysiert. Diese Lösung wurde auf Mikrotiterplatten umpipettiert und jeder Fraktion wurden 100 µl β-Glucoronidase [Substrat p-Nitrophenyl-β-G-Glucoronid (Sigma) 10 mM in 0,1 M wässriger Natriumacetatlösung pH 4,0) hinzugefügt. Die Mikrotiterplatten wurden im Brutschrank zwölf Stunden lang inkubiert. Die enzymatische Umsetzungsreaktion wurde im Anschluß daran durch Zugabe von 100 µl einer 0,1 M Glycin-Puffer-Lösung (pH 10,0) gestoppt. Das so entstandene Substrat, P-Nitrophenolat, wurde in der Mikrotiterplatte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Um die echte chemotaktische Migration der Leukozyten bestimmen zu können, wurde gleichzeitig eine definierte Anzahl neutrophiler Granulozyten mittels Triton lysiert und die Konzentration der β-Glucoronidase gemäß den oben genannten Vorgaben gemessen.

Die so durchgeführten Bestimmungen der chemotaktischen Aktivität erfolgten im Doppelansatz, dies bedeutet, daß jeweils zwei Aliquote der zu untersuchenden Fraktion gemessen wurden und der Mittelwert ermittelt wurde. Reine Pufferlösung diente als Negativ-, fNLP (N-Formyl-Nle-Leu-Phe, Sigma) in einer Konzentration von 10^{-8} M als Positivkontrolle. Um das Maß der chemotaktischen Aktivität zu objektivieren und vergleichbar zu machen, wurde der chemotaktische Index (CI) jeder Probe bestimmt.

$$\text{CI} = \frac{\text{Zellwanderung unter Stimulation}}{\text{Zufällige Zellwanderung}}$$

2.4. Charakterisierung und Bestimmung der Chemokine

2.4.1. Festphasen-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Festphasen-ELISA stellen sensible Nachweismethoden dar, mit denen bereits geringe Mengen von Antigenen detektiert werden können. Für den Nachweis von NAP-2 wurde eine ELISA Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Nunc, Roskilde, Dänemark) verwendet. Die Vertiefungen wurden mit jeweils 10 µl HPLC Fraktionen gefüllt, die mit Acetonitril lyophilisiert wurden. Daraufhin wurden 100 µl „coating“ Puffer (0.1 M Na₂CO₃, pH 10.5) in jede Vertiefung gegeben und die Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Reinigung der Platte mit PBS/ Tween [0,05 % (w/v; Masse pro Volumen)] wurde erneut inkubiert, dieses Mal mit den beiden monoklonalen Antikörpern mAb 46E5 und 52E8. Beide Antikörper sind Mitglieder der IgG Familie, 46E5 gehört zur Untergruppe der IgG_{2a}, 52E8 zur Untergruppe des IgG₁. Entscheidend für die Auswahl der Antikörper ist ihre Spezifität: 46E5 reagiert speziell auf β-Thromboglobulin und homologe Peptide, wohingegen 52E8 IL-8 spezifisch ist¹¹³. Als Positivkontrolle diente IL-8, dessen Nachweisgrenze bei 5 ng lag; als Negativkontrolle wurde gegen einen Leerwert gemessen. Nach der Inkubation wurden Peroxidase-markierte Anti-Kaninchen-IG Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) in entsprechender Verdünnung und o-Phenylenediamin als Substrat für den Nachweis der Peroxidase Aktivität hinzugegeben.

2.4.2. Quantitativer GRO-α und IL-8 Sandwich-ELISA

Alle Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie, deren chemotaktischer Index (CI) im Boydenkammer-Assay > 1,5 war, die jedoch keine Reaktion auf die im Festphasen-ELISA verwendeten monoklonalen Antikörper mAb 46E5 und 52E8 zeigten, wurden in einem für IL-8 und GRO-α spezifischen Sandwich-ELISA gemäß den Vorgaben des Herstellers (R&D, Wiesbaden,

Deutschland) angewendet. Die Detektionsgrenze für die Chemokine wird mit 31pg/ ml angegeben; somit war im Vergleich zu dem Festphasen-ELISA eine sensiblere und quantitative Bestimmung der Chemokin-Konzentrationen möglich. Die hierbei ermittelten Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.2.2. und 3.2.3. sowie 3.3.2. bis 3.3.4. wiedergegeben.

2.5. Chemotaxis-Inhibitionsstest

Die inhibierende Wirkung eines monoklonalen Antikörpers (mAb) auf die chemotaktische Aktivität der Chromatographie-Fractionen, die NAP-2 enthielten, wurde unter Verwendung eines Boydenkammer-Assays untersucht. Reihenverdünnungen des Antikörpers C24 (Konzentration 1mg/ml), der selektiv auf alle bekannten Mitglieder der β -Thromboglobulin-Antigen-Familie einschließlich des NAP-2, reagiert²², wurden zunächst 10 Minuten mit der zu untersuchenden Fraktion aus der Kationenaustausch-Chromatographie bei Raumtemperatur präinkubiert. Als Negativkontrolle wurden Antikörperverdünnungen mit PBS inkubiert. Danach wurden die Proben in die unteren Kompartimente der Boydenkammer gefüllt und mit Polycarbonat Filtern (Porengröße 3 μ m) abgedeckt. PMN (polymorphnukleäre Granulozyten) wurden, wie zuvor bereits beschrieben, aus venösem Blut frisch isoliert und in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ ml PBS suspendiert. Jeweils 100 μ l dieser Lösung wurden in das obere Kompartiment gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zahl der innerhalb einer Stunde chemotaktisch gewanderten Zellen wurde anhand einer indirekten Zählmethode bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Prozent einer Kontrollnettochemotaxis angegeben (Stimulierte Migration - Migration durch Puffer).

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung neutrophilen-chemotaktischer Polypeptide aus Nasenpolypen und Nasenmuschelschleimhaut

3.1.1. Isolierung der Proteinfractionen, Heparinaffinitätschromatographie

Nachdem die Chemokine mittels eines Zitratpuffers aus den Gewebeproben isoliert wurden, erfolgte im Anschluss eine Konzentrierung der Proteinlösung in einer Amicon-Kammer (Amicon-YM-3-Filter), die für die daraufhin erfolgende Affinitätstrennung an der Heparinsäule (Überdruckinfiltration) umgepuffert wurde. Zu diesem Zweck wurde ein Puffergemisch verwendet, das gegen die Heparinsäule äquilibriert wurde. Nach der Heparinaffinitätschromatographie erschienen die nicht heparinbindenden Peptide im Durchlauf; die heparinbindenden Peptide wurden jedoch reversibel an der Heparinsäule gebunden und erst nach Auswaschen der Säule mit einem NaCl-Gradienten aufgefangen.

Die Eluate der heparinbindenden Fraktionen aus der Affinitäts-Chromatographie, die nach Auswaschen der Säule mit einem NaCl-Gradienten aufgefangen wurden, enthielten ebenfalls mehrere Proteingipfel. Im Gegensatz zu den nicht heparinbindenden Fraktionen ließ sich in einigen dieser Fraktionen eine Neutrophilen-chemotaktische Aktivität mittels Boydenkammer-Assay nachweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Neutrophilen-chemotaktisch positiv getestete, heparinbindende Fraktion einer weiteren Prozessierung zugeführt. Diese Charakterisierung umfasste als nächsten Schritt die Auftrennung der Fraktion durch die präparative RP-8-HPLC-Säule.

3.1.2. Charakterisierung neutrophilen-chemotaktischer Polypeptide durch eine Umkehrphasen-Ausschlusschromatographie (RP-8-HPLC)

Die heparinbindenden Fraktionen aus der Affinitäts-Chromatographie wurden konzentriert und einer Umkehrphasen-RP-8-HPLC zugeführt. Hierbei wurden mehrere Proteingipfel registriert, die wiederum in jeweils einzelne Fraktionen getrennt gesammelt wurden. Sowohl die Extrakte aus Nasenmuschelgewebe als auch aus Polypengewebe zeigten bei einem erneut durchgeführten Boydenkammer-Assay neutrophilen-chemotaktische Aktivität. Die sich gemäß des Eluatmusters der RP-8-HPLC entsprechenden Fraktionen wurden für die weitere Prozessierung an der Mono-S-Kationenaustausch-Chromatographie zusammengeführt.

Die in diesen Läufen gemessene biologische Aktivität war mit der Aktivität des als Positivkontrolle verwendeten fNLP (N-Formyl-Nle-Leu-Phe) vergleichbar. Für die Fraktionen 10-11, 12-14, 15, 16-17 sowie 18-19 aus den Nasenpolypenextrakten wurde eine starke, für die Fraktionen 20-25 nur eine schwache chemotaktische Aktivität bestimmt, gemessen an den Werten für die Positivkontrolle (Abb. 3.1.2.1.). Die Aktivität in den Fraktionen 9-14 aus Nasenmuschelextrakten (Abb. 3.1.2.2.) fiel schwächer aus.

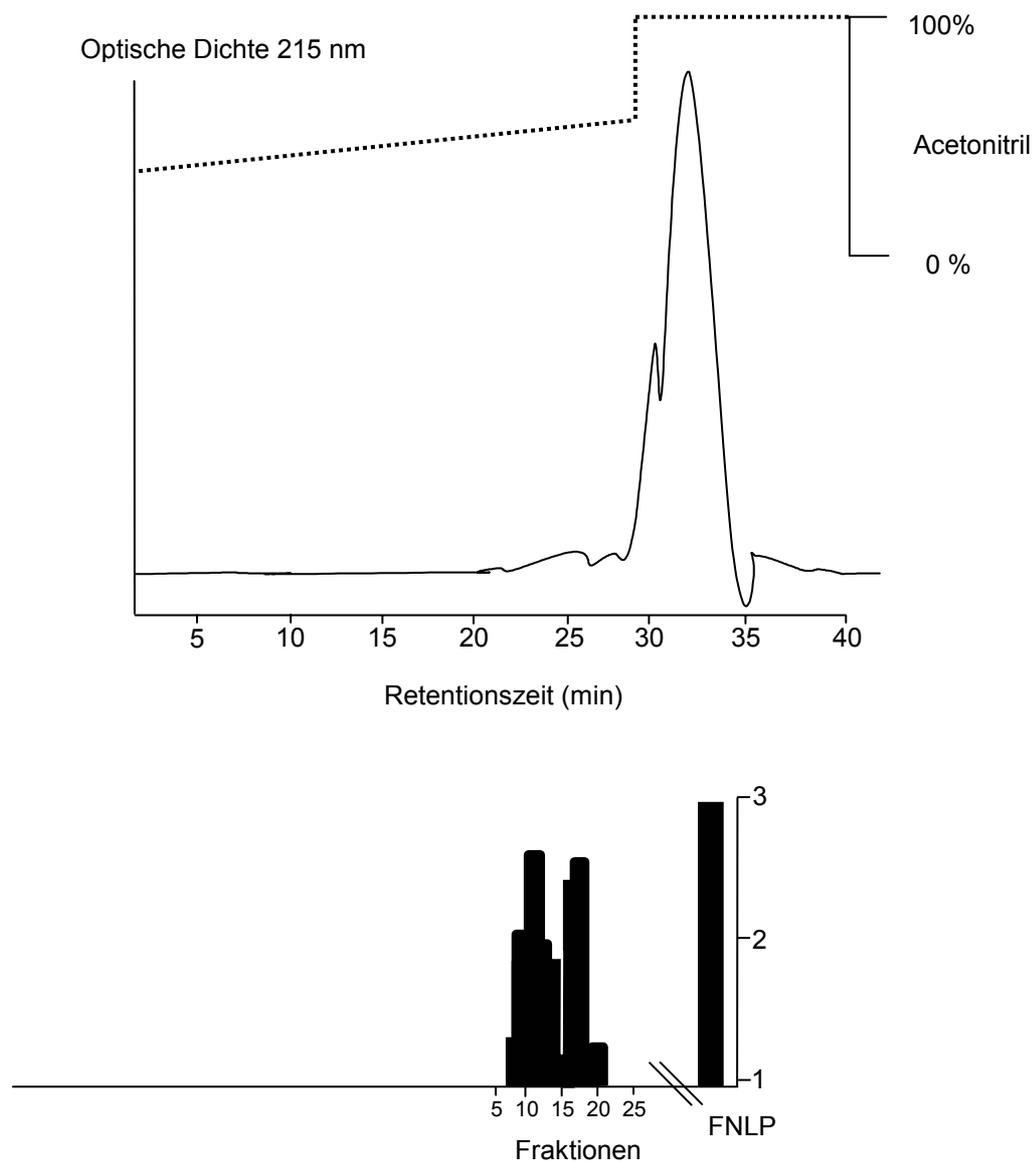


Abb. 3.1.2.1. Heparinbindende Proteine aus Nasenpolypen enthalten neutrophilen-chemotaktische Aktivität

Die heparinbindenden Fraktionen des Nasenpolypengewebes aus der Affinitäts-Chromatographie wurden an einer Umkehrphasen-HPLC (RP-8) weiter aufgetrennt, fraktioniert aufgefangen und anschließend in einem Chemotaxis-Assay auf ihre biologische Aktivität bezüglich neutrophiler Granulozyten untersucht, hier durch die Säulen dargestellt. FNLK diente als Positiv-, Pufferlösung als Negativkontrolle. Gezeigt sind die Ergebnisse für die 60 µl Aliquote.

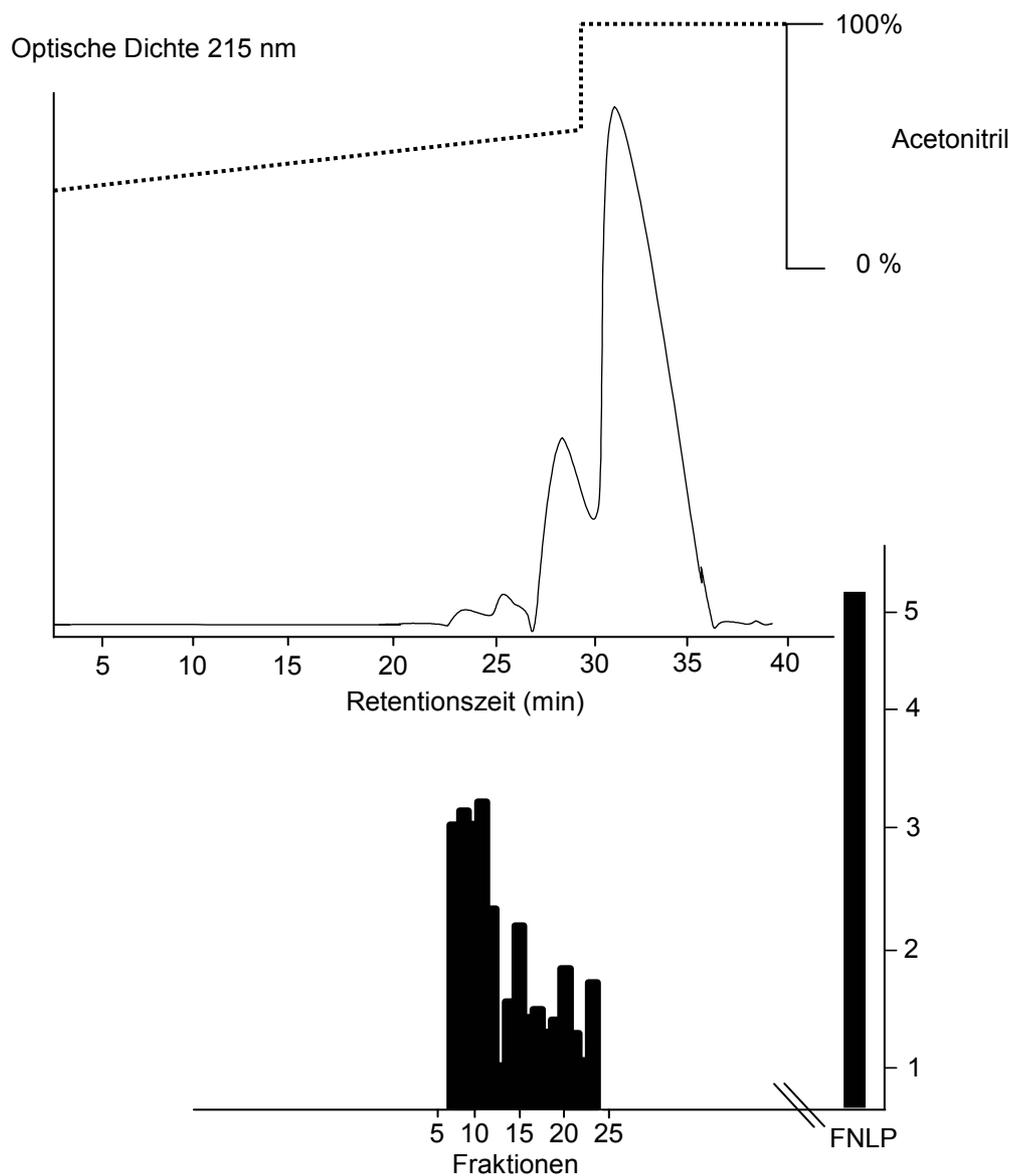


Abb. 3.1.2.2. Heparinbindende Proteine aus Nasenmuscheln enthalten neutrophilen-chemotaktische Aktivität

Die heparinbindenden Fraktionen der Nasenmuschelextrakte aus der Affinitäts-Chromatographie wurden an einer Umkehrphasen-HPLC (RP-8) weiter aufgetrennt, fraktioniert aufgefangen und anschließend in einem Chemotaxis-Assay auf ihre biologische Aktivität bezüglich neutrophiler Granulozyten untersucht, hier durch die Säulen dargestellt. FNLN diente als Positiv-, Pufferlösung als Negativkontrolle. Gezeigt sind die Ergebnisse für die 60 µl Aliquote.

3.1.3. *Aufreinigung von biologisch aktiven neutrophilen-chemotaktischen Proteinen durch Kationenaustausch-Chromatographie (Mono-S-HPLC)*

Die durch Ausschluss-Chromatographie mittels RP-8 Säule charakterisierten benachbarten Proteinfractionen mit neutrophilen-chemotaktischer Aktivität wurden sowohl aus den Nasenpolypen- als auch aus den Nasenmuschel-extraktläufen vereinigt und anschließend an einer Mono-S-HPLC Säule chromatographiert.

3.2. Ergebnisse der Chromatographie von Nasenmuschelextrakten

Nach den RP-8-HPLC Läufen wurde biologische Aktivität in den Fraktionen 9-10, 11-13, 15-16 und 19-24 nachgewiesen; in vier Proteinfractionen getrennt, wurden diese zur weiteren Charakterisierung auf die Mono-S-Säule aufgetragen. Die Auswertung zeigte einen Proteingipfel im Chromatogramm; im Rahmen des Boydenkammer-Assays zur Überprüfung der biologischen Aktivität wurde keine nennenswerte Neutrophilen-Chemotaxis nachgewiesen.

In den Abbildungen 3.2.1. bis 3.2.4. werden sowohl die einzelnen Chromatogramme als auch die chemotaktischen Aktivität der jeweiligen Fraktionen dargestellt. Im direkten Vergleich zur Positivkontrolle fällt die nur sehr schwach ausgeprägte chemotaktische Aktivität der einzelnen Fraktionen auf. Alle Untersuchungen zur Überprüfung der neutrophilen-chemotaktischen Aktivität mittels Boydenkammer-Assay wurden im Doppelansatz geprüft und wiesen eine Standardabweichung des Mittelwertes von maximal 20 % auf. Die Identifikation eventuell vorliegender Chemokine wurde in einem Festphasen ELISA durch Verwendung der monoklonalen Antikörper mAb 46E5 und 52E8 getestet, die spezifisch auf die β -Thromboglobulin Ag Familie (46E5) bzw. IL-8 (52E8) reagierten. Darüber hinaus wurden Fraktionen, die im Boydenkammer-Assay einen chemotaktischen Index (CI) > 1,5 aufwiesen, jedoch ohne Reaktion auf die monoklonalen Antikörper mAb 46E5 und 52E8 blieben, mittels eines quantitativen ELISA auf den Nachweis von GRO- α und IL-8 getestet.

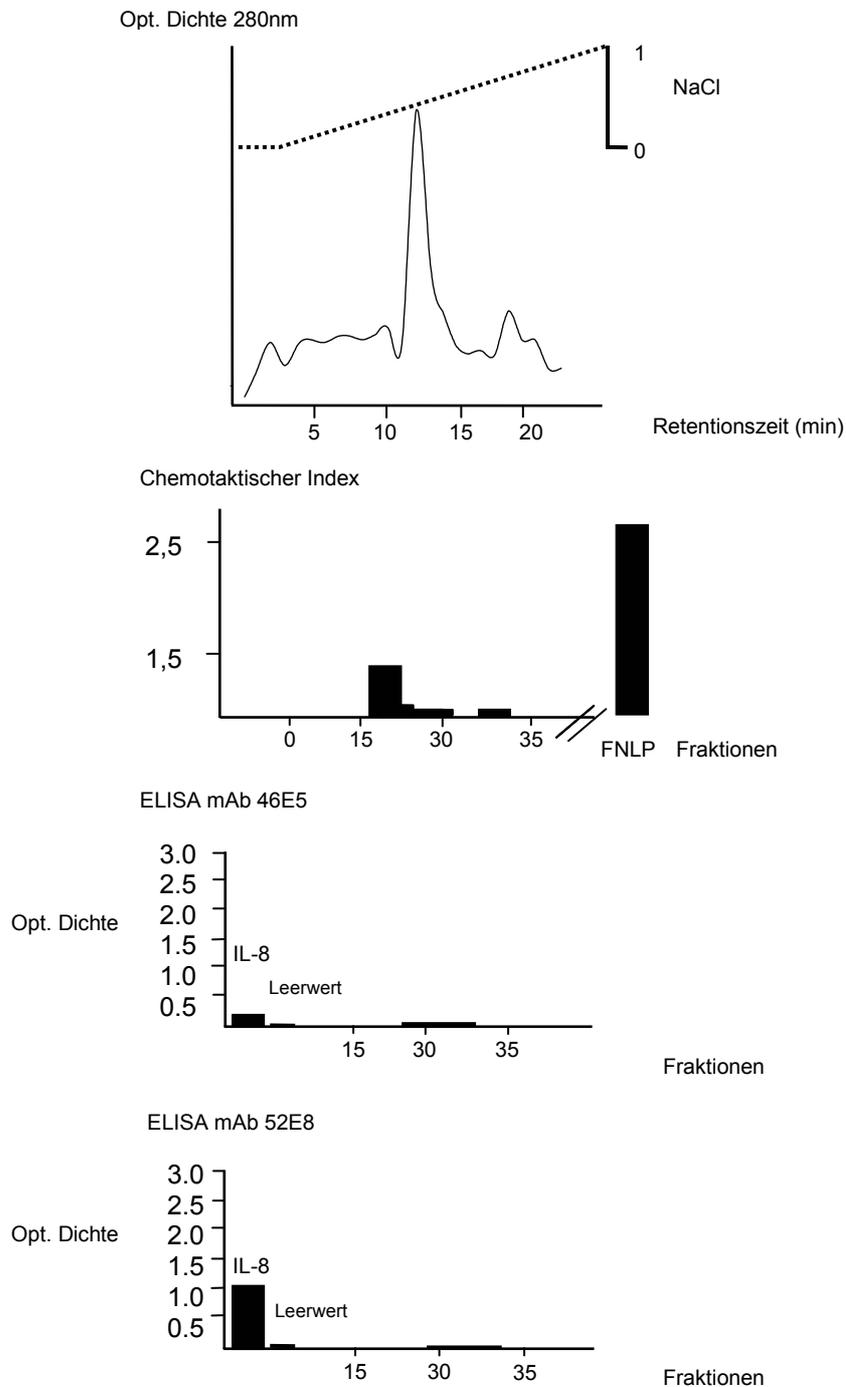


Abb. 3.2.1. Kationenaustausch-Separation der RP- 8 gereinigten Nasenmuschelextrakte ohne deutliche neutrophilen-chemotaktische Aktivität

Gezeigt sind die in der Kationenaustauschchromatographie gereinigten ehemaligen Fraktionen 9–10 der RP-Säulenfraktionen des Nasenmuschelgewebes. Der Boydenkammer-Assay (Graph 2) zeigte eine nur moderate chemotaktische Aktivität.

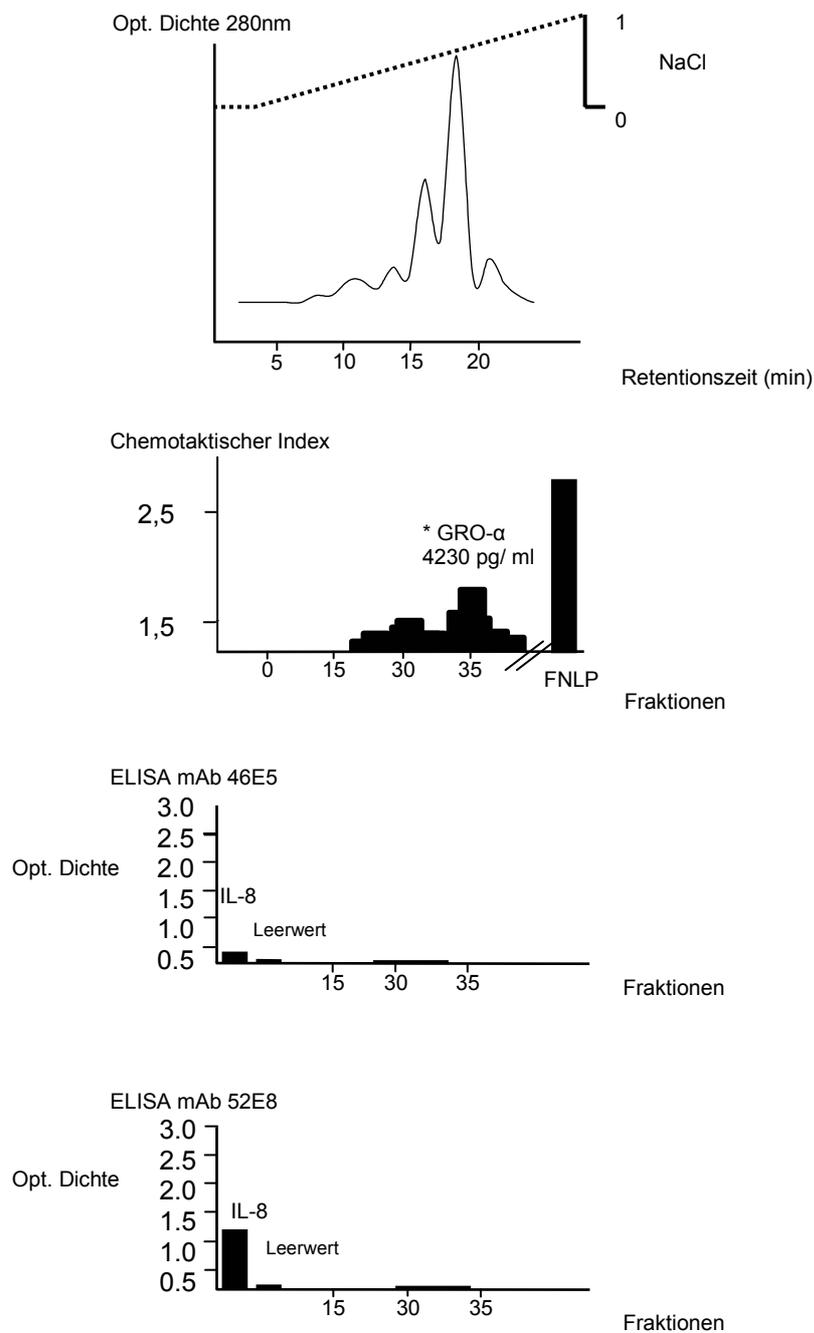


Abb. 3.2.2. Kationenaustausch-Separation der RP- 8 gereinigten Nasenmuschelextrakte ohne deutliche neutrophilen-chemotaktische Aktivität

Gezeigt sind die in der Kationenaustauschchromatographie gereinigten ehemaligen Fraktionen 11-13 der RP-Säulenfraktionen des Nasenmuschelgewebes. Der Boydenkammer-Assay (Graph 2) zeigte moderate chemotaktische Aktivität, die im quantitativen ELISA als GRO- α in einer Konzentration von 4230 pg/ml bestimmt wurde.

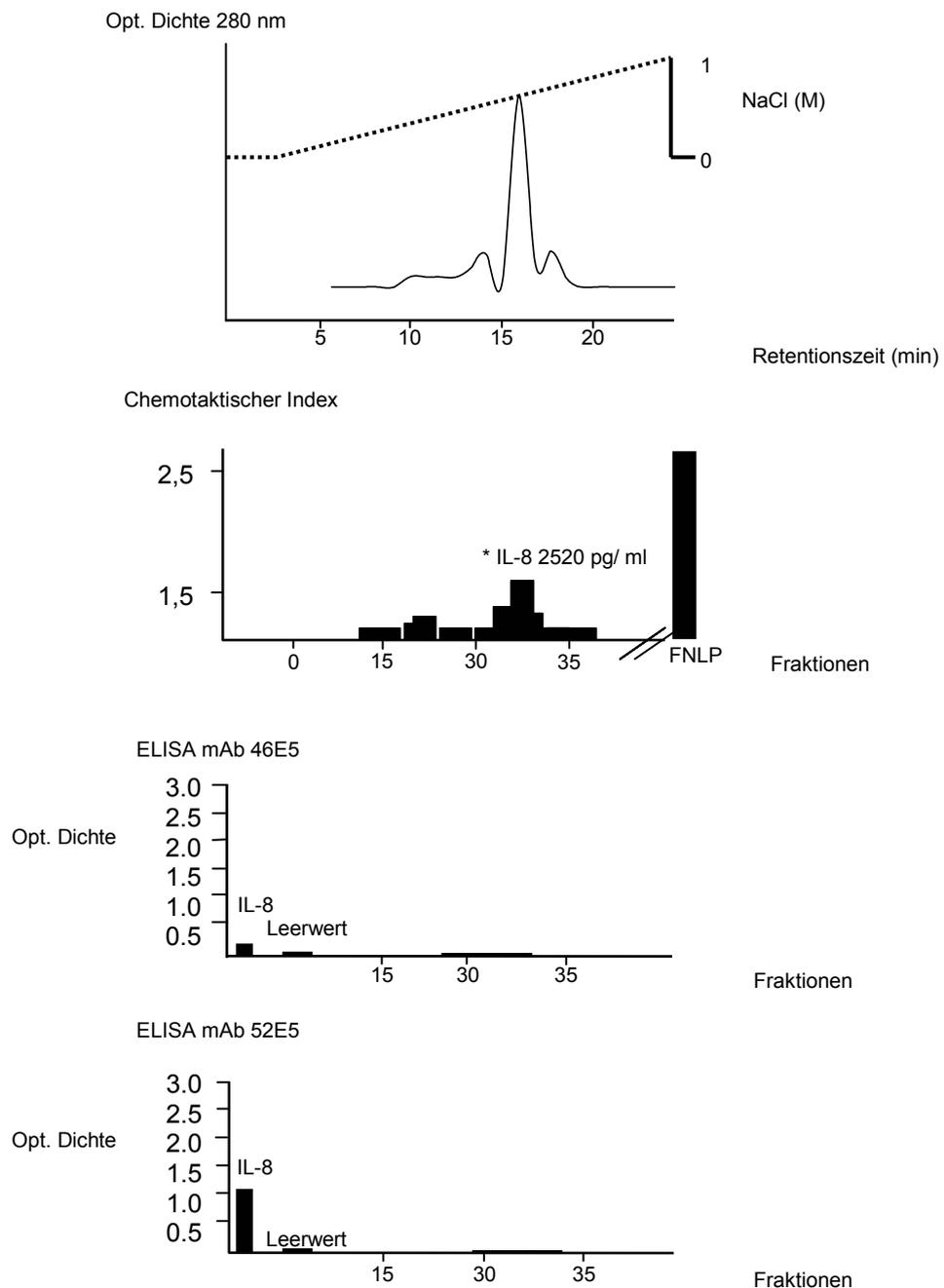


Abb. 3.2.3. Kationenaustausch-Separation der RP- 8 gereinigten Nasenmuschelextrakte ohne deutliche neutrophilen-chemotaktische Aktivität

Gezeigt sind die in der Kationenaustauschchromatographie gereinigten ehemaligen Fraktionen 15-16 der RP-Säulenfraktionen des Nasenmuschelgewebes. Der Boydenkammer-Assay (Graph 2) zeigte moderate chemotaktische Aktivität, die in einem quantitativen ELISA als IL-8 in einer Konzentration von 2520 pg/ ml bestimmt wurde.

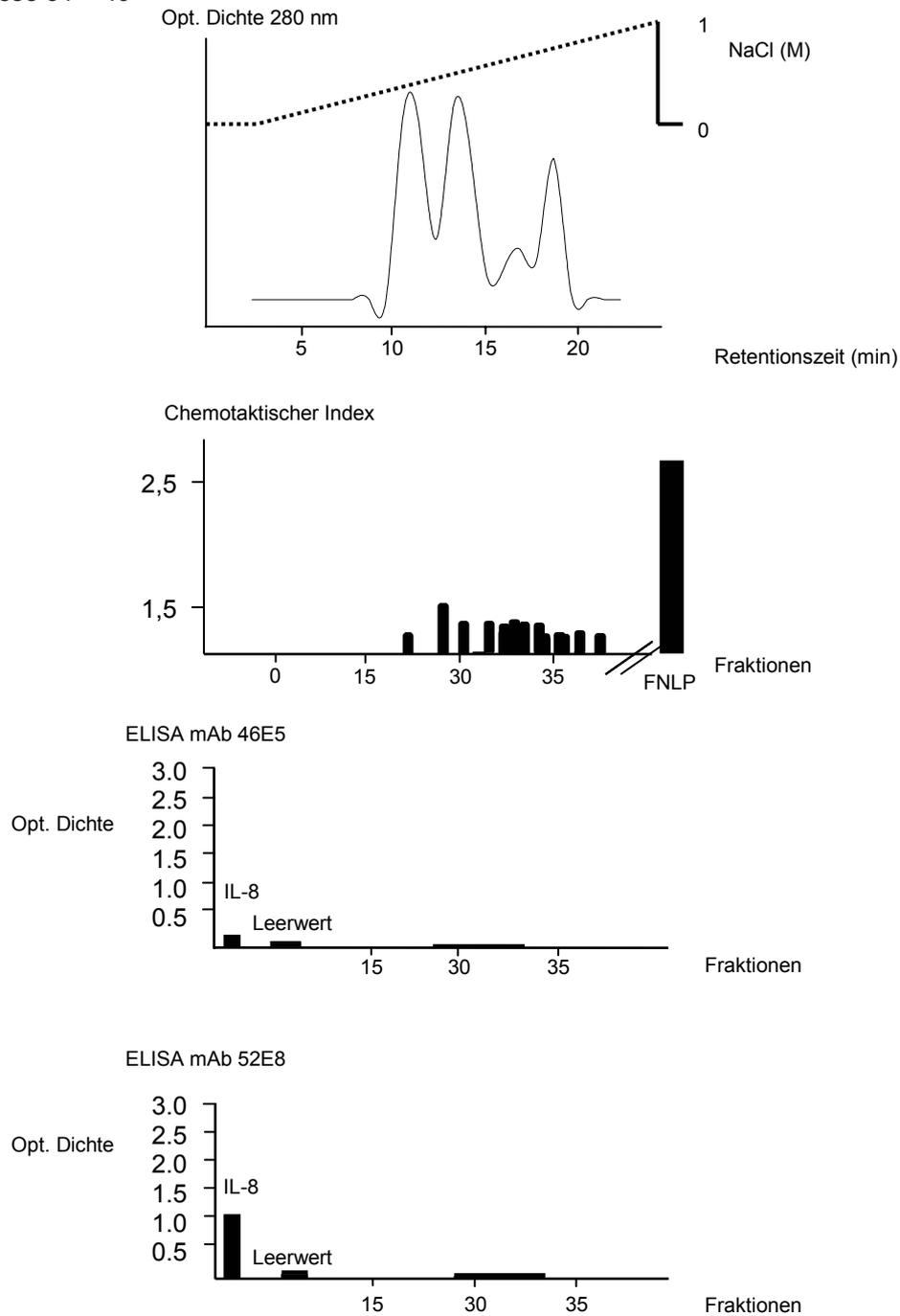


Abb. 3.2.4. Kationenaustausch-Separation der RP- 8 gereinigten Nasenmuschelextrakte ohne deutliche neutrophilen-chemotaktische Aktivität

Gezeigt sind die in der Kationenaustauschchromatographie gereinigten ehemaligen Fraktionen 19-24 der RP-Säulenfraktionen des Nasenmuschelgewebes. Der Boydenkammer-Assay (Graph 2) zeigte eine nur moderate chemotaktische Aktivität.

3.3. Ergebnisse der Chromatographie von Nasenpolypenextrakten

Die biologisch aktiven Fraktionen aus den RP-8 HPLC Läufen ergaben insgesamt sechs neue Proteinfractionen. Diese Proben wurden erneut, dieses Mal mittels Kationenaustausch-Chromatographie, einer Charakterisierung unterzogen und die so erhaltenen Fraktionen ebenfalls auf ihre chemotaktischen Eigenschaften untersucht. Zu diesem Zweck wurden jeweils 3 µl der Fraktionen lyophilisiert und in 300 µl Komplettpuffer zur Testung in Boydenkammern gelöst.

Aus diesem Boydenkammer-Assay wurden unterschiedliche Resultate ermittelt: Die stärkste neutrophilen-chemotaktische Aktivität, die die Aktivität der Positivkontrolle (FNLP) um mehr als den Faktor zwei überstieg, entstammte der ursprünglichen Fraktion 10-11 und ist in Abbildung 3.3.1. dargestellt. Ferner enthalten die Fraktionen 18-19 starke neutrophilen-chemotaktische Aktivität, die ungefähr 75% der Positiv-Kontrolle (FNLP) ausmacht (Abbildung 3.3.2).

Schwach erhöhte Aktivität ließ sich, wie in Abb. 3.3.3. bis 3.3.6. dargestellt, in den Fraktionen 12-14, 15, 16-17 und 20-25 aus dem RP-8 Lauf nach der Auftrennung an der Mono-S Säule nachweisen. Diese fiel aber bedeutend schwächer aus als die in Abb. 3.3.1. registrierte Aktivität.

Alle Fraktionen, deren chemotaktischer Index $> 1,5$ war, wurden in einem quantitativen ELISA für Gro- α und IL-8 getestet. Die hierbei ermittelten Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.3.2., 3.3.3. und 3.3.4 wiedergegeben.

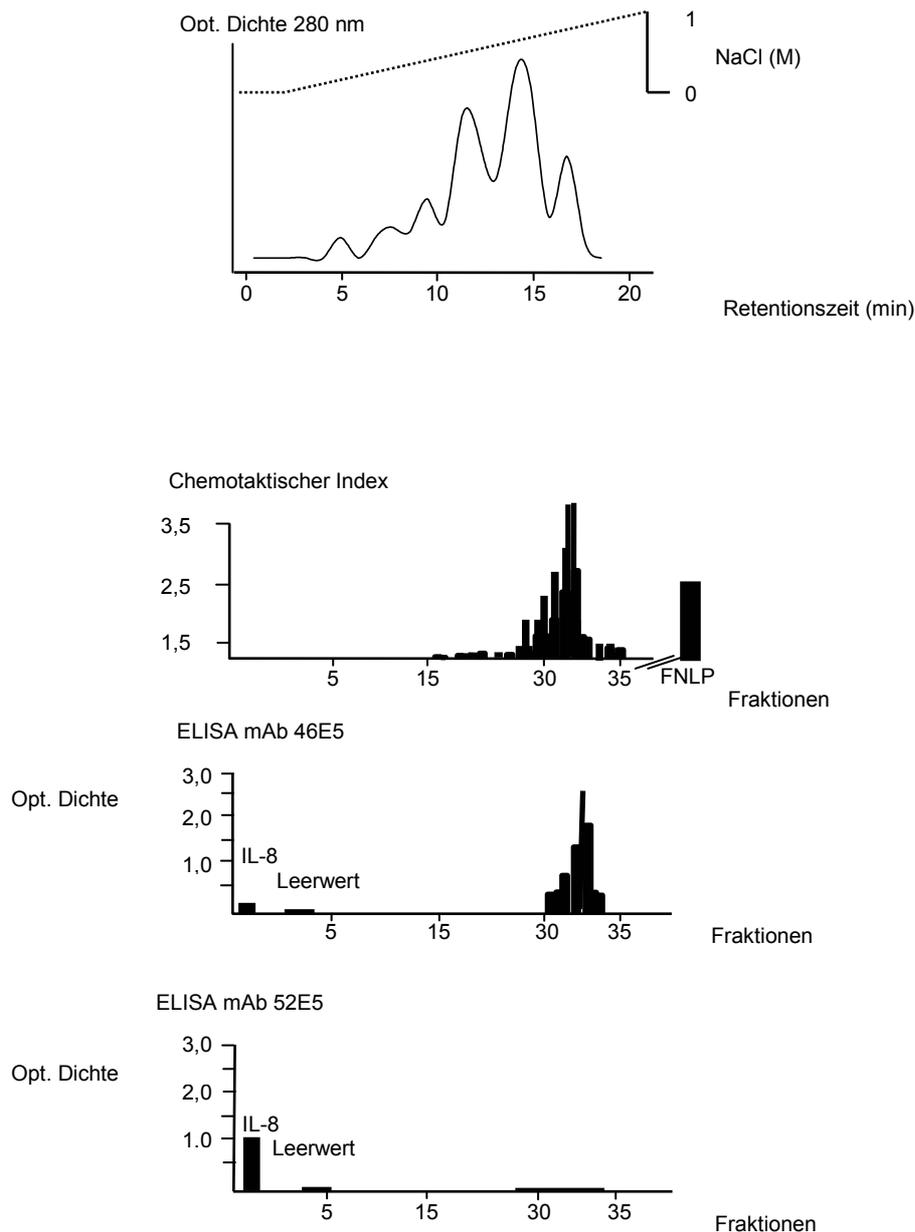


Abb. 3.3.1. Mono-S- und RP-8-HPLC gereinigte Nasenpolypenextrakte mit sehr starker neutrophilen-chemotaktischer Aktivität

Das Diagramm zeigt zum einen das Chromatogramm der biologisch aktiven Fraktionen 10-11 aus dem RP-8 Lauf, hier erneut mittels Mono-S-Säule aufgetrennt. Zum anderen ist der chemotaktische Index der aufgefangenen Fraktionen eingezeichnet, der wesentlich stärker ist als die der Positivkontrolle. Mit Hilfe des Festphasen-ELISA wurde eine hohe Immunreaktivität spezifisch für die β -Thromboglobulin-Antigen Familie (mittels mAb 46E5) nachgewiesen.

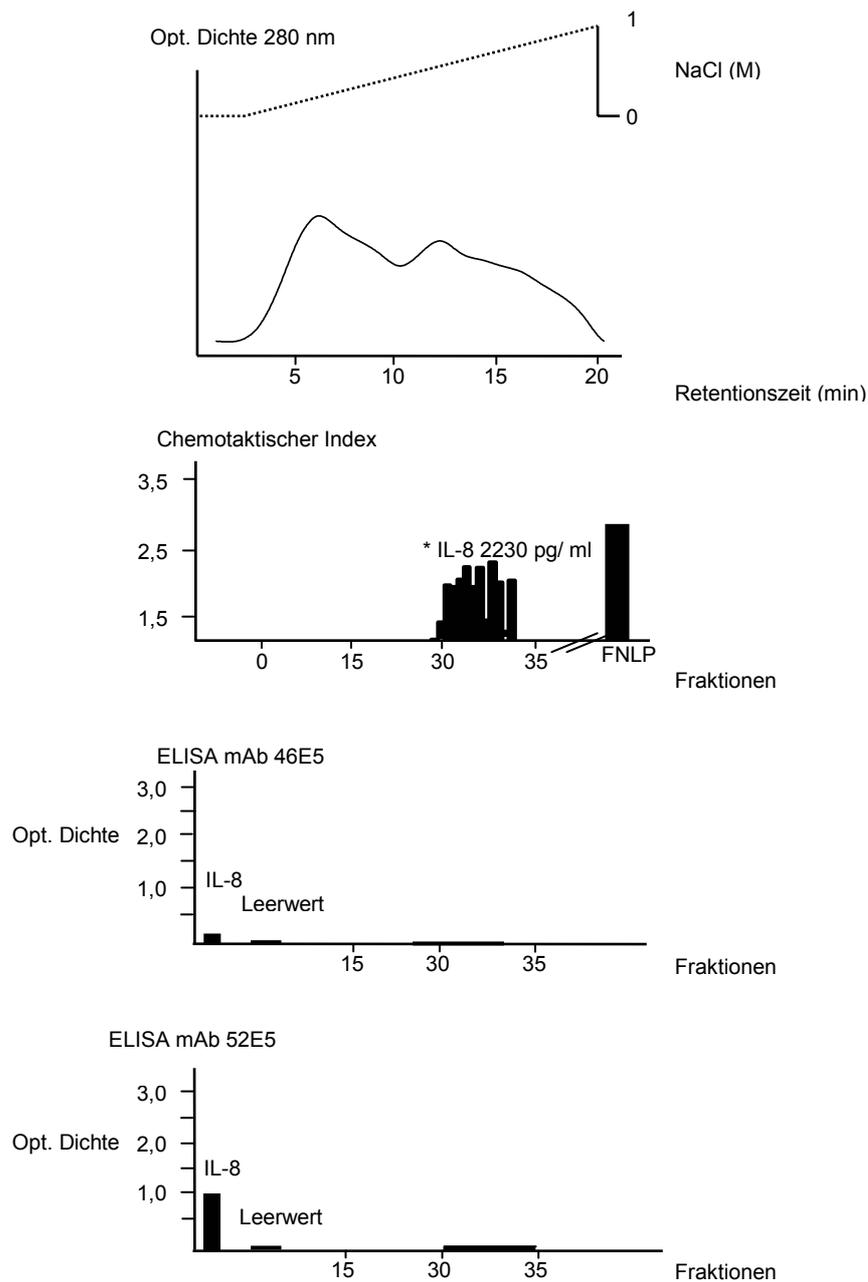


Abb. 3.3.2. Mono-S- und RP-8-HPLC gereinigte Nasenpolypenextrakte mit starker neutrophilen-chemotaktischer Aktivität

Das Diagramm zeigt zum einen das Chromatogramm der biologisch aktiven Fraktionen 18-19 aus dem RP-8 Lauf, hier erneut mittels Mono-S-Säule aufgetrennt. Zum anderen ist der chemotaktische Index der aufgefangenen Fraktionen eingezeichnet, der ca. 75 % der Positivkontrolle ausmacht. IL-8 in einer Konzentration von 2230 pg/ ml konnte mittels quantitativem ELISA nachgewiesen werden.

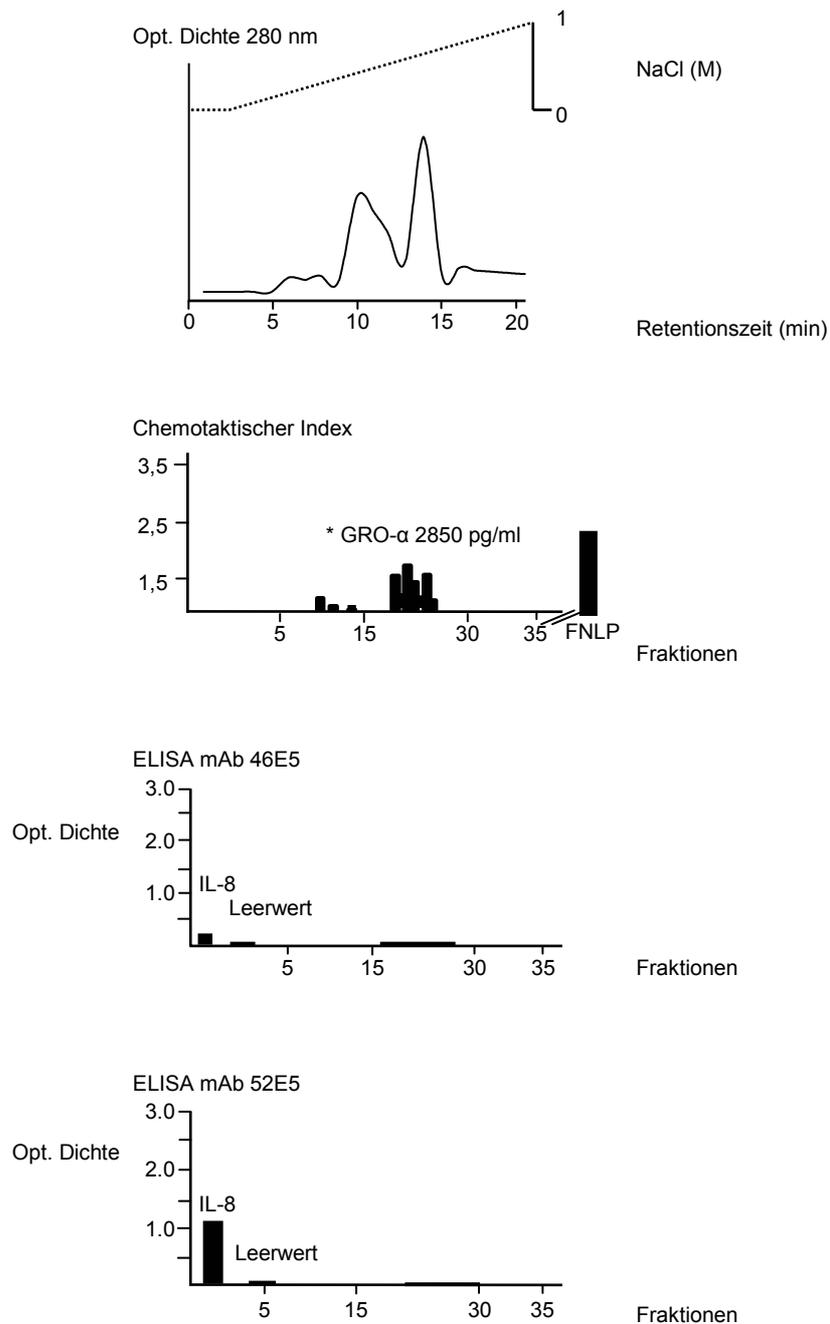


Abb. 3.3.3. Mono-S- und RP-8-HPLC gereinigte Nasenpolypenextrakte mit relativer neutrophilen-chemotaktischer Aktivität

Das Diagramm zeigt zum einen das Chromatogramm der biologisch aktiven Fraktionen 12-14 aus dem RP-8 Lauf, hier erneut mittels Mono-S-Säule aufgetrennt. Zum anderen wurde der chemotaktische Index bestimmt, der in den Fraktionen 23-25 größer 1,5 war; in dem daraufhin durchgeführten quantitativen ELISA wurde GRO-α in einer Konzentration von 2850 pg/ml nachgewiesen.

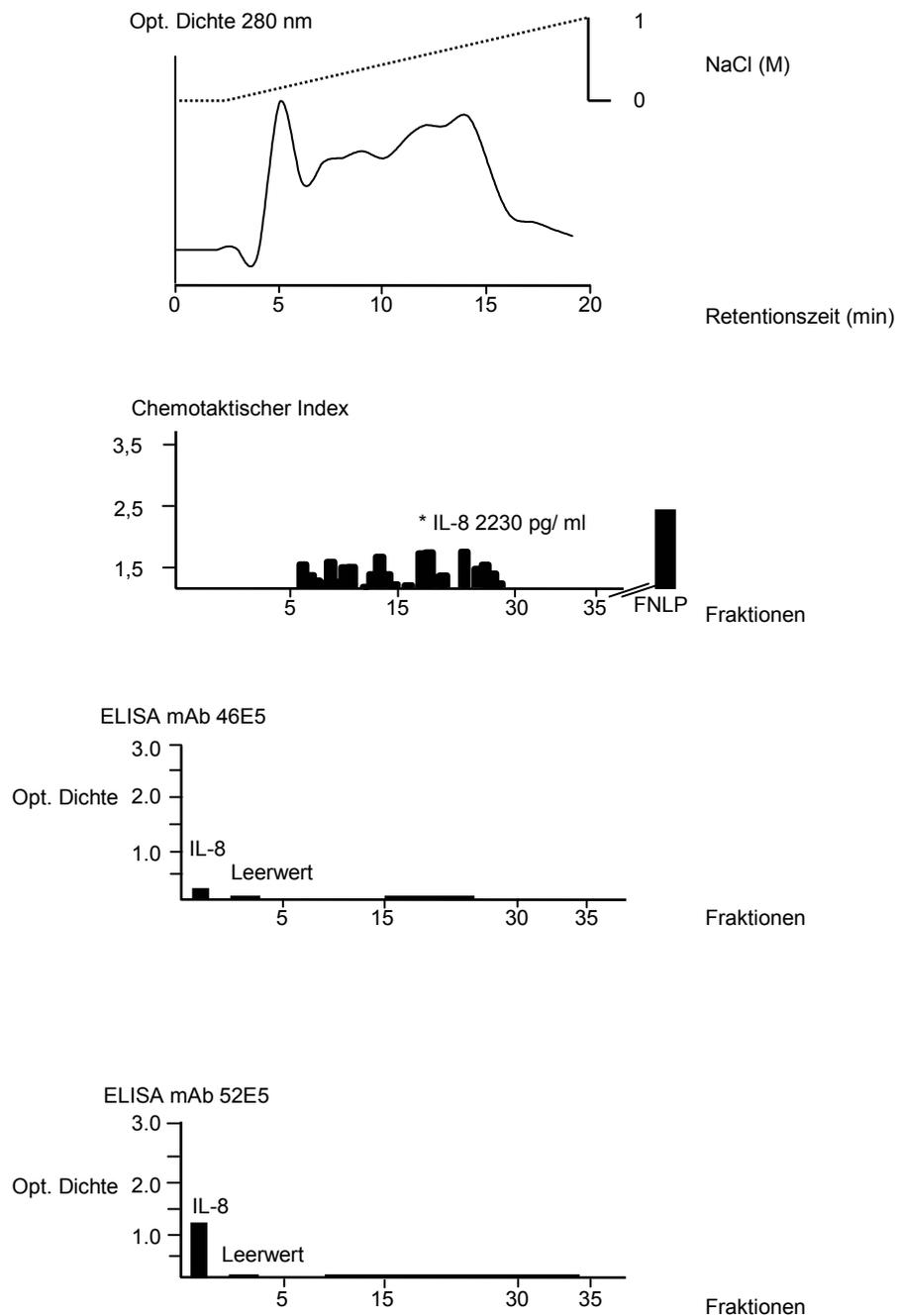


Abb. 3.3.4. Mono-S- und RP-8-HPLC gereinigte Nasenpolypenextrakte mit niedriger neutrophilen-chemotaktischer Aktivität

Das Diagramm zeigt zum einen das Chromatogramm der biologisch aktiven Fraktion 15 des RP-8 Lauf, hier erneut mittels Mono-S-Säule aufgetrennt. Zum anderen wurde der chemotaktische Index bestimmt, der in den Fraktionen 19-21 größer 1,5 war; in dem daraufhin durchgeführten quantitativen ELISA wurde IL-8 in einer Konzentration von 2230 pg/ ml nachgewiesen.

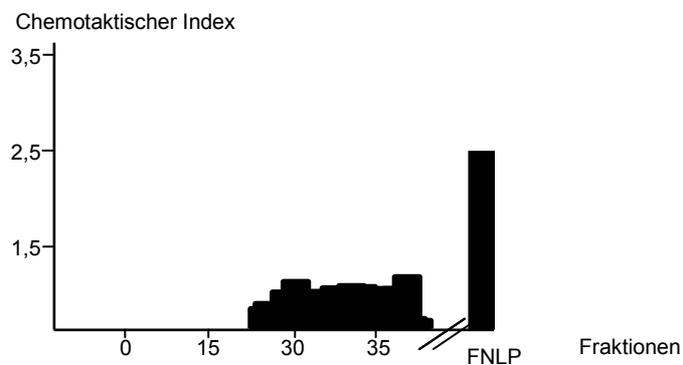
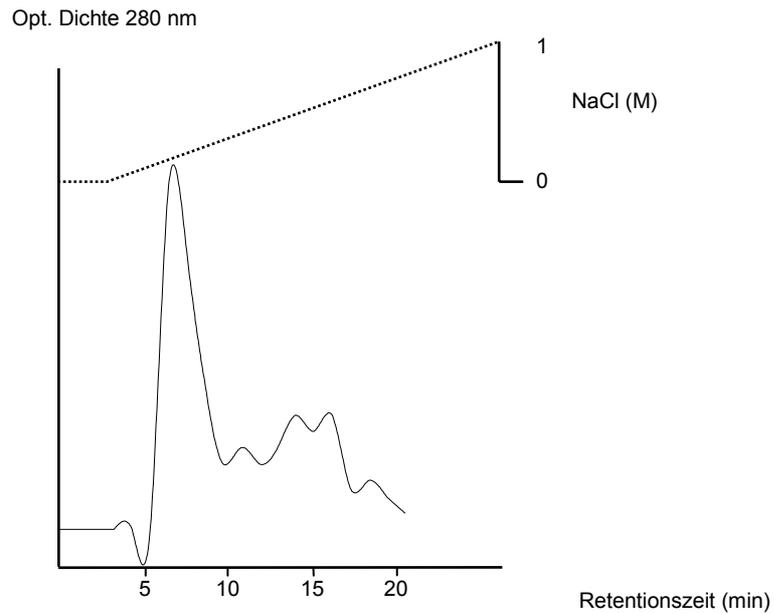


Abb. 3.3.5. Mono-S- und RP-8-HPLC-gereinigte Nasenpolypenextrakte mit neutrophilen-chemotaktischer Aktivität

Das Diagramm zeigt zum einen das Chromatogramm der biologisch aktiven Fraktionen 16-17 aus dem RP-8 Lauf, hier mittels Mono-S-Säule erneut aufgetrennt. Zum anderen ist der chemotaktische Index der aufgefangenen Fraktionen eingezeichnet, der fast 40 % der Positivkontrolle ausmacht. Die Immunreaktivitätstestung für IL-8 und GRO- α lag unter der Nachweisgrenze und ist deshalb nicht aufgeführt.

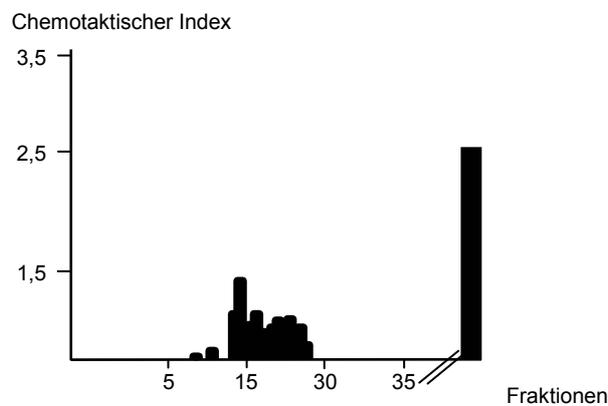
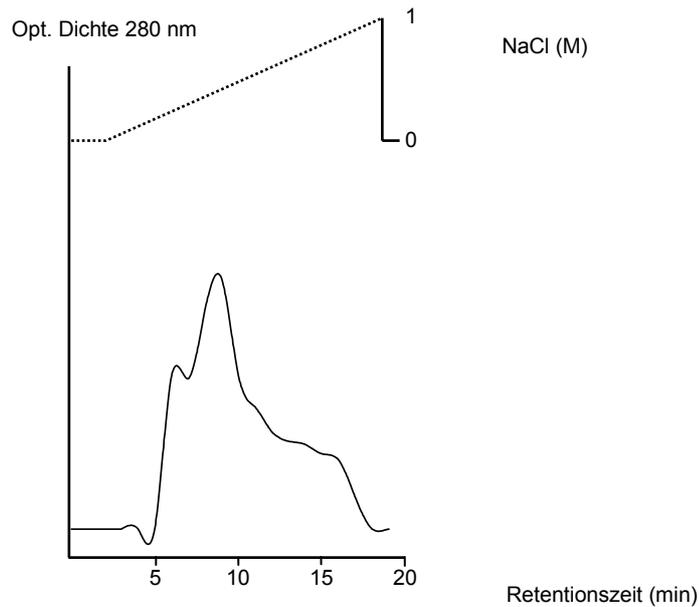


Abb. 3.3.6. Mono-S- und RP-8-HPLC-gereinigte Nasenpolypenextrakte mit neutrophilen-chemotaktischer Aktivität

Das Diagramm zeigt zum einen das Chromatogramm der biologisch aktiven Fraktion 20-25 aus dem RP-8 Lauf, hier erneut mittels Mono-S-Säule aufgetrennt. Zum anderen ist der chemotaktische Index der aufgefangenen Fraktion eingezeichnet, der ca. 50 % der Positivkontrolle ausmacht. Die Immunoreaktivitätstestung für IL-8 und GRO- α lag unter der Nachweisgrenze und ist deshalb nicht aufgeführt.

Insgesamt ließen sich mittels Festphasen-ELISA mit den spezifischen Antikörpern mAB 46E5 und 52E8 folgende Ergebnisse ermitteln:

<i>Antikörper (mAb)</i>	<i>Positivkontr. IL-8 (5 ng)</i>	<i>Negativkontr. (Leerwert)</i>	<i>Polypengewebe</i>	<i>Muschelgewebe</i>
46E5 (β -TG- AG)	-	-	+	-
52 E8 (IL-8)	+	-	-	-

3.4. Identifizierung des NAP-2 und seiner biologischen Aktivität in den HPLC-Fractionen

Die Proteinfractionen der Nasenpolypenextrakte, die nach den HPLC Aufreinigungen nachweisbar neutrophilen-chemotaktische Aktivität enthielten, wurden für die weitere Verarbeitung zunächst lyophilisiert. Mit Hilfe eines Festphasen-ELISA Systems konnten die in diesen Proben enthaltenen Chemotaxine identifiziert und ihre biologische Relevanz mittels eines Chemotaxis-Inhibitionstests verifiziert werden.

3.4.1. Festphasen-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Die biologisch aktiven Fraktionen der Mono-S Säulenpräparate wurden mit den beiden monoklonalen Antikörpern mAb 46E5 und mAb 52E8 inkubiert, um sowohl die Immunreaktivität mit IL-8 als auch β -Thromboglobulin nachweisen zu können. Nur die Fraktionen 28-33 der aufgereinigten Mono-S Extrakte der ehemaligen RP-8 Fraktionen 10-11 zeigten neben einer stark ausgeprägten chemotaktischen Aktivität eine positive Immunreaktion auf β -Thromboglobulin

(Abb. 3.3.1.). Der monoklonale Antikörper mAb 46E5 besitzt eine universelle Kreuzreaktivität gegenüber allen bekannten Varianten des β -Thromboglobulins und ist daher indirekt auch geeignet, eine Immunreaktivität gegenüber NAP-2 nachzuweisen, das eine proteolytisch gespaltene, trunkierte Isoform des β -Thromboglobulin darstellt. mAb 46E5 wurde auch deshalb verwendet, da spezifische NAP-2 Antikörper nicht kommerziell erhältlich sind¹¹³. Alle Läufe mit Nasenmuschelgewebe wurden ebenfalls mit den beiden Antikörpern mAb 46E5 und mAb 52E8 im Festphasenansatz getestet. Eine Immunreaktion gegen β -Thromboglobulin konnte mit diesen beiden Antikörpern nicht nachgewiesen werden.

3.4.2. Sandwich-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Die Kationenaustausch-Chromatographie getesteten Nasenmuschel- und Nasenpolypenfraktionen, deren chemotaktischer Index größer als 1,5 betrug, die jedoch keine Reaktion im Festphasen-ELISA zeigten, wurden durch einen spezifischen Sandwich-ELISA quantitativ untersucht, um die Konzentrationen von IL-8 und Gro- α ermitteln zu können. Die Ergebnisse sind den Abbildungen 3.2.2. und 3.2.3. bzw. 3.3.2 bis 3.3.4 zu entnehmen.

3.5. Chemotaxis-Inhibitionstest

Zur Überprüfung, ob es sich bei dem im Festphasen-ELISA für Polypengewebe identifizierten Mitglied der β -Thromboglobulin-Antigen-Familie um NAP-2 handelt, wurde die für dieses Chemokin typische starke biologische Aktivität auf neutrophile Granulozyten mittels eines Chemotaxis-Inhibitionstest unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers mAB C24 getestet. Dieser Antikörper reagiert, genau wie auch mAB 46E5, auf alle bekannten molekularen Varianten der β -Thromboglobulin-Antigen-Familie. Die Verdünnungsreihe des Antikörpers, wie in Abbildung 3.5.1. dargestellt, zeigte in höheren

Konzentrationen eine fast 90%ige Blockade der Chemotaxis, wohingegen bei einer 1:100 verdünnten Dilution immer noch ca. 65% der Chemotaxis inhibiert waren.

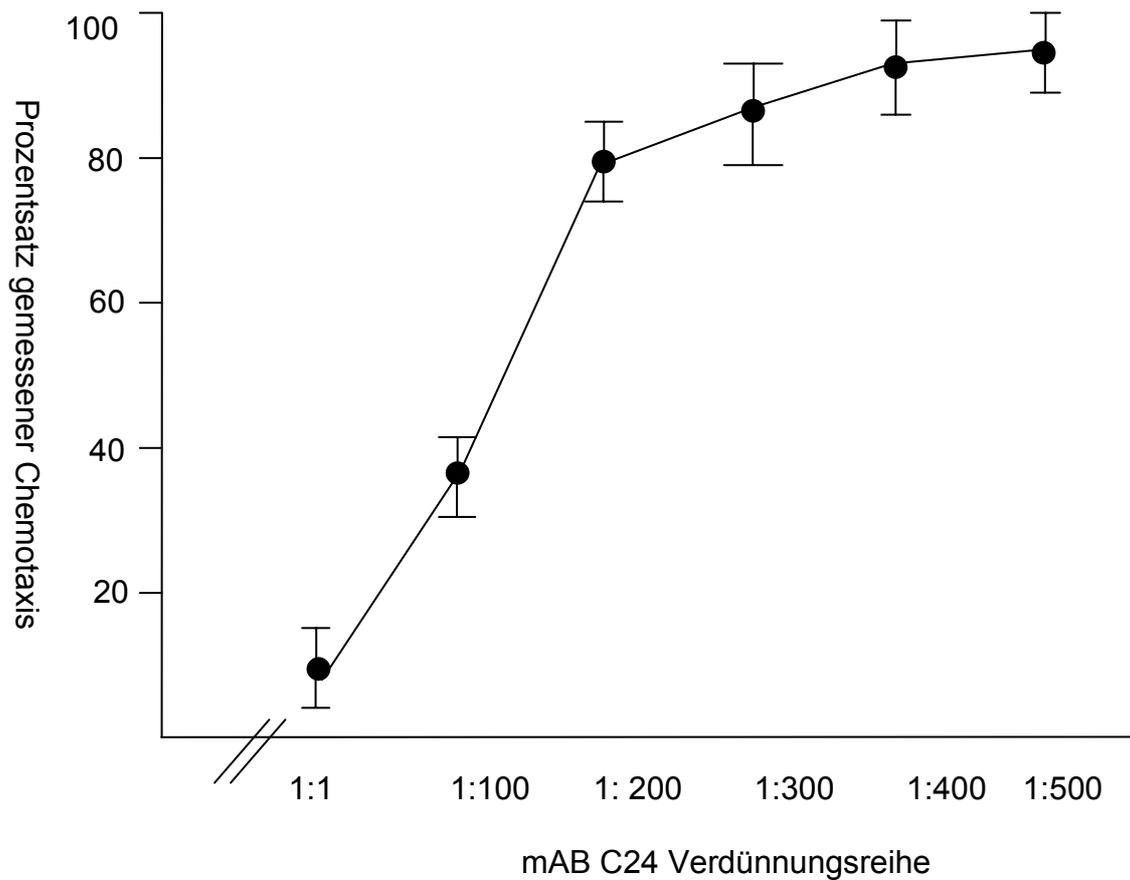


Abbildung 3.5.1. Chemotaxis-Inhibitionstest

Exemplarisch dargestellt ist die Fraktion 32 der Kationenaustauschchromatographie, getestet mit einem Probenvolumen von 60 μ l. Erkennbar ist die nahezu vollständige Hemmung der chemotaktischen Aktivität bei hohen Antikörperkonzentrationen.

4. Diskussion

Als Polyposis nasi (et sinuum) werden klinisch-diagnostisch blaß-grau gestielte Polypen im Bereich des mittleren Nasenganges, der unteren Nasenmuschel oder des Siebbeins definiert. Der Ursprung dieser Polypen wurde sowohl durch Tos⁷¹ als auch durch Stammberger¹¹¹ übereinstimmend in der Schleimhaut des mittleren Nasenganges lokalisiert. Tos konnte ferner nachweisen, daß sich die Basis der Polypen fast immer in der Nähe der cellulae ethmoidales findet; vorne zwischen Processus uncinatus und dem ethmoidalen Infundibulum und zwischen dem Processus uncinatus und der mittleren Nasenmuschel. Offensichtlich handelt es sich hierbei um die einzige Proliferationsstelle. Die Schleimhaut der unteren Nasenmuschel trägt nicht zur Polypenbildung bei³³, was eventuell durch die anatomische Prädilektion im Bereich der Sinusöffnungen des mittleren Nasenganges begründet sein könnte. Etwa 4 % der Bevölkerung leiden an einer Polyposis nasi, deren Ätiologie bislang weitgehend unbekannt ist. Diskutiert wurden unter anderem virale, bakterielle oder allergische Faktoren als Auslöser^{27 66 69 83}. Ein wesentliches Merkmal der Mehrheit aller untersuchten Polypen ist der Nachweis aktivierter, hypodenser eosinophiler Granulozyten⁵⁶. Definitionsgemäß gelten diese als aktiviert, wenn die Synthese eosinophilen-spezifischer Proteine wie ECP nachgewiesen werden kann, was auf einen erheblichen Anteil der Zellen bei Polyposis nasi zutrifft. Klinisch besteht eine klare Korrelation zwischen der Anzahl aktivierter Eosinophiler und dem Schweregrad der Erkrankung⁶. Zur Detektion aktivierter eosinophiler Granulozyten wird der monoklonale Antikörper EG2 verwendet, der mit der sezernierten Form des ECP reagiert. Den Granulozyten wird eine Rolle in der Pathogenese der Polyposis nasi beigemessen, vergleichbar der Rolle als Ziel- und Effektorzelle der Eosinophilie des Asthma bronchiale. Die Gefäßpermeabilität innerhalb des Polypengewebes könnte durch LTC₄ und LTD₄, weitere Stoffwechselprodukte der Eosinophilen, beeinflusst werden⁴⁷. Die Akkumulation Eosinophiler in der Polyposis nasi wird heute auf selektive Migrationsmechanismen unter Beteiligung chemotaktischer Proteine der C-C Familie, RANTES und Eotaxin, zurückgeführt^{4 13 14 76}.

Auch neutrophile Granulozyten besitzen Fähigkeiten analog derer der Eosinophilen. Sie sind ebenfalls zur Migration innerhalb des Gewebes, zur Exozytose zytotoxischer Proteine und zur bakteriellen Phagozytose befähigt. Elastasen, Gelatinasen und Kollagenasen können nach Aktivierung und Exozytose aus den Granula der Neutrophilen ihr zytotoxisches Potential entfalten und so eine Gewebedestruktion bewirken, entsprechend der durch Eosinophile synthetisierten Proteine^{34 61}. Neutrophile Elastase, ein neutrophilen-spezifisches Protein, konnte durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie in Nasenpolypen nachgewiesen werden⁴⁴; dies kann als Hinweis auf die Gegenwart neutrophiler Granulozyten bei der Polyposis nasi und einer damit verbundenen pathogenetischen Relevanz gewertet werden. Im Falle einer Assoziation der Polyposis nasi mit systemischen Erkrankungen wie dem Young-Syndrom, dem Kartagener-Syndrom oder der zystischen Fibrose zeigen histologisch aufgearbeitete Polypen eine vorherrschende neutrophile Infiltration des Polypengewebes^{93 107 52}. Eine besondere Stellung nimmt der antrochoanale Polyp ein, dessen Ursprung innerhalb des Sinus maxillaris liegt und der sich durch eine akzessorische Öffnung des Sinus in den Nasenraum vorwölbt; dadurch unterscheidet er sich von den klassischen Polypen. Histologisch findet sich eine Infiltration inflammatorischer Zellen, vorwiegend Neutrophiler, eine signifikante Reduktion submuköser Drüsen sowie ein Stromaödem¹⁰⁰.

Neben der Existenz panleukotaktischer Faktoren trägt offenbar die Synthese zellspezifischer Chemokine zu der selektiven Ansammlung von Leukozyten und ihrer Subpopulationen im Polypengewebe bei der Polyposis bei. Daher beschäftigt sich diese Arbeit speziell mit der Fragestellung, ob das in aufbereiteten Polypenextrakten enthaltene NAP-2 biologisch relevant für die Pathogenese der Polyposis nasi ist.

Für diese Vorgabe wurde eine spezielle Methode entwickelt, die in verschiedenen Schritten die Extraktion der Chemokine aus dem Gewebe sowie deren schrittweise Aufreinigung in neutrophilen-chemotaktische Polypeptide ermöglicht. Zudem wurde die biologische Aktivität der aufgereinigten

Polypeptide in einem Chemotaxis-Assay überprüft, die durch HPLC aufgereinigten Peptide wurden mittels verschiedener ELISA Ansätze identifiziert und ihre biologische Wirksamkeit durch einen Chemotaxis-Inhibitionstest nachgewiesen.

4.1. Neutrophilen-chemotaktische Proteine aus Nasenpolypenextrakten

Unter bestimmten Voraussetzungen kann die Migration neutrophiler Granulozyten in einem geeigneten Testsystem durch Polypeptide, die chemotaktisch und aktivierend auf Neutrophile wirken, ausgelöst und beobachtet werden. Gut untersuchte Chemokine sind die Mitglieder der C-X-C-Familie, deren Gene auf den Chromosomen 4 und 10 liegen.

Gegenwärtig sind mehr als 50 verschiedene Chemokine geklont worden, deren biologische Aktivitäten gut definiert sind und die oftmals schon im nanomolaren Bereich wirksam werden. Viele der bekannten Chemokine liegen als Dimere vor, und erst der Zerfall in Monomere bedeutet den Übergang in ihre aktive Form¹¹. Typisch für viele Mitglieder der C-X-C-Familie, die auch untereinander strukturelle Homologien aufweisen, ist das am NH₂-terminalen Ende liegende ELR-Motiv¹¹⁷. Hierbei handelt es sich um die Aminosäuresequenz Glutamin, Leucin und Arginin (Glu-Leu-Arg), die pro-angiogenetisch wirkt und deren Deletion die gegenteilige Wirkung, einen Angiogenese vermindernenden Effekt, bewirkt, wie in Untersuchungen an IP-10, PF-4 und MIG beschrieben wurde¹¹.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, daß humane neutrophile Granulozyten durch Extrakte aus Nasenpolypen chemotaktisch aktiviert werden können. Weitere Untersuchungen, die sich mit der Heparinbindungsfähigkeit der Chemotaxine beschäftigten, schlossen verschiedene andere Mediatoren, wie zum Beispiel den Komplementfaktor C5 oder Leukotrien B4, aufgrund ihrer Unfähigkeit zur Heparinbindung als mögliche Auslöser von Chemotaxis aus, da nur Chemokine heparinbindende Eigenschaften besitzen.

Durch verschiedene Prozessierungsschritte im Vorfeld der Arbeit konnten schließlich Fraktionen mit einer weit über der Positivkontrolle liegenden chemotaktischen Aktivität für neutrophile Granulozyten isoliert werden. Nach dem letzten Schritt der Chemokinaufreinigung (Kationenaustausch-Chromatographie) wurde ein Peptid mit starker neutrophilen-chemotaktischer Aktivität isoliert. Durch einen Festphasen-ELISA Ansatz, in dem die monoklonalen Antikörper mAb 46E5 und mAB 52E8 verwendet wurden, konnte eine positive Immunoreaktivität sowohl für β -Thromboglobulin als auch für IL-8 nachgewiesen werden.

β -Thromboglobulin gehört innerhalb der C-X-C Chemokinfamilie zur Untergruppe ELR negativer basischer Plättchenproteine, die jedoch nicht in der Lage sind, Neutrophile zu aktivieren, genauso wie das ebenfalls in den α -Granula der Thrombozyten gespeicherte connective tissue activating peptide III (CTAP-III, 85 AS), das eine trunkierte Form des β -TG darstellt. Sowohl CTAP-III als auch β -TG wurden als inaktive Vorläufer von Neutrophilen-aktivierenden C-X-C Chemokinen wie NAP-2 identifiziert. Der Nachweis biologisch aktiver β -Thromboglobulin positiver Fraktionen in Verbindung mit nachgewiesener Chemoattraktivität für neutrophile Granulozyten führte zu der Arbeitshypothese, daß biologisch aktives NAP-2 in Nasenpolypen vorliegen könnte. Um eine weitere Charakterisierung der NAP-2 Funktion vornehmen zu können, wurde mit Hilfe der Boydenkammern ein Chemotaxis-Neutralisationstest durchgeführt, bei dem ein weiterer Antikörper zum Einsatz kam, der freundlicherweise von E. Brandt, Immunologisches Zentrum Borstel, zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Antikörper ist gegen alle bekannten β -Thromboglobulin Formen aktiv und wurde deshalb verwendet, da zur Zeit kein spezifischer Antikörper gegen NAP-2 existiert. Das Ergebnis des Inhibitionstests bestätigte unsere Hypothese, da die hier gemessene biologische Aktivität bis zu 80% unter der in vorherigen Ansätzen ermittelten lag. Dies traf vor allem für die Reihenverdünnungen zwischen Konzentrationen von 1:1 bis 1:100 zu.

Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse der Ansätze mit Nasenmuschelgewebe, in denen nur eine sehr begrenzte biologische Aktivität nachgewiesen werden konnte, die durch die Anwesenheit von IL-8 und GRO- α gekennzeichnet war. Resultate anderer Studien, in denen durchschnittliche Konzentrationen von 69,8 pg/ ml IL-8 und 230 pg/ ml GRO- α in 0,1 g Nasenschleimhautgewebe gemessen wurden, unterstützen diese Beobachtungen⁸. Weiterhin konnte in derselben Studie kein signifikanter Unterschied bezüglich der IL-8 Konzentration in Nasenpolypengewebe und Nasenschleimhautgewebe nachgewiesen werden.

Das Neutrophilen aktivierende Peptid 2 (NAP-2) ist ein Mitglied der C-X-C-Chemokinfamilie, dessen Proteinstruktur eine 46-prozentige Homologie zu der des IL-8 (ehemals NAP-1) zeigt. Es entstammt der Familie des plättchen-basischen Proteins (PBP, Länge 94 Aminosäuren) und wird in den α -Granula der Thrombozyten synthetisiert. Durch proteolytische Spaltungen des NH₂-terminalen Endes des PBP entstehen zunächst β -Thromboglobulin (Länge 81 Aminosäuren) durch Lösung der Lys-Gly Bindung an Position 13 des PBP oder, zu einem wesentlich größeren Anteil, CTAP-III (connective tissue activating peptide III, Länge 85 Aminosäuren) nach der Spaltung einer Arg-Asn Bindung an Position 9 des PBP. In vitro nachgewiesene Fähigkeiten dieser Proteine sind unter anderem eine Steigerung der Synthese von DNA, Hyaluronsäure, Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen. Ferner werden die Glukosetransportrate und die Bildung von Prostaglandin E₂ gesteigert; eine mitogene Aktivität gegenüber Chondrozyten und verschiedene Fibroblastenzelllinien wurde ebenfalls nachgewiesen^{29 30 90}. NAP-2 (Länge 70 Aminosäuren) entsteht gleichfalls durch eine NH₂-terminale proteolytische Spaltung des PBP, indem die Tyr-Ala Bindung an Position 24 gelöst wird³². Es ist chemotaktisch für Neutrophile und bewirkt die Sekretion der azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten. Außerdem kann CTAP-III durch Proteasen, zum Beispiel die monozytäre Serinprotease, proteolytisch gespalten werden und so auch NAP-2 bilden. Verschiedene in den Granula der Thrombozyten gespeicherte Proteine beeinflussen die Aktivität der Serinprotease: Chemotrypsin, Cathepsin, Trypsin

und Neutrophilen-Elastase steigern, Thromboplasmin und Granzyme inhibieren die Aktivität der Protease^{23 28 32}. Strukturell gesehen stellt das NAP-2 also ebenfalls eine NH₂-terminal trunkierte Form des CTAP-III dar. 1993 wurde erstmals eine biologisch dreimal aktivere Isoform des NAP-2 differenziert, die aufgrund weiterer proteolytischer Spaltungen am COOH-terminalen Ende entsteht^{23 39}. Da die Meßwerte der biologischen Aktivität im Chemotaxis-Assay sehr hoch über denen des als Positivkontrolle verwendeten fNLP (N-Formyl-Nle-Leu-Phe) lagen, könnte es sich hier um eine COOH-terminal trunkierte, aktivere Isoform des NAP-2 handeln.

4.2. *Die pathogenetische Bedeutung von NAP-2 für die Polyposis nasi*

Die vorliegende Arbeit hatte die Zielsetzung, aufgereinigte Polypen- und Muschelgewebeextrakte auf ihre chemotaktische Aktivität bezüglich neutrophiler Granulozyten zu untersuchen. Hierbei wurde im Polypengewebe NAP-2 als biologisch wirksames Chemokin identifiziert. Da die Synthese von NAP-2 nur in aktivierten Thrombozyten stattfindet, könnten weitere zelluläre Quellen neutrophiler Chemokine wie Epithelien oder Fibroblasten eher eine untergeordnete Rolle in der Rekrutierung Neutrophiler bei der Polyposis nasi spielen. Die normale Funktion der Thrombozyten liegt in ihrer essentiellen Bedeutung für die Hämostase und Wundheilung⁸⁷. Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren Thrombozyten im inaktiven Zustand durch den menschlichen Blutstrom. Die Aktivierung der Thrombozyten, wie sie beispielsweise durch eine Verletzung oder eine Entzündung hervorgerufen wird, geht nicht zwangsweise mit einer Aggregation einher. Durch die Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einer Stimulation des Membranlipidstoffwechsels mit konsekutiver Steigerung der Eicosanoidsynthese, die zu einem erhöhten Spiegel des plättchenaktivierenden Faktors (PAF) und der vermehrten Bildung freier Sauerstoffradikale führt⁸⁶. Im Rahmen allergischer Entzündungen konnte neben einer Histaminliberation die Freisetzung von β -Thromboglobulin, Fibronectin, Plättchenfaktor-4, PDGF (Platelet Derived Growth Factor),

prokoagulatorischer Proteine wie der Von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin sowie verschiedener Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten nachgewiesen werden. Die Bedeutung der Thrombozyten als Entzündungszellen konnte im Tiermodell belegt werden. In diesem Versuch wurden Ratten Thrombozytenpellets subkutan injiziert, die zu Entzündungsreaktionen wie Ödembildung, Akkumulation von Myofibroblasten und auch zur Infiltration neutrophiler Granulozyten führten²⁵. Im weiteren Verlauf kann es zu einer Kontaktaufnahme zu Monozyten und Leukozyten kommen und, aufgrund der Produktion neutrophilen-chemotaktischer Stoffe, auch zu einer Aggregation von Neutrophilen. Diese wird durch die Bindung der Thrombozyten an die neutrophilen Granulozyten hervorgerufen, die durch die thrombozytäre Expression des Membran-Adhäsionsmoleküles GMP 140 (Granule Membrane Proteine 140) initiiert wird⁸⁸. Die Induktion des GMP 140 wird wahrscheinlich aufgrund der NAP-2 Synthese durch aktivierte Thrombozyten in der Polyposis nasi ermöglicht. Auf diese Art und Weise wird den Thrombozyten die direkte Kontaktaufnahme zu den Granulozyten ermöglicht. Durch P-Selektin, das bereits in Proteinform in der Endothelzelle gespeichert wird und deshalb für eine Expression kurzerhand verfügbar ist, werden die Zellen aus dem Blutstrom gefiltert und locker an die Gefäßwand gebunden^{36 40}. In der Glykokalix der Endothelzelle festliegende Chemokine wie IL-8 und GRO- α können über Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten eine Stimulation, bzw. eine Triggerung der Integrine auf die Granulozyten bewirken^{80 91 109}.

Für die Sezernierung der in den α -Granula der Thrombozyten gespeicherten Mediatoren ist es unerheblich, ob eine Aggregation stattfindet oder nicht; eine Freisetzung erfolgt in jedem Fall⁸⁶. Während der Initialphase findet zuerst die proteolytische Konversion des CTAP III durch eine Serinprotease in den Thrombozyten statt^{28 32}. NAP-2 tritt zunächst in Konzentrationen auf, die zu niedrig sind, um eine Degranulation der Neutrophilen zu bewirken. Es bindet sich jedoch an neutrophile Granulozyten und reguliert die Anzahl der CXC2 Rezeptoren auf der PMN Oberfläche herab²³. Die kontinuierliche Akkumulation von NAP-2 im weiteren Verlauf bewirkt eine zunehmende Refraktärität der

Zellen gegenüber der Stimulation durch NAP-2 oder anderen ELR positiven Chemokinen. Daher spricht man NAP-2 einen desensibilisierenden Effekt auf prozessierende Zellen zu.

Die neutrophilen Granulozyten werden nun in einem weiteren Schritt durch die Expression von ICAM-1 (Interstitial Cell Adhesion Molecule 1) fest an den Endothelverband gebunden. Die so immobilisierten Granulozyten verändern ihre Form, indem sie sich flach an den Endothelzellen ausbreiten¹²⁵. Die Endothelzellen zeigen eine histamin- und thrombininduzierte zytoskelettale Retraktion, die in der Folge zu einem lokalen Ödem führt. Für NAP-2 wird eine solche Steigerung der Gefäßpermeabilität ebenfalls beschrieben¹²⁶. Möglicherweise ist die bei neutrophilen Entzündungsreaktionen zu beobachtende Plasmaexsudation, speziell die im Gewebe von Nasenpolypen beobachtete Albuminexsudation auf diesen Aspekt zurückzuführen⁹⁷.

Aufgrund mangelnder Daten bezüglich des Migrationsverhaltens aktivierter Thrombozyten und des fehlenden histologischen Nachweises infiltrierender Thrombozyten in Nasenpolypengewebe, wird zur Zeit von einer intra- oder perivaskulären Akkumulation neutrophiler Granulozyten ausgegangen. Auf diese Hypothese hin untersuchte Histopathologien aus Polypenpräparaten boten in 29 von 30 Fällen eine vaskuläre Neutrophileninfiltration. Dieses könnte als Hinweis auf eine in den Blutgefäßen ablaufende neutrophile Entzündung dienen, die einen für eosinophile Granulozyten selektiven, transendothelialen Migrationsmechanismus induzieren oder unterstützen könnte. Erstmals gelang es im Rahmen dieser Studie, NAP-2 aus menschlichem Gewebe zu isolieren. Ferner konnte gezeigt werden, daß biologisch aktives NAP-2 über verschiedene Zwischenschritte einen Anteil an dem eosinophilen Entzündungstyp tragen kann, indem es neutrophile Granulozyten durch den Aufbau eines intravaskulären, chemotaktischen Gradienten an der transendothelialen Diapedese hindert. Da NAP-2 durch aktivierte Thrombozyten unter Zuhilfenahme einer Protease entsteht, schliessen wir daraus, daß Thrombozyten eine wichtige Rolle in der chronischen Entzündung, die sich bei

der Polyposis nasi findet, spielen. Für die lokale Entstehung von NAP-2 in Nasenpolypen spricht ebenfalls der Nachweis eines erhöhten Proteasenspiegels im Vergleich zu Nasenmuschelgewebe⁵⁷.

5. Literaturverzeichnis

1. Adams DH, Shaw S. Leukocyte-endothelial interactions and regulation of Leukocyte migration. [Review] [44 refs]. *Lancet* 1994; 343: 831 – 836
2. Agarwal S, Baran C, Piesco NP, Quintero JC, Langkamp HH, Johns LP, Chandra CS. Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 β . *Journal of Periodontal research* 1995; 30: 382 – 389
3. Ahuja SK, Murphy PM. The CXC chemokines Growth-regulated Oncogene (GRO) α , GRO β , GRO γ , Neutrophil-activating Peptide-2, and Epithelial Cell-derived Peptide –78 are potent agonists for the type B, but not the Type A, Human Interleukin-8 receptor. *Journal of Biology Chemistry* 1996 Aug; 271: 20545 – 20550
4. Alam R, Stafford S, Forsythe P, Harrison R, Faubion D, Lett-Brown MA, Grant JA. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *Journal of Immunology* 1993; 150: 3442 – 3446
5. Allen JS, Eisma R, Leonard G, La Freniere D, Kreutzer D. Interleukin-8 expression in human nasal polyps. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery* 1997 Nov; 117: 535 – 541
6. Appenroth E, Gunkel AR, Mueller H, Voelklein C, Schrott-Fischer A. Activated and non-activated eosinophils in patients with chronic rhinosinusitis. *Acta laryngologica* 1998;118:240-242
7. Bachert C, Van Cauwenberge PB. Inflammatory mechanisms in chronic sinusitis. *Acta oto-rhino-laryngologica belgica* 1997; 51: 209 – 217
8. Bachert C, Wagenmann M, Hauser U, Rudack C. IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 1999; 99: 837 – 842
9. Baggiolini M, Boulay F, Badwey JA, Curnutte JT. Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. [Review] [67 refs]. *FASEB Journal* 1993; 7: 1004 – 1010
10. Baggiolini M. Novel aspects of inflammation: interleukin-8 and related chemotactic cytokines. [Review] [30 refs]. *Clinical Investigator* 1993; 71: 812 – 814
11. Baggiolini M; Dewald B, Moser B. Human chemokines: An update. *Annual Review of Immunology* 1997; 15: 675 – 705
12. Baraniuk JN. Physiology of Sinusitis. In: Marcel Dekker, ed. In: Druce HM (ed) *Sinusitis: Pathophysiology and treatment*. New York: 1994: 19 – 39

13. Bartels J, Maune S, Meyer JE, Kulke R, Schlueter C, Roewert J, Christophers E, Schroeder JM. Increased eotaxin-mRNA expression in non-atopic and atopic nasal polyps: Comparison to RANTES and MCP-3 expression. *Rhinology* 1997; 35: 171 – 174
14. Beck LA, Dalke S, Leiferman KM, Bickel CA, Hamilton R, Rosen H, Bochner BS, Schleimer RP. Cutaneous infection of RANTES causes eosinophil recruitment: comparison of non allergic and allergic human subjects. *Journal of Immunology* 1997; 159: 2962 – 2972
15. Beck LA, Stellato C, Beall LD, Schall TJ, Leopold D, Bickel CA, Baroody F, Bochner BS, Schleimer RP. Detection of the chemokine RANTES and endothelial adhesion molecule in nasal polyps. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 1996; 98: 766 – 780
16. Bédard PA, Golds EE. Cytokine-induced expression of mRNAs for chemotactic factors in human synovial cells and fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* 1993; 154: 433 – 441
17. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. [Review] [269 refs] *Annual Review of Immunology* 1993; 11: 767 – 804
18. Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Rot A, von Tscherner V, Baggiolini M, Dahinden CA. RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. *European Journal of Immunology* 1993; 23: 761 – 767
19. Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Bastholm L, Nielsen MH, Bainton DF. Human neutrophil granules and secretory vesicles [Review] [111 refs]. *European Journal of Hematology* 1993; 51: 187 – 198
20. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barnèon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P. Eosinophilic inflammation in asthma [see comments]. *New England Journal of Medicine* 1990; 323: 1033 – 1039
21. Bozic CR, Gerard NP, Gerard C. Receptor binding specificity and pulmonary gene expression of the neutrophil-activating peptide ENA-78. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1996; 14: 302 – 308
22. Brandt E, Petersen F, Flad HD. A novel molecular variant of the neutrophil – activating peptide NAP-2 with enhanced biological activity is truncated at the c-terminus: Identification by antibodies with defined epitope specificity. *Molecular Immunology* 1993; Vol. 30 (11): 979 – 991

23. Brandt E, Van Damme J, Flad HD. Neutrophils can generate their activator neutrophil-activating peptide 2 by proteolytic cleavage of platelet-derived connective tissue-activating peptide III. *Cytokine* 1991; 3: 311 – 321
24. Brandt E, Petersen F, Flad HD. A novel molecular variant of the neutrophil-activating peptide NAP-2 with enhanced biological activity is truncated at the C-terminus: Identification by antibodies with defined epitope specificity. *Molecular Immunology* 1993; 30: 979 – 991 *Allergy and Asthma*
25. Braunstein PW, Cuenoud HF, Joris I, Majno G. Platelets, fibroblasts and inflammation: Tissue reactions to platelets injected subcutaneously. *Journal of Pathology* 1980; 99: 53 – 66
26. Broide DH, Hoffmann H, Sriramarao P. Genes that regulate eosinophilic inflammation. [Review] [33 refs]. *American Journal of Human Genetics* 1999; 65: 302 – 307
27. Calenoff E, McMahan JT, Heron GD, Kern RC, Ghadge GD, Hanson GD. Bacterial allergy in nasal polyposis. A new method for quantifying specific IgE. *Archives of Otolaryngology – Head and Neck surgery* 1993; 119: 830 – 836
28. Car BD, Baggiolini M, Walz A. Formation of neutrophil-activating peptide 2 from platelet-derived connective-tissue-activating peptide III by different tissue proteinases. *Biochemical Journal* 1991; 275: 581 – 584
29. Castor CW, Andrews PC, Swartz RD, Ellis SG, Hossler PA, Clark MR, Matteson EL, Sachter EF. Connective tissue activation. XXXVI. The origin, variety, distribution, and biologic fate of connective tissue activating peptide-III isoforms: Characteristics in patients with rheumatic, renal, and arterial disease. *Arthritis and Rheumatism* 1993; 36: 1142 – 1153
30. Castor CW, Smith EM, Hossler PA, Bignall MC, Aaron BP. Connective tissue activation. XXXV. Detection of connective tissue activating peptide-III isoforms in Synovium from Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis patients: Patterns of interaction with other synovial cytokines in cell culture. *Arthritis and Rheumatism* 1992; 35: 783 – 793
31. Chung KF. Mechanisms of bronchial inflammation in asthma: implications for therapy. [Review] [43 refs] *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 1994; 122: 288 – 293

32. Cohen AB, Stevens MD, Miller EJ, Atkinson MA, Mullenbach G. Generation of the neutrophil-activating peptide-2 by cathepsin G and cathepsin G-treated human platelets. *American Journal of Physiology* 1992; 263: L249 – L256
33. Coste A, Rateau JG, Roudot-Thoraval F, Chapelin C, Gilain L, Poron F, Peynegre R, Bernaudin JF, Escudier E. Increased epithelial cell proliferation in nasal polyps. *Archives of Otolaryngology – Head and Neck Surgery* 1996 Apr; 122(4): 432 – 436
34. Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation [Review] [130 refs]. *Inflammation Research* 1997; 46: 382 – 391
35. DeVries ME, Ran L, Kelvin DJ. On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses. [Review] [76 refs] *Seminars in Immunology* 1999; 11: 95 – 104
36. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the β_2 -Integrin CD11b/CD18. *Blood* 1998; 88: 146 – 157
37. Dombi H, Walt H. Primäre ziliäre Dyskinesie, «immotile-cilia syndrome» und Kartagener-Syndrom: Diagnostische Kriterien. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 1996; 126: 421 – 433
38. Douglass J, Dhimi D, Bulpitt M, Lindley IJ, Shute J, Church MK, Holgate ST. Intradermal challenge with interleukin-8 causes tissue oedema and neutrophil accumulation in atopic and non-atopic human subjects. *Clinical and Experimental Allergy* 1996; 26: 1371 – 1379
39. Ehlert JE, Gerdes J, Flad HD, Brandt E. Novel C-terminally truncated isoforms of the CXC chemokine β -Thromboglobulin and their impact on neutrophil functions. *Journal of Immunology* 1998; 161: 4975 – 4982
40. Elliot MJ, Finn AH. Interaction between neutrophils and endothelium. [Review] [42 refs]. *Annals of Thoracic Surgery* 1993; 56: 1503 – 1508
41. Ferreri NR, Howland WC, Stevenson DD, Spiegelberg HL. Release of leukotrienes, prostaglandines and histamine into nasal secretions of aspirin-sensitive asthmatics during reaction to aspirin. *American Review of Respiratory Disease* 1988; 137: 847 – 854
42. Finger EB, Bruehl RE, Bainton DF, Springer TA. A differential role for cell shape in neutrophil tethering and rolling on endothelial selectins under flow. *Journal of Immunology* 1996; 157: 5085 – 5096

43. Frieri M. Corticosteroid effects on cytokines and chemokines [Review] [98 refs]. *Allergy and Asthma Proceedings* 1999; 20: 147 – 159
44. Fujisawa T, Kephart GM, Gray BH, Gleich GJ. The neutrophil and chronic allergic inflammation. Immunochemical localization of neutrophil elastase. *American Review of Respiratory Disease* 1990 Mar; 141(3): 689 – 697
45. Giampiero P, Paolo B, Eleonora N, Domenico S, Giuseppe P, Giuseppina S, Giovanna F, Rita PL. Intranasal treatment with lysine acetylsalicylate in patients with nasal polyposis. *Annals of Allergy* 1991; 67: 588 – 592
46. Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. [Review] [83 refs] *Immunology today* 1995; 16: 449 – 457
47. Gleich GJ, Adolphson C, Leiferman KM. The biology of the eosinophilic leukocyte. [Review] [90 refs]. *Annual Review of Medicine* 1993; 44: 85 – 101
48. Gleich GJ, Adolphson C. Bronchial hyperreactivity and eosinophil granule proteins. [Review] [25 refs]. *Agents & Actions – Supplement* 1993; 43: 223 – 230
49. Goodman RB, Strieter RM, Frevert CW, Cummings CJ, Tekamp-Olson P, Kunkel SL, Walz A, Martin TR. Quantitative comparison of C-X-C chemokines produced by endotoxin-stimulated human alveolar macrophages. *American Journal of Physiology* 1998; 275: L87 – L95
50. Gourley DS, Whisman BA, Jorgensen NL, Martin ME, Reid MJ. Allergic Bipolaris sinusitis: Clinical and immunopathologic characteristics. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 1990; 85: 583 – 591
51. Griffin G, Krishna S. Cytokines in infectious diseases. [Review] [14 refs] *Journal of the Royal College of Physicians of London* 1998; 32: 195 – 198
52. Gugger M, Caduff JH, Straub PW. Young-Syndrom. Chronische pulmonale Infekte und Infertilität. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 1984; 114: 620 – 624
53. Gwaltney JM. Microbiology of sinusitis. IN: Marcel Dekker, ed. In: Druce HM (ed): *Sinusitis: Pathophysiology and treatment*. New York 1994: 41 – 56
54. Gysin C, Althman GA, Papsin BC. Sinonasal disease in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 2000; 30: 481 – 489

55. Habermann B, Enschedè C, Krause W. Ein Patient mit Kartagener-Syndrom. Syndrom der immotilen Zilien. Fortschritt der Medizin 1996; 27: 341 – 342
56. Hamilos DL, Nasal polyps as immunoreactive tissue [editorial]. Allergy and Asthma Proceedings 1996; 17: 293 – 296
57. Hansen I, Hansen T, Klimek L, Hörmann, Kirkpatrick CJ. Expression der Matrix-degenerierenden Zysteinproteasen Kathepsin B und K bei der Polyposis nasi. Allergologie, Jahrgang 25, Nr. 12/ 2002, 6006-612
58. Harlin SL, Ansel DG, Lane SR, Myers J, Kephart GM, Gleich GJ. A clinical and pathological study of chronic sinusitis: The role of the eosinophil. Journal of Allergy & Clinical Immunology 1988; 81: 867 – 874
59. Hellquist HB. Nasal polyps update. Histopathology. [Review] [16 refs]. Allergy and Asthma proceedings 1996 Sep – Oct; 17(5): 237 – 242
60. Hogan M, Sherry B, Ritchlin C, Fabre M, Winchester R, Cerami A, Bucala R. Differential expression of the small inducible cytokines GRO α and GRO β by synovial fibroblasts in chronic arthritis: possible role in growth regulation. Cytokine 1994; 6: 61 – 69
61. Huang W. McNeely MC. Neutrophilic tissue reactions. [Review] [183 refs]. Advances in Dermatology 1997;13: 33 – 64
62. Imaizumi T, Albertine KH, Jicha DL, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmermann GA. Human endothelial cells synthesize ENA-78: Relationship to IL-8 and to signaling of PMN adhesion. American Journal of Respiratory Cell and Molecular biology 1997; 17: 181 – 192
63. Issekutz AC, Rowter D, Springer TA. Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. Journal of Leukocyte Biology 199; 65: 117 – 126
64. Kaplan AP, Kuna P. Chemokines and the late-phase reaction. [Review] [15 refs]. Allergy 1998; 53: 27 – 32
65. Kawabori S, Denburg JA, Schwartz LB, Irani AA, Wong D, Jordana G, Evans S, Dolovich J. Histochemical and immunohistochemical characteristics of mast cells in nasal polyps. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology 1992; 6: 37 – 43
66. Keith PK, Conway M, Evans S, Wong DA, Jordana G, Pengelly D, Dolovich J. Nasal polyps: Effects of seasonal allergen exposure. Journal of Allergy & Clinical Immunology 1994; 93: 567 – 574

67. Keller HU, Hess MW, Cottier H. Granulocyte chemokinesis and chemotaxis. In: Dingle JT, Gordon JI, eds. Cellular Interactions 1. Edition. Amsterdam/ New York/ Oxford: Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, 1981: 57 – 66
68. Kellerhals B, de Uthemann B. Woake`s syndrome: the problems of infantile nasal polyps. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 1 (1979) 79-85
69. Kozak FK, Mahony JB, Chernesky MA, Newhouse MT, Dolovich J, Hitch DA, Rosmann CM. Nasal polyposis: in search of a viral etiology using DNA hybridization. Journal of Otolaryngology 1991; 20: 404 – 407
70. Kuna P, Alam R, Ruta U, Gorski P. RANTES induces nasal mucosal inflammation rich in eosinophils, basophils, and lymphocytes in vivo. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1998; 157: 873 – 879
71. Larsen PL, Tingsgaard PK, Harcourt J, Sofsrud G, Tos M. Nasal polyps and their relation to Polyps/ Hypertrophic Polypoid Mucosa in the Paranasal Sinuses: A Macro-, Endo- and Microscopic Study of Autopsy Materials. American Journal of Rhinology 1998; 12: 45 – 51
72. Larsen PL, Tos M. Site of origin of nasal polyps. Transcranially removed naso-ethmoidal blocks as a screening method for nasal polyps in autopsy materials. Rhinology 1995; 33: 185 – 188
73. Liu CM, Shun CT, Hsu MM. Lymphocyte subsets and antigen-specific IgE antibody in nasal polyps. Annals of Allergy 1994; 72: 19 – 24
74. Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL, Chensue SW, Burdick MD, Evanoff HL, Strieter RM. Mast cells produce ENA-78, which can function as a potent neutrophil chemoattractant during allergic airway inflammation. Journal of Leukocyte Biology 1998; 63: 746 – 751
75. Lukacs NW, Kunkel SL. Chemokines and their role in disease. [Review] [42 refs]. International Journal of Clinical and Laboratory Research 1998; 28: 91 – 95
76. Meyer JE, Berner I, Teran LM, Bartels J, Sticherling M, Schroeder JM, Maune S. RANTES production by cytokine-stimulated nasal fibroblasts: Its inhibition by glucocorticoids. International Archives of Allergy and Immunology 1998; 117: 60 – 67
77. Moneret-Vautrin DA, Hsieh V, Wayoff M, Guyot JL, Mouton C, Maria Y. Nonallergic rhinitis with eosinophilia syndrome as a precursor of the triad: nasal polyposis, intrinsic asthma, and intolerance to aspirin. Annals of Allergy 1990; 64: 513 – 518

78. Morita E, Yamada S, Kimura I, Nakamura K, Sugita Y, Yamamoto S. Interleukin-8 production from cultured human dermal fibroblasts by stimulation with supernatant of cultured human epidermal cells. *Skin pharmacology* 1993; 6: 161 – 169
79. Moser B, Clark-Lewis I, Zwahlen R, Baggiolini M. Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity. *Journal of Experimental Medicine* 1990; 171: 1797 – 1802
80. Munro JM, Lo SK, Corless C, Robertson MJ, Lee NC, Barnhill RL, Weinberg DS, Bevilacqua MP. Expression of Sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes, lymphoid tissues. *American Journal of Pathology* 1992; 141: 1397 – 1408
81. Murakami K, Ueno A, Yamanouchi K, Kondo T. Thrombin induces GRO α / MGSA production in human umbilical vein endothelial cells. *Thrombosis Research* 1995; 79: 387 – 394
82. Mygind N. Nasal polyposis [editorial] *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 1990; 86: 827 – 829
83. Norlander T, Fukami M, Westrin KM, Stierna P, Carlsoeoe B. Formation of mucosal polyps in the nasal and maxillary sinus cavities by infection. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery* 1993 Sep; 109 (3 Pt 1): 522 – 529
84. Odake H, Koizumi F, Hatakeyama S, Furuta I, Makagawa H. Production of Cytokines belonging to the interleukin-8 family by human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 β in culture. *Experimental and Molecular Pathology* 1993; 58: 14 – 24
85. Otsuka H, Ohkubo K, Seki H, Ohnishi M, Fujikura T. Mast cell quantitation in nasal polyps, sinus mucosa and nasal turbinate mucosa. *Journal of Laryngology and Otology* 1993; 107 (5): 418 – 422
86. Page CP. Platelet activation [editorial] {Review} [21 refs]. *Journal of Lipid Mediators* 1991; 4: 1 – 4
87. Page CP. Platelets and Asthma. [Review] [89 refs]. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1991; 629: 38 – 43
88. Parmentier S, Kaplan C, Catimel B, McGregor JL. New families of adhesion molecules play a vital role in platelet functions. [Review] [9 refs] *Immunology today* 1990; 11: 225 – 227
89. Proost P, Wuyts A, Van Damme J. The role of chemokines in inflammation. [Review] [116 refs]. *International Journal of Clinical and Laboratory Research* 1996; 26: 211 – 223

90. Reddigari SR, Kuna P, Miragliotta GF, Kornfeld D, Baeza ML, Castor CW, Kaplan AP. Connective tissue-activating peptide III and its derivative, neutrophil-activating peptide-2, release histamine from human basophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1992; 89: 666 – 672
91. Rot A. Binding of neutrophil attractant/ activation protein-1 (Interleukin 8) to resident dermal cells. *Cytokine* 1992; 4: 347 – 352
92. Rott HD, Warnatz H, Pasch-Hilgers R, Weikl A. Kartagener`s Syndrome in Sibs: Clinical and immunological investigations. *Human Genetics* 1978; 43: 1 – 11
93. Rowe-Jones JM, Shembekar M, Trendell-Smith N, Mackay IS. Polypoidal rhinosinusitis in cystic fibrosis: a clinical and histopathological study. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences* 1997; 22(2): 167 – 171
94. Rowe-Jones JM, Trendell-Smith N, Shembekar M, Mackay IS. Polypoid rhinosinusitis in patients with host defence deficiencies: Cellular infiltration and disease severity. *Rhinology* 1997; 35: 113 – 117
95. Rudack C, Bachert C, Stoll W. Effect of prednisolone on cytokine synthesis in nasal polyps. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 1999; 19: 1031 – 1035
96. Rudack C, Bachert C. Cytokines und Chemokine bei Nasennebenhöhlenerkrankungen. *Laryngo-Rhino-Otologie* 1999; 78: 481 – 490
97. Rudack C, Bruckner P, Stoll W. Collagen synthesis is upregulated in nasal polyposis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999; 103 (1) 952, Part 2, Suppl. S: S248 – S248
98. Rudack C, Hauser U, Stoll W. Einfluß von Zytokinen und Fibroblasten auf die Überlebenszeit eosinophiler Granulozyten bei der Polyposis nasi. *Laryngo-Rhino-Otologie* 1999; 78: 378 – 381
99. Rudack C, Hauser U, Wagenmann M, Bachert C, Ganzer U. Cytokine profile in various types of rhinosinusitis [German]. *Laryngo-Rhino-Otologie* 1998; 77: 34 – 37
100. Rudack C, Stoll W, Bachert C. Cytokines in nasal polyposis, acute and chronic sinusitis. *American Journal of Rhinology* 1998; 12: 383 – 388
101. Ruhno J, Howie K, Anderson M, Andersson B, Vanzielegem M, Hitch D, Lapp P, Denburg J, Dolovich J. The increased number of epithelial mast cells in nasal polyps and adjacent turbinates is not allergy-dependent. *Allergy* 1990; 45: 370 – 374

102. Schroeder JM, Persoon NL, Christophers E. Lipopolysaccharide-stimulated human monocytes secrete, apart from neutrophil-activating peptide 1/ Interleukin 8, a second neutrophil-activating protein. *Journal of Experimental Medicine* 1990; 171: 1091 – 1100
103. Schweizer RC, Welmers BA, Raaijmakers JA, Zanen P, Lammers JW, Koenderman L. RANTES- and interleukin-8- induced responses in normal human eosinophils: Effects of priming with interleukin-5. *Blood* 1994; 83: 3697 – 3704
104. Schwietz LA, Gourley DS. Allergic Fungal Sinusitis [Review] [16 refs]. *Allergy Proceedings* 1992; 13: 3 – 6
105. Setsuko M, Nakamura H. Inflammatory cells in nasal mucosa and nasal polyps. *Auris nasus larynx* 2000; 27: 59 – 64
106. Settupane GA, Klein DE, Settupane RJ. Nasal polyps. State of the art. [Review] [10 refs]. *Rhinology – Supplement* 1991; 11: 33 – 36
107. Settupane GA. Epidemiology of Nasal Polyps [Review] [32 refs]. *Allergy & Asthma Proceedings* 1996; 17: 231 – 236
108. Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *Journal of Immunology* 1997; 158: 3902 – 3908
109. Smith WB, Gamble JR, Clark-Lewis I, Vadas MA. Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 1991; 72: 65 – 72
110. Sozzani S, Locati M, Allavena P, Van Damme J, Mantovani A. Chemokines: A superfamily of chemotactic cytokines. [Review] [166 refs]. *International Journal of Clinical and Laboratory Research* 1996; 26: 69 – 82
111. Stammberger H, Posawetz W. Functional endoscopic sinus surgery. Concept, indications and results of the Messerklinger technique. [Review] [40 refs] *European Archives of Otorhinolaryngology* 1990; 247: 63 – 76
112. Sterbefälle nach Todesursache 1997. Statistisches Bundesamt, Statistisches Jahrbuch 1999
113. Sticherling M, Schroeder JM, Cristophers E. Production and characterization of monoclonal antibodies against the novel neutrophil activating peptide NAP/ IL-8. *Journal of Immunology* 1989 Sept; 143: 1628 – 1634

114. Stoop AE, van der Heijden HA, Biewenga J, van der Baan S. Clinical aspects and distribution of immunologically active cells in the nasal mucosa of patients with nasal polyps after endoscopic sinus surgery and treatment with topical corticosteroids. *European Archives of Otorhinolaryngology* 1992; 249 (6): 313 – 317
115. Stoop AE, van der Heijden HA, Biewenga J, van der Baan S. Eosinophils in nasal polyps and nasal mucosa: An immunohistochemical study. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 1993 Feb; 91(2): 616 – 622
116. Stoop AE, van der Heijden HA, Biewenga J, van der Baan S. Lymphocytes and nonlymphoid cells in human nasal polyps. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1997 Feb; 87 (2): 470 – 476
117. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriot D et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 27348 – 27357
118. Tettelbach W, Nanney L, Ellis D, King L, Richmond A. Localization of MGSA/ GRO protein in cutaneous lesions. *Journal of Cutaneous Pathology* 1993; 20: 259 – 266
119. Thelen M, Dewald B, Baggiolini M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. [Review] [417 refs]. *Physiological Reviews* 1993; 73: 797 – 821
120. Tingsgaard PK, Larsen PL, Bock T, Lange Vejlsgaard G, Tos M. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on the vascular endothelium in nasal polyps before, during and after topical glucocorticoid treatment. *Acta otolaryngologica* 1998; 118: 404 – 408
121. Tos M, Sasaki Y, Ohnishi M, Larsen P, Drake-Lee AB. Fireside conference 2. Pathogenesis of nasal polyps. *Rhinology supplement* 1992; 14: 181 – 185
122. Trittel C, Moeller J, Euler HH, Werner JA. Das Churg-Strauss-Syndrom. Eine Differentialdiagnose bei chronisch polypöser Sinusitis. *Laryngo-Rhino-Otologie* 1995; 74: 577 – 580
123. Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G. The MCP/ Eotaxin subfamily of CC chemokines. [Review] [245 refs]. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 1999; 10: 61 – 86
124. Van Damme J, Wuyts A, Froyen G, Van Coillie E, Struyf S, Billiau A, Proost P, Wang JM, Opdenakker G. Granulocyte chemotactic protein-2 and related CXC chemokines: from gene regulation to receptor usage. [Review] [21 refs] *Journal of Leukocyte Biology* 1997; 62: 563 – 569

125. Van Lint J, Van Damme J, Billiau A, Merlevede W, Vandenheede JR. Interleukin-8 activates microtubule-associated protein 2 Kinase (ERK1) in human neutrophils. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1993; 127/128: 171 – 177
126. Van Osselaer N, Van Damme J, Rampart M, Herman AG. Increased microvascular permeability in vivo in response to intradermal injection of neutrophil-activating protein (NAP-2) in rabbit skin: *American Journal of Pathology* 1991; 138: 23 – 27
127. Vancheri C, Ohtoshi T, Cox G, Xaubet A, Abrams JS, Gauldie J, Dolovich J, Denburg J, Jordana M. Neutrophilic differentiation induced by human upper airway Fibroblast-derived Granulocyte/ Macrophage Colony-stimulating factor (GM-CSF) *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1991; 4: 11 – 17
128. Walz A, Schmutz P, Mueller C, Schnyder-Candrian S. Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease. [Review] [59 refs]. *Journal of Leukocyte Biology* 1997; 62: 604 – 611(127)
129. Walz A, Strieter RM, Schnyder S. Neutrophil-activating peptide ENA-78. [Review] [37 refs] *Advances in Experimental Medicine & Biology* 1993; 351: 129 – 137
130. Zeitz HJ. Bronchial Asthma, nasal polyps, and aspirin sensitivity: Samter's Syndrome [Review] [100 refs]. *Clinic in Chest Medicine* 1988 Dec; 9 (4): 567 – 576

Danksagung

An erster Stelle gebührt meiner akademischen Lehrerin, Frau Priv.-Doz. Dr. med. C. Rudack, mein ganz besonderer Dank. Sie hat mir während meiner wissenschaftlichen Ausbildung stets hilfreich zur Seite gestanden.

Herrn Prof. Dr. med. W. Stoll, Leiter der Abteilung für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Westfälischen Wilhelms-Universität, bin ich zu großem Dank verpflichtet wegen seiner stetigen, engagierten Hilfestellung in Planung, Durchführung und Beurteilung aller im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit entstehenden Fragestellungen und Probleme. Mein besonderer Dank gilt ferner Frau A. Dietrich aus dem Labor der HNO-Klinik, die mich bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit unterstützte.

Lebenslauf

Name: Timur Nils Sellmann
Adresse: Gneisenastr. 93
47057 Duisburg
Tel.: +49 - 203-3938150
+49 - 179-7992828

Geburtsdatum: 25.12.1974
Geburtsort: Essen
Familienstand: ledig
Nationalität: Deutscher
Eltern: Dr. med. Peter Sellmann, Facharzt für
Allergologie und Pulmonologie
Maria Elisabeth Sellmann-Jesse, geb. Jesse,
Krankenschwester

Ausbildung und Abschlüsse

August 1985- Juni 1994 Maria-Wächtler-Schule, Gymnasium mit
bilinguaem deutsch-englischen Sprachzweig,
Essen, Abitur, Note 1,9

Oktober 1994- Dezember 1995 Zivildienst als Rettungssanitäter bei der
Johanniter-Unfall-Hilfe, Kreisverband Essen

April 1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an
der Philipps-Universität, Marburg

März 1998 Ärztliche Vorprüfung / Physikum, Note 1,66

Oktober 1998 Wechsel an die Westfälische Wilhelms-
Universität, Münster

August 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung/
Erstes Staatsexamen, Note 2,0

März 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung/
Zweites Staatsexamen, Note 2,0

November 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung/
Drittes Staatsexamen, Note 2,0

Praktische Erfahrungen

Ab 1991 bis August 1994	Elisabeth-Krankenhaus Essen, Mehrmonatige Arbeit in der Pflege
März 1995 bis Dezember 1999	Universitätsklinikum Essen, Arbeit als Pflegekraft in der Abteilung für Allgemeine und Transplantations-Chirurgie
Juli 1998	Universitätsklinikum Essen, einmonatige Famulatur in der Abteilung für Unfallchirurgie
November 1998 bis Oktober 2003	Promotionsarbeit, Klinik und Poliklinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde der Universität Münster, Titel „Neutrophilen-chemotaktische Proteine in Nasenpolypen“
Februar 1999	Universitätsklinikum Münster, einmonatige Famulatur in der Abteilung für Anästhesie
März 2000	Hochgebirgsklinik Davos, Schweiz, ein- monatige Famulatur in der Abteilung für pädiatrische Pneumologie
März 2000 bis Juli 2000	Arbeit als Pflegekraft in Haus ArcA, Alten- und Rehabilitationszentrum, Appelhülsen
August 2000	St. Croix Regional Medical Center, St. Croix, Wisconsin, USA, einmonatige Famulatur in der Allgemeinmedizin, unterstützt durch die Carl-Duisberg-Stiftung
Oktober 2000 bis September 2003	Dozent für Anatomie, Biologie, Physiologie und Hygiene an der staatlichen Hebammen- schule der Universität Münster
Oktober 2001 bis Februar 2003	Tätigkeit als PJ in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Direktor Univ.-Prof. Dr. med. H. van Aken
	Arbeit als Pflegekraft und Empfangspersonal im evangelischen Wohnstift Haus Simeon, Am Berg Fidel, Münster

	Arbeit als Nachtbereitschaft im Heilpädagogischen Kinderheim Altenberge
Februar 2002 bis Juni 2002	Tätigkeit als PJ in der Abteilung für Chirurgie am Medway Maritime Hospital, Gillingham, akademisches Lehrkrankenhaus des King`s College London, unterstützt durch die Vereinte Versicherung
Juni 2002 bis Oktober 2002	Tätigkeit als PJ in der Abteilung für Innere Medizin an der Tulane School of Medicine, New Orleans, Louisiana, USA, unterstützt durch den DFA.
Seit Februar 2003	Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin am evangelischen Krankenhaus Bethesda Duisburg, Leitung Prof. Dr. med. J. Meyer
Seit August 2003	Dozent für Gesundheitslehre, Erste Hilfe und Anästhesie an der Hebammenschule des evangelischen Krankenhauses Bethesda, Duisburg