# „Die Rolle des neutrophilen Granulocyten innerhalb des Immunsystems, charakterisiert anhand seiner Cytokinproduktion“

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin
Anja Kristina Schröder
aus Hamburg

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Lothar Rink
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Klaus Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 2006

**Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.**

There is at bottom only one genuinely scientific treatment for all diseases,
and that is to stimulate the phagocytes.

George Bernard Shaw, *"The doctor's dilemma"*, 1906

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... I
Abkürzungsverzeichnis ..... III
1. Einleitung ..... 1
1.1. Das Immunsystem ..... 1
1.2. Die adaptive Immunität ..... 1
1.3. Die angeborene Immunität ..... 2
1.4. Granulocyten ..... 3
1.5. Cytokine ..... 9
1.6. Interleukin-1 Rezeptor Antagonist ..... 11
1.7. Interleukin-8 ..... 13
2. Zielsetzung ..... 15
3. Material und Methoden ..... 16
3.1. Material ..... 16
3.1.1. Geräte ..... 16
3.1.2. Laborbedarf ..... 17
3.1.3. Zellkulturmedien und Zusätze ..... 18
3.1.4. Stimulantien ..... 19
3.1.5. Antikörper ..... 19
3.1.6. Rekombinante Proteine ..... 20
3.1.7. Molekularbiologische Reagenzien ..... 20
3.1.8. Kommerziell erhältliche Kits ..... 20
3.1.9. Sonstige Reagenzien ..... 21
3.2. Methoden ..... 23
3.2.1. Zellbiologische Methoden ..... 23
3.2.1.1. Isolierung von neutrophilen Granulocyten ..... 23
3.2.1.2. Isolierung von mononucleären Zellen des peripheren Blutes ..... 25
3.2.1.3. Isolierung und Differenzierung von $CD34^+$ Stammzellen ..... 26
3.2.1.4. Kultivierung und Stimulation der Zellen ..... 29
3.2.1.5. May-Grünwald-Giemsa Färbung ..... 30
3.2.1.6. Subzelluläre Fraktionierung ..... 31
3.2.1.7. Proteinsynthesemessung mit $^{35}S$ ..... 35
3.2.2. Proteinchemische Methoden ..... 36
3.2.2.1. ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay) ..... 36
3.2.2.2. Probenaufbereitung für die Gelelektrophorese und Westernblot ..... 37
3.2.2.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese ..... 39
3.2.2.4. Western Blotting und Detektion ..... 41
3.2.3. Molekularbiologische Methoden ..... 44
3.2.3.1. RNA-Isolierung ..... 44
3.2.3.2. Bestimmung des RNA-Gehaltes ..... 46
3.2.3.3. Reverse Transkription (cDNA Synthese) ..... 46
3.2.3.4. Real-time PCR (Echtzeit-Polymerasekettenreaktion) ..... 47
3.2.4. Immunologische Methoden ..... 50
3.2.4.1. Durchflußcytometrische Analyse von Oberflächenantigenen ..... 50
3.2.4.2. Intrazelluläre Färbung von Cytokinen in Neutrophilen ..... 52
3.2.4.3. Immunpräzipitation von $^{35}S$-markiertem IL-1RA und IL-8 ..... 54

4. Ergebnisse ..... 56
4.1. Cytokinproduktion von neutrophilen Granulocyten ..... 57
4.1.1. Reinheitskontrolle der Neutrophilen-Präparationen ..... 57
4.1.2. Untersuchung der Cytokinproduktion im Zellkulturüberstand ..... 58
4.1.3. Cytokinnachweis im Lysat von neutrophilen Granulocyten ..... 59
4.1.4. Subzelluläre Lokalisation der gefundenen Cytokine ..... 62
4.1.5. Relative Quantifizierung der Cytokin-mRNAs ..... 64
*4.1.6.* *De novo* Synthese von IL-1RA und IL-8 ..... 67
4.1.7. Intrazelluläre Färbung von IL-8 in unstimulierten PMN ..... 69
4.1.8. Cytokinausschüttung nach Ligation von CD66b ..... 70
4.1.9. *De novo* Synthese von IL-1RA nach CD66b-Ligation ..... 72
4.1.10. Relative Quantifizierung der Cytokin mRNAs nach CD66b-Ligation ..... 73
4.1.11. Vitalfärbung nach CD66b-Ligation ..... 75
4.2. Cytokinproduktion von PMN aus $CD34^+$ Stammzellen ..... 77
4.2.1. Differenzierung von $CD34^+$ Stammzellen in Neutrophile ..... 77
4.2.2. Cytokinproduktion der differenzierten Zellen ..... 79
5. Diskussion ..... 81
6. Zusammenfassung ..... 91
7. Literatur ..... 92
Eigene Publikationen ..... 106
Lebenslauf ..... 107
Danksagung ..... 108

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| APS | Ammoniumpersulfat |
| $ATPNa_2$ | Adenosintriphosphat (Natriumsalz) |
| BSA | Rinderserumalbumin *(bovine serum albumine)* |
| CD | Differenzierungsmarker *(cluster of differentiation)* |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure *(complementary deoxyribonucleic acid)* |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure *(deoxyribonucleic acid)* |
| dNTP | 2´-Desoxy-Nukleosid-5´-Triphosphat *(2'-deoxynucleotide-5'-triphosphate)* |
| DTT | Dithiotreitol |
| ELISA | Enzymgekoppelter Immunosorbenstest *(enzyme-linked immunosorbent assay)* |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N´,N´-tetraacetat |
| FACS | Durchflußcytometer *(fluorescence activated cell sorting)* |
| FCS | fetales Kälberserum *(fetal calf serum)* |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FRET | (Förster-) Fluoreszenz Resonanz Energietransfer |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase |
| GF | Wachstumsfaktor *(growth factor)* |
| G-CSF | Granulocyten-koloniestimulierender Faktor *(granulocyte colony stimulating factor)* |
| GM-CSF | Granulocyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor *(granulocyte macrophage colony stimulating factor)* |
| HBSS | Hanks Puffer *(Hanks' balanced salts solution)* |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure |
| HES | Hydroxyethylstärke |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |

| | |
|---|---|
| IL | Interleukin |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KRG | Krebs-Ringer-Phosphat mit Glucose |
| Kontr. | Kontrollansatz |
| LAD | Leukocytenadhäsionsdefizienz |
| LF | Lactoferrin |
| LFA | Lymphocyten funktionsassoziiertes Antigen |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MACS | Magnetische Zellpräparation (*Magnetic cell sorting)* |
| $MgCl_2$ | Magnesiumchlorid |
| MPO | Myeloperoxidase |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure *(messenger ribonucleic acid)* |
| M-CSF | Makrophagen-koloniestimulierender Faktor *(macrophage colony stimulating factor)* |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NK-Zelle | Natürliche Killerzelle |
| PBMC | Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes *(peripheral blood mononuclear cells)* |
| PBS | Phosphatpuffer *(phosphate buffered saline)* |
| PCR | Polymerasekettenreaktion *(polymerase chain reaction)* |
| PE | Phycoerythrin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PIPES | 1,4-Piperazindiethansulfonsäure |
| PMN | Polymorphkerniger Neutrophiler |
| PMSF | Phenylmethansulfonyl Fluorid |
| RA | Rezeptor Antagonist |
| RmT | Raumtemperatur |
| RNA | Ribonukleinsäure *(ribonucleic acid)* |
| RT | Reverse Transkription |
| s | sezerniert |
| SDS | Natriumdodecylsulfat *(sodium dodecylsulfate)* |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |

| | |
|---|---|
| Taq-Polymerase | *Thermus aquaticus*-DNA-Polymerase |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TEMED | N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TrisBase | Tris(hydroxymethyl-)-aminomethan |
| TrisHCl | Tris(hydroxymethyl-)-aminomethan-hydrochlorid |
| U | Units |

# 1. Einleitung

## *1.1. Das Immunsystem*

Das Immunsystem des Menschen ist ein wirkungsvolles Netzwerk aus spezialisierten Geweben, Zellen und löslichen Proteinen. Es bekämpft laufend die eingedrungenen Pathogene, so dass Infektionen - gemessen an der Zahl der auf den Körper einwirkenden Krankheitserreger - außerordentlich selten sind und meist harmlos verlaufen. Man unterscheidet die spezifische oder adaptive Immunität, die erst im Laufe des Lebens ausreift, von der unspezifischen, angeborenen Immunität. Beide wirken bei der Infektionsabwehr sowohl einzeln als auch synergistisch.

## *1.2. Die adaptive Immunität*

Die zellulären Bestandteile des adaptiven Immunsystems, die T- und B-Zellen, können über membranständige Rezeptoren Antigene erkennen. Die Gene für diese Rezeptoren liegen im Genom als einzelne Segmente vor. Durch somatische Rekombination in den reifenden Zellen entsteht eine große Vielfalt an Rezeptoren (Janeway et al., 2002). Ein einzelner Lymphocyt exprimiert dabei jeweils nur eine Rezeptorspezifität (alleler Ausschluss). Da jeder Mensch jedoch über eine große Anzahl an zirkulierenden Lymphocyten verfügt und die pluripotenten Stammzellen im Knochenmark immer neue Zellen produzieren, ergibt sich so die Möglichkeit auf überaus viele verschiedene Antigene zu reagieren.

Als Reaktion auf die Bindung eines Antigens proliferiert die jeweilige Zelle, so dass es zu einer klonalen Expansion kommt: der Klon, der das Antigen gut bindet, vermehrt sich stark. Im Verlauf der Immunantwort differenzieren sich die Lymphocyten dann zu ihren endgültigen Funktionen. B-Lymphocyten reifen zu Plasmazellen, die in hohem Maße Antikörper einer Antigenspezifität produzieren und sezernieren (Abbas et al., 1996). Die reifen T-Zellen lassen sich in zwei Subpopulationen unterteilen: T-Helferzellen nehmen Koordinationsaufgaben wahr, während cytotoxische T-Zellen körpereigene Zellen, die virusinfiziert oder entartet sind, erkennen und töten können. Ein Teil der Zellen verlässt das Blut und wandert in lymphatische Organe, um dort als Gedächtniszellen zu persistieren.

Ein weiterer Kontakt mit einem Antigen, für das Gedächtniszellen existieren, ruft daher eine schnellere, stärkere und damit effektivere Immunantwort hervor, die sogenannte Sekundärantwort. Eine erneute Erkrankung bleibt daher aus oder die Krankheit läuft wesentlich schwächer ab. Auf diesem Effekt beruht auch die aktive Immunisierung, bei der dem Organismus abgetötete oder attenuierte Erreger bzw. Teile von diesen zugeführt werden, und der dann eine Immunität gegenüber dem infektiösen Erreger entwickelt (Janeway et al., 2002).

## *1.3. Die angeborene Immunität*

Als angeborene Immunität werden das Komplementsystem, die akute-Phase-Proteine sowie als zelluläre Bestandteile Granulocyten, Monocyten/Makrophagen, dendritische Zellen und die Natürlichen Killer-(NK-) Zellen zusammengefasst.

Das Komplement ist ein System von Plasmaproteinen, die mit Pathogenen in Wechselwirkung treten können. Analog der Blutgerinnung funktioniert auch die Aktivierung des Komplementsystems durch eine Enzymkaskade: Ein Komplementenzym, das selbst durch Spaltung seiner inaktiven Vorstufe entstanden ist, spaltet sein Substrat, ein weiteres Komplementzymogen, in seine aktive Form. Im Verlauf dieser Kaskaden entstehen zahlreiche Peptide, die zur weiteren Aktivierung und den drei Funktionsbereichen des Komplementsystems beitragen: Entzündungsvermittelnde Peptide wirken chemotaktisch und aktivierend auf Phagocyten, und sogenannte Opsonine binden an die Oberflächen von Pathogenen (opsonisieren) und vermitteln deren Phagocytose. Die terminalen Komplementbestandteile polymerisieren und formieren gemeinsam den Membranangriffskomplex, der in der Zellmembran bestimmter Erreger eine tödliche Pore bilden kann (Roitt et al., 1995).

NK-Zellen gehören zwar wie T- und B-Zellen zu den Lymphocyten, da sie jedoch keine antigenspezifischen Rezeptoren besitzen, zählt man sie zur angeborenen Immunität. Sie können anormale Zellen wie z.B. virusinfizierte Zellen oder bestimmte Tumorzellen erkennen und abtöten.

Monocyten und ein Teil der dendritischen Zellen sind wie die Granulocyten myeloischen Ursprungs. Sie können als Phagocyten Krankheitserreger aufnehmen und deren Abbauprodukte auf der Oberfläche präsentieren. Dort können T-Zellen diese Antigene erkennen und eine spezifische Immunantwort auslösen - die Zellen der angeborenen und der erworbenen Immunität interagieren miteinander.

## *1.4. Granulocyten*

Granulocyten gehören zu den Zellen des unspezifischen Immunsystems. Ihr Name bezieht sich auf die charakteristischen Granula im Cytoplasma dieser Zellen. Sie lassen sich je nach Anfärbbarkeit in die Subpopulationen basophile, eosinophile und neutrophile Granulocyten unterteilen, wobei die Neutrophilen mit über 90% den größten Teil ausmachen. Da die Granulocyten ihrerseits 60 – 70% der Gesamtleukocytenpopulation des Blutes stellen, bilden die Neutrophilen die größte und damit eine nicht zu unterschätzende Fraktion unter den Zellen des Immunsystems (Hellewell und Williams, 1994). Trotzdem sind die immunologischen Kenntnisse über diese Zellen, verglichen mit denen über T- und B-Zellen, noch verhältnismäßig gering.

Basophile und eosinophile Granulocyten dienen primär der Abwehr von Parasiten, die zu groß sind, um phagocytiert zu werden. Neutrophile Granulocyten, wegen ihres charakteristisch segmentierten Zellkerns auch als PMN (polymorphkernige Neutrophile) bezeichnet, vernichten dagegen eingedrungene Mikroorganismen vorwiegend durch Phagocytose. Sie können jedoch auch den Inhalt ihrer Granula ausschütten (degranulieren), um größere Erreger anzugreifen oder beschädigtes Gewebe aufzulösen (Hellewell und Williams, 1994).

Neutrophile sind enddifferenzierte, nicht proliferierende und äußerst kurzlebige Zellen mit nur wenig Ribosomen und endoplasmatischem Reticulum (ER), weshalb ihre Fähigkeit zur Proteinsynthese oft in Frage gestellt wurde. Ihre Halbwertszeit im Blutkreislauf beträgt nur 48 bis 72 Stunden. Um diese kurze Lebensdauer auszugleichen, werden bei einem erwachsenen Menschen pro Tag ca. $10^{11}$ Neutrophile aus dem Knochenmark ins Blut entlassen (Kirchner et al., 1993; Hellewell und Williams, 1994). Wie bei allen Zellen des Blutes sind solche Dimensionen nur mit Hilfe eines Pools aus Vorläuferzellen zu erreichen.

Durch Proliferation und fortschreitende Differenzierung entstehen aus den pluripotenten Stammzellen unter Durchlaufen der verschiedenen Vorläuferstadien im Knochenmark die reifen neutrophilen Granulocyten. Ausgehend von der Stammzelle sind die einzelnen Stadien der Granulocytenentwicklung der Myeloblast, der Promyelocyt, der Myelocyt, der Metamyelocyt, der stabkernige Granulocyt und der reife, segmentkernige Granulocyt.

Die charakteristischen Granula können das erste Mal beim Übergang vom Myeloblasten zum Promyelocyten nachgewiesen werden. Sie enthalten neben weiteren Proteinen eine Vielzahl von proteolytischen Enzymen. Nach ihrem Auftreten während der Neutrophilenreifung (Granulopoese) und ihrem Inhalt können sie grob in drei Gruppen unterteilt werden: die primären, die ihrer Anfärbbarkeit entsprechend als azurophile Granula bezeichnet werden, die sekundären (oder spezifischen) und die tertiären (oder Gelatinase-) Granula (Borregaard und Cowland, 1997). Innerhalb der drei Hauptkategorien können die Granula weiter subklassifiziert werden (Kjeldsen et al., 1999).

Die Granula werden anhand von Markerproteinen klassifiziert, die charakteristisch für den jeweiligen Granulatyp sind und in anderen Granula nicht oder nur in geringem Maße vorkommen. Ein Markerprotein für azurophile Granula ist die Myeloperoxidase. Für die spezifischen Granula ist Lactoferrin ein Markerprotein, für Gelatinase-Granula die namensgebende Gelatinase. Diese Einteilung in distinkte Kategorien ist jedoch rein willkürlich, da die unterschiedlichen Protein-Profile der Granula durch differenzierte Expression während der Granulopoese entstehen und somit eher ein Kontinuum darstellen. Granulaproteine, die während eines bestimmten Stadiums synthetisiert werden, sammeln sich in den gleichen Granula an (Faurschou et al., 2003). Diese sogenannte „targeting-by-timing hypothesis“, also die zeitliche Steuerung der Proteinverteilung auf die Granula, konnte durch Transfektion von Neutrophil-Gelatinase-assoziiertem Lipocalin (NGAL) in die promyelocytische Zelllinie HL-60 belegt werden (Le Cabec et al. 1996). Das normalerweise in spezifischen Granula zu findende NGAL ist bei Expression in HL-60 Zellen in azurophilen Granula lokalisiert.

Da die HL-60 Zellen sich dauerhaft in der promyelocytischen Entwicklungsphase befinden, co-lokalisieren alle exprimierten Granulaproteine mit dem Markerprotein für azurophile Granula, der Myeloperoxidase. Einen Überblick über die Granulopoese und das Auftreten der Granulatypen während der Neutrophilenreifung ist in Abbildung 1 zu finden.

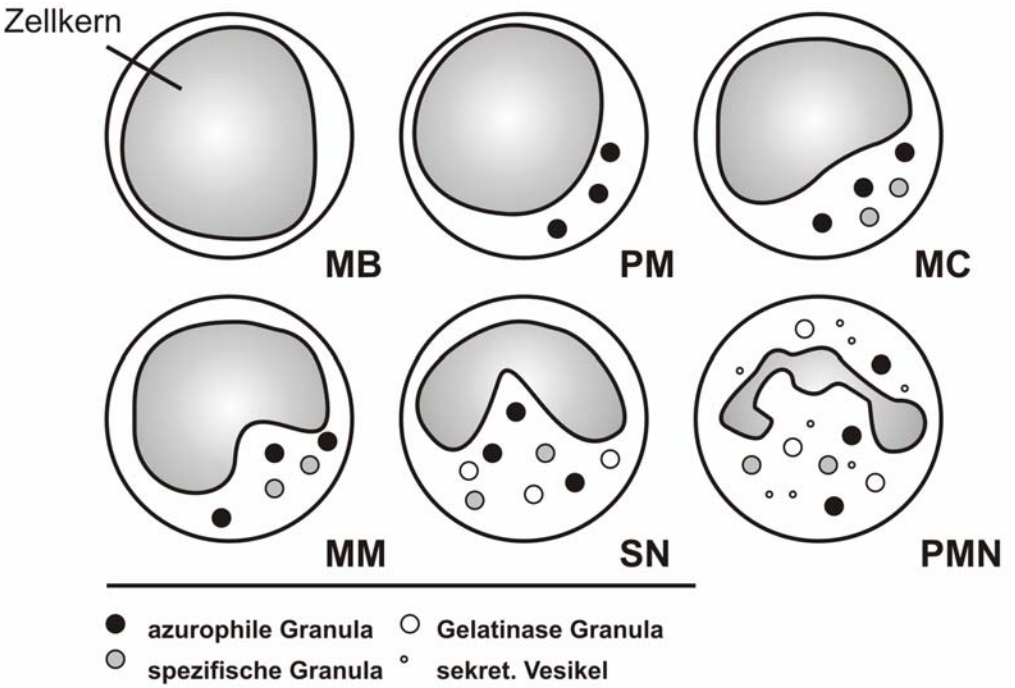



**Abb. 1: Die Granulopoese**

Die Neutrophilenreifung ist hier von dem Myeloblasten (**MB**) über den Promyelocyten (**PM**), den Myelocyten (**MC**), den Metamyelocyten (**MM**) und den stabkernigen Neutrophilen (**SN**) bis hin zum reifen, segmentkernigen Neutrophilen (**PMN**) dargestellt. Charakteristisch sind die Formänderung des Zellkerns sowie das Auftreten der unterschiedlichen Granula.

Während die azurophilen Granula auch oft als Lysosomen beschrieben werden, die beim Verdau des phagocytierten Materials eine Rolle spielen, wird die Hauptaufgabe der spezifischen und der Gelatinase-Granula in der Exocytose gesehen (Borregaard und Cowland, 1997). Zusätzlich stellen die Granula ein Reservoir an Membranproteinen dar, die bei der Exocytose mit der Plasmamembran verschmelzen und so Fähigkeiten der Zelle, mit der Umwelt zu interagieren, verändern können (Faurschou et al., 2003).

Allgemein gilt, dass bei der Aktivierung von PMN die Gelatinase Granula schneller mobilisiert werden als die spezifischen Granula und diese wiederum leichter als die azurophilen. Außerdem verfügen Granulocyten über sekretorische Vesikel, die noch vor den Gelatinase Granula mobilisiert werden können. Da man im Inneren der sekretorischen Vesikel Plasmaproteine gefunden hat, geht man davon aus, dass diese Organellen durch Endocytose entstehen (Borregaard und Cowland, 1997).

Neutrophile Granulocyten sind die ersten Zellen, die nach Eindringen eines Krankheitserregers an den Ort der Infektion wandern. Bei der Migration der Neutrophilen aus dem Blutstrom in das von Erregern befallene Gewebe, der sogenannten Diapedese, werden die Zellen aktiviert. Dadurch wird die Expression einiger Oberflächenantigene verändert. Die Expression von Mac-1 (CD11b/CD18) wird beispielsweise hochreguliert, während L-Selectin (CD62L) von der Oberfläche entfernt, „gesheddet“ wird. Das Vorhandensein von L-Selectin ist daher ein Indikator dafür, dass die untersuchten Neutrophilen nicht voraktiviert sind (Stibenz und Bührer, 1994).

Ein charakteristisches Oberflächenantigen für alle Granulocyten, d.h. ein pan-Granulocytenmarker, der auch in der Immundiagnostik eingesetzt wird, ist CD66b. CD66b gehört mit CD66a, -c, -d und -e zur Familie der Carcino-Embryogenic-Antigene (CEA), die strukturell der Immunglobulin-Superfamilie angehört (Skubitz et al. 1992). Mit Hilfe eines Glykosylphosphatidylinositol- (GPI) Ankers ist CD66b in der Membran eingebunden und verfügt daher im Gegensatz zu CD66a nicht über eine eigene Transmembrandomäne (Kuijpers et al., 1992). Die genaue Funktion dieses Moleküls ist noch unklar. Es wird jedoch eine Assoziation mit Tyrosinkinasen beschrieben (Skubitz et al. 1995), und eine Aktivierung der Neutrophilen durch Ligation von CD66b mit spezifischen Antikörpern ist möglich (Skubitz et al. 1996).

Die neutrophilen Granulocyten erkennen und phagocytieren Bakterien, Immunkomplexe und andere Partikel mit Hilfe von Fc-Rezeptoren, die an die Antikörper binden, mit denen diese Partikel opsonisiert sind. Eine weitere Möglichkeit ist die Bindung über opsonisierende Komponenten des Komplementsystems.

Dies geschieht mit Hilfe der Komplement-Rezeptoren 1 und 3 (Lloyd und Oppenheim, 1992). In einigen Fällen können die Neutrophilen auch direkt an die spezifischen Oberflächenantigene der Bakterien, z.B. Lipopolysaccharid (LPS), binden (Hellewell und Williams 1994).

In diesem Zusammenhang sind die sogenannten „pattern-recognition-receptors“ zu nennen: Rezeptoren, die konservierte, mit Pathogenen assoziierte molekulare Muster erkennen können. Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind die Toll-like-Rezeptoren. So erkennt z.B. der Toll-like-Rezeptor (TLR-) 4 das LPS gramnegativer Bakterien oder TLR-9 unmethylierte CpG-haltige Sequenzen, die in Eukaryoten nicht vorkommen (Janeway et al., 2002).

Das intrazelluläre Abtöten phagocytierter Erreger erfolgt mit Hilfe des sogenannten „respiratory burst", eines schlagartig hohen Verbrauchs von Sauerstoff, der mit einer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies einhergeht. „Respiratory“ ist jedoch die falsche Bezeichnung, da dieser Sauerstoffverbrauch nichts mit der Zellatmung zu tun hat – Neutrophile weisen wenig Mitochondrien auf und erhalten ihre Energie hauptsächlich aus der Glykolyse. Der Sauerstoff wird vielmehr von einem membranständigen Enzym, der NADPH-Oxidase verbraucht, die molekularen Sauerstoff in das Superoxid-Anion $O_2^-$ reduziert (Casimir und Teahan 1994). Diese Sauerstoffprodukte sind jedoch nicht direkt bakterizid. Ein diskutierter Mechanismus ist daher die Katalyse der Reaktion von Wasserstoffperoxid und Chloridionen zu hypochloriger Säure durch die in den azurophilen Granula enthaltene Myeloperoxidase. Hypochlorige Säure stellt ein potentes Bakterizid dar, das die phagocytierten Erreger abtöten kann. Jedoch scheint die Myeloperoxidase nicht essentiell für den Tötungsprozess zu sein, da Personen mit Myeloperoxidasemangel, dem häufigsten Granulocytendefekt (Inzidenz: 1:2000 bis 1:4000), nur bestimmte Erreger nicht abtöten können (Kuijpers et al. 1997).

Ein gemeinsames Merkmal der durch Granulocytendefekte verursachten Immundefizienz ist eine höhere Infektanfälligkeit gegenüber Bakterien und Pilzen, aber nicht gegenüber viralen Erregern. Dies gilt sowohl für die qualitativen als auch die quantitativen (Neutropenien) Granulocytendefekte und läßt einen Rückschluß auf das Aufgabengebiet der Neutrophilen zu.

Meist sind angeborene Defekte so schwerwiegend, dass die betroffenen Kinder das Schulalter nicht erreichen. Auch die agranulocytäre Phase nach einer Chemotherapie geht mit einer stark erhöhten Anfälligkeit für bakterielle und Pilz-Infektionen einher (Kirchner et al. 1993).

Ein erblicher Granulocytendefekt ist zum Beispiel das autosomal-rezessiv vererbte Leukocytenadhäsionsdefekt-Syndrom (LAD) (Peter et al., 1996). Inzwischen sind drei Unterformen dieser autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung bekannt, LAD I, LAD II und LAD III. Als Ursache der erhöhten Infektanfälligkeit wurde bei Betroffenen eine gestörte Neutrophilen-Mobilität gefunden, die mit defekten Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Neutrophilen erklärt werden kann. Bei LAD I liegt eine gestörte Expression der $\beta_2$-Integrine vor (Kuijpers et al. 1997). Durch eine Mutation im CD18-Gen ist die Bildung aller drei Heterodimer-Strukturen dieser Integrin-Gruppe beeinträchtigt: CD11a/CD18 (lymphocyte function-associated antigen (LFA) -1), CD11b/CD18 (Komplement-Rezeptor 3, CR3) und CD11c/CD18 (gp150,95). Bei einem kompletten Fehlen dieser Oberflächenmoleküle kommt es zum tödlichen Verlauf schon im ersten Lebensjahr. Bei LAD II handelt es sich um eine Störung in der Expression von Sialyl-Lewis X, einem Liganden für E-, P- und L-Selektin (Phillips et al. 1995). LAD III ist eine neu entdeckte Form, in der ein Defekt in der Aktivierung der Integrine besteht (Etzioni et al., 2004). Alle drei Defizienzen führen zu einer verminderten Adhäsion am mikrovaskulären Endothel, so dass die Diapedese aus der Blutbahn zum Ort der Infektion gestört ist. Weiterhin sind Enzymdefekte wie z.B. im NADPH-Oxidase System bekannt, welche die Fähigkeit der Neutrophilen beeinträchtigen, phagocytierte Erreger abzutöten. Diese werden häufig X-Chromosomal vererbt, es existieren jedoch auch autosomal-rezessive Formen (Gordon, 1994).

Für Neutropenie-Patienten mit Infektionen wird seit einiger Zeit die gezielte Transfusion aufgereinigter Neutrophiler diskutiert. Erste Versuche waren erfolgreich, jedoch stellt die kurze Lebensdauer der Zellen und damit verbundene Lagerungsschwierigkeiten immer noch ein Problem dar. Auch Präparation und Funktionsteste sind eine große Herausforderung für die beteiligten Labore. Hinzu kommt, dass aufgrund der kurzen Lebensdauer der Zellen für eine erfolgreiche Therapie multiple Transfusionen stattfinden müssen.

Ein Spender kann in kurzem Abstand jedoch nur ein bis zweimal spenden. Dies und auch die wenig erforschte Rolle der Neutrophilen im Immunsystem sind vermutlich Gründe dafür, dass diese Methode nach ersten Erfolgen wieder weniger angewendet wird (Huestis und Glasser, 1994).

## *1.5. Cytokine*

Die Steuerung des gesamten Immunsystems erfolgt mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen und den Cytokinen, kurzlebigen Mediatorproteinen, die vorwiegend von Leukocyten produziert werden und auch auf diese wirken. Im Gegensatz zu Hormonen wirken sie auto- oder parakrin und bilden ein komplexes Geflecht, das synergistisch und antagonistisch wirken kann, das sogenannte Cytokinnetzwerk.

Die Cytokine lassen sich gemäß ihrer Funktion in verschiedene Untergruppen unterteilen, die sich teilweise überschneiden. Man unterscheidet die Interleukine (IL), Interferone (IFN), Tumornekrosefaktoren (TNF), koloniestimulierende Faktoren (CSF) sowie die Wachstumsfaktoren (GF) (Kirchner et al., 1993). Ihrer Wirkung entsprechend zusammengefasst spricht man von pro-inflammatorischen Cytokinen, die entzündungsfördernd wirken, und anti-inflammatorischen Cytokinen, die den pro-inflammatorischen entgegenwirken. Als klassische pro-inflammatorische Cytokine werden IL-1, IL-6 und TNF-α angesehen. Da diese hauptsächlich von Monocyten/Makrophagen produziert werden, bezeichnet man sie auch als Monokine. Sie gehören zu den endogenen Pyrogenen, die direkt oder über die Freisetzung von Prostaglandin $E_2$ auf das Temperatur-Regulationszentrum im Gehirn wirken und so Fieber induzieren (Kirchner et al., 1993).

Von IL-1 sind zwei Formen bekannt und werden als IL-1α und IL-1β bezeichnet. Obwohl beide erhebliche Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz und auch in ihrem isoelektrischen Punkt aufweisen, binden sie an den gleichen Rezeptor und zeigen gleiche physiologische Eigenschaften. LPS-stimulierte humane Monocyten/Makrophagen produzieren jedoch zehn bis fünfzehnmal mehr von dem löslichen IL-1β als IL-1α, welches hauptsächlich membranständig vorliegt. IL-1 zeigt ein weites Spektrum an Wirkungen, es ist z.B. an der Regulation der Zellentwicklung in Knochenmark und Thymus beteiligt.

Außerdem fördert es die funktionelle Aktivierung reifer Zellen und stimuliert unter anderem seine eigene und auch die Produktion von IL-6 und TNF-α in Monocyten und Makrophagen (Kirchner er al., 1993). In der Leber induziert es, genau wie IL-6, die Synthese von Akute-Phase-Proteinen (Krakauer und Oppenheim, 1998).

Für IL-1 sind zwei spezifische Rezeptoren bekannt, die auf fast allen Zellen exprimiert werden. Die 80 kDa Variante wird als Rezeptortyp I (IL-1R I) bezeichnet und wird hauptsächlich von T-Zellen, Fibroblasten, Keratinocyten, Endothelzellen und Chondrocyten exprimiert. Der Rezeptortyp II (IL-1R II) hat ein Molekulargewicht von 65 kDa und wird auf B-Zellen, neutrophilen Granulocyten und Monocyten exprimiert. IL-1α zeigt eine höhere Affinität zum IL-1R I, während IL-1β besser an den IL-1R II bindet. Der Rezeptortyp II hat jedoch nur eine verkürzte cytoplasmatische Domäne und zeigt keine Signaltransduktion (Arend et al. 1998).

Zur Weiterleitung des IL-1-Signals ist eine zusätzliche Untereinheit, das IL-1 receptor accessory protein (IL-1rap) notwendig, das nur an den Komplex aus IL-1R I und jeweils IL-1α oder β bindet (Greenfeder et al., 1995a). Vermutlich fehlt bei der verkürzten cytoplasmatischen Domäne des IL-1R II die entsprechende Bindungstelle für das IL-1rap. Zusätzlich gehört zur funktionellen IL-1 Familie der IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1RA). Eine Bindung von IL-1RA an den IL-1R I blockiert diesen für die Bindung von IL-1α oder β, bewirkt jedoch keine Signalweiterleitung, da das IL-1rap nicht an den Komplex aus IL-1RA und IL-1R I bindet (Greenfeder et al., 1995b). IL-1RA kompetiert daher mit IL-1α und β um den aktivierbaren IL-1RI und wirkt so der biologischen Funktion von IL-1 entgegen, es ist also ein anti-inflammatorisches Cytokin.

Abbildung 2 gibt einen Überblick über das System aus IL-1, seinen Rezeptoren und seinem Antagonisten IL-1RA.

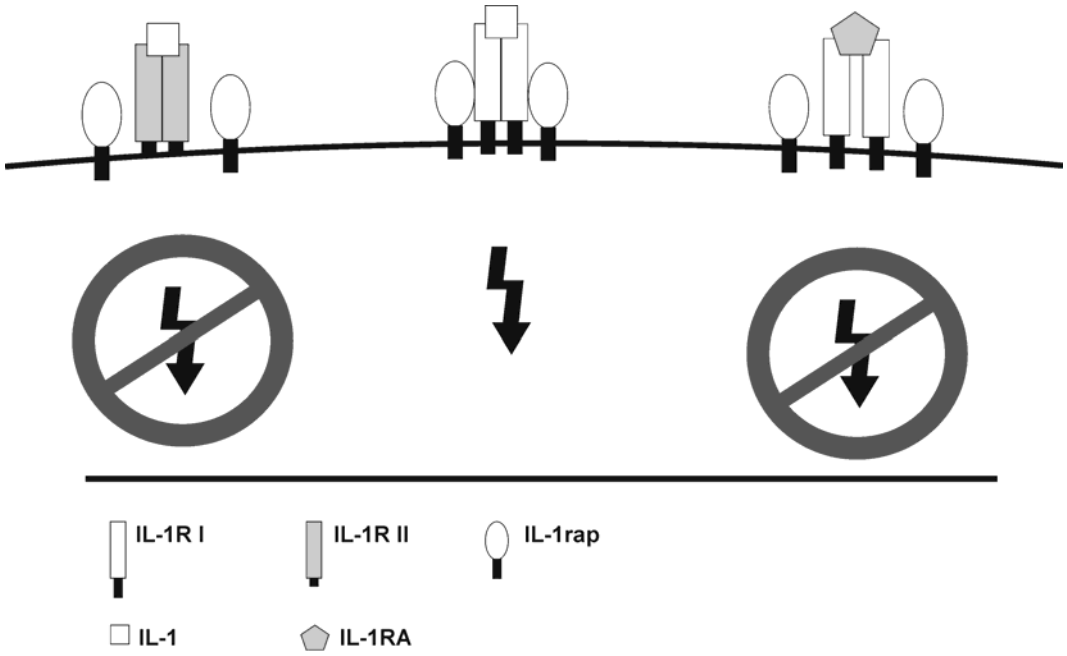



**Abb. 2: Das System aus IL-1, seinen Rezeptoren und seinem Antagonisten IL-1RA**

Nur die Bindung von IL-1 an den IL-1R I ermöglicht die Interaktion mit dem IL-1rap und eine Signalweiterleitung (**mitte**). Sowohl die Bindung von IL-1 an den IL-1R II (**links**) als auch die Bindung von IL-1RA an den IL-1R I (**rechts**) verhindern die Assoziation von IL-1rap und eine Signaltransduktion.

## *1.6. Interleukin-1 Rezeptor Antagonist*

Von IL-1RA sind verschiedene Isoformen bekannt. Eine Übersicht gibt Abbildung 3 auf der nächsten Seite. Drei der bekannten Isoformen sind als Protein im Western Blot beschrieben worden: sezerniertes (s-)IL-1RA (Abbildung 3A) und zwei intrazelluläre (ic-)IL-1RA-Varianten mit Molekulargewichten von 16 (Abbildung 3B) bzw. 18 kDa (Abbildung 3C) (Malyak et al. 1998a). Zwei weitere Varianten konnten lediglich als mRNA gefunden werden (icIL-1ra lang und verkürzt, Abbildung 3D und E).

Zumindest bei der verkürzten Form (3E) ist dies vermutlich darauf zurückzuführen, dass diese mRNA zwar die Exons 1 – 7 enthält, aber durch Einführung des dritten Exons ein Stopcodon entsteht. Das daraus resultierende Protein ist nur 24 Aminosäuren lang. Da der von den Exons 4-7 codierte Teil fehlt, wird davon ausgegangen, dass dieses Protein funktionell nichts mit den charakterisierten

Isoformen sIL-1RA und icIL-1RA 16kDa und 18kDa gemein hat (Holtkamp et al. 1999).

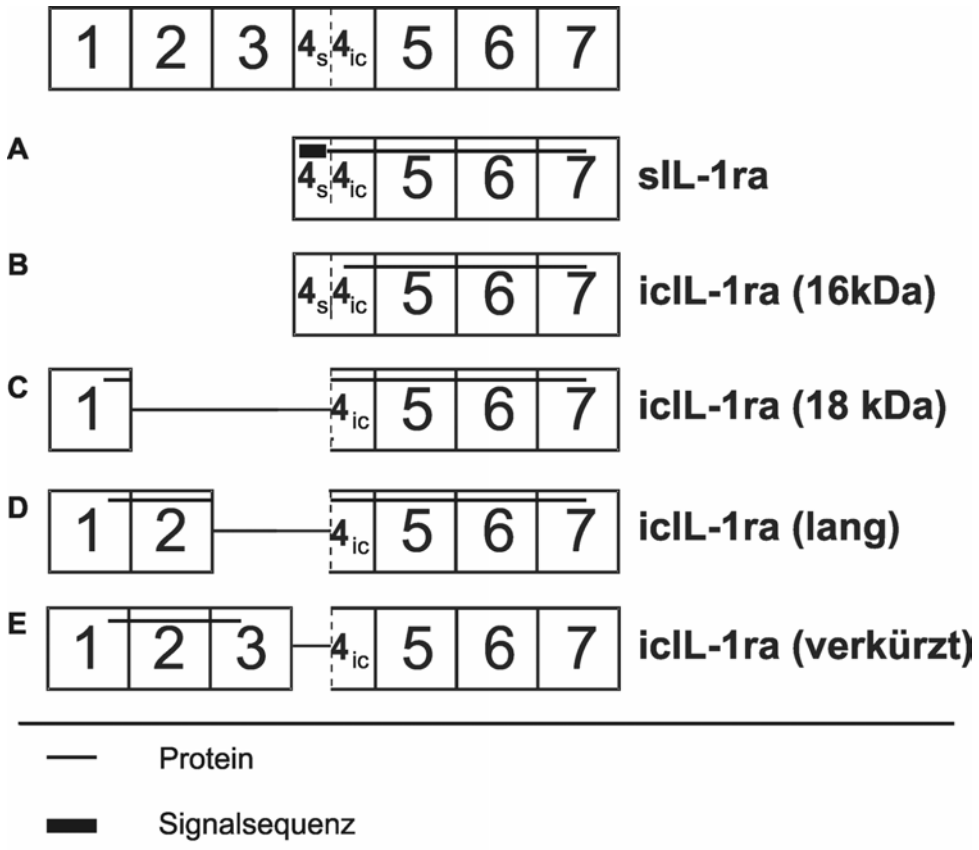



**Abb. 3: Übersicht über die IL-1RA Isoformen**

Schematisch dargestellt sind die sieben Exons von IL-1RA sowie die beschriebenen Isoformen auf mRNA-Ebene (**A-E**). Die beschriebene bzw. für **D** und **E** nur vorhergesagte Proteinsequenz ist jeweils durch eine dünne Linie angedeutet, die Lokalisation der Signalsequenz für die Prozessierung über den Golgi-Apparat durch eine dicke Linie. sIL-1RA besteht aus dem vollständigen Exon 4 und den Exons 5 bis 7 (**A**). Bei den intrazellulären Varianten (**B-E**) fehlt durch alternatives Spleißen bzw. alternative Translation diese Signalsequenz. Diesen intrazellulären Varianten wird ein „ic" vorangestellt (icIL-1RA).

Nur eine der bekannten Isoformen von IL-1RA verfügt über eine klassische Signalsequenz für die Prozessierung über den Golgi-Apparat und wird daher als sezerniertes IL-1RA (sIL-1RA) bezeichnet (Abbildung 3A). Die Varianten C-E entstehen durch alternatives Spleißen der ersten drei Exons an eine interne Spleiß-Akzeptorstelle in Exon 4 ($4_{ic}$). Die am 5' Ende von Exon 4 lokalisierte Signalsequenz geht dadurch verloren, und diese Isoformen verbleiben daher vermutlich intrazellulär.

Für icIL-1RA 16kDa (Abbildung 3B) wurde die Entstehung durch einen alternativen Translations-Startpunkt der sIL-1RA mRNA (Abbildung 3A) beschrieben, so dass beide Proteine von der gleichen mRNA codiert werden (Malyak et al. 1994, Arend 2002). Dadurch ergibt sich die Besonderheit, dass bei den in dieser Arbeit untersuchten Varianten sIL-1RA, icIL-1RA 16kDa und icIL-1RA 18kDa auf mRNA Ebene zwei Isoformen und auf Proteinebene drei Isoformen unterschieden werden können. Der Übersicht halber werden die intrazellulären Isoformen daher im Folgenden - auch wenn es sich um mRNA handelt - mit ihren Molekulargewichten icIL-1RA 16kDa und 18kDa bezeichnet.

## *1.7. Interleukin-8*

Obwohl IL-8 oft als pro-inflammatorisches Cytokin bezeichnet wird, induziert es kein Fieber und ist daher im engeren Sinne kein klassisches pro-inflammatorisches Cytokin. Es wird, seiner Wirkung und seiner Struktur entsprechend, in die Gruppe der Chemokine eingeordnet. Diese werden wiederum nach der Anordnung ihrer Cysteine in Untergruppen unterteilt (Mukaida und Matsushima, 1998). CXC-Chemokine, zu denen z.B. Growth regulated oncogene (GRO) -α und auch IL-8 gehören, weisen eine Aminosäure zwischen den beiden ersten Cysteinen auf. Bei den CC-Chemokinen wie Macrophage inflammatory protein (MIP) -1α und MIP-1β zum Beispiel, sind dagegen diese Cysteine direkt benachbart. CXC-Chemokine wirken stark chemotaktisch auf Neutrophile, geringer auch auf Lymphocyten, während CC-Chemokine Monocyten anlocken. Neben den CC- und CXC-Chemokinen gibt es noch zwei kleinere Gruppen, die C- und die $CX_3C$-Chemokine. Von IL-8 wurde eine verkürzte Form von nur 69 statt 72 Aminosäuren gefunden, die jedoch die gleiche chemotaktische Aktivität aufweist, sowie zwei 79 und 77 Aminosäuren lange, nicht vollständig prozessierte Formen, die eine geringere Aktivität besitzen (Mukaida und Matsushima, 1998). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Neutrophil-Elastase und Cathepsin G die 77 Aminosäuren Variante von IL-8 in die aktivere 72 Aminosäuren-Variante spalten können (Padrines et al. 1994).

Obwohl neutrophile Granulocyten die größte zelluläre Fraktion der Leukocyten im Blut bilden und als erste Zellen an den Ort einer Infektion einwandern (Lloyd und Oppenheim, 1992), wurde ihre Rolle im Immunsystem lange nur als die reiner Phagocyten angesehen. Erst in den letzten Jahren wurden Ergebnisse zur

Cytokinproduktion der Neutrophilen publiziert. Über die Cytokinprofil neutrophiler Granulocyten existieren jedoch kontroverse Ansichten in der Literatur. Am häufigsten ist die Produktion von IL-8 durch Neutrophile beschrieben, (Bazzoni et al., 1991; Cassatella et al., 1992; Strieter et al., 1992; Fujishima et al., 1993). Auch eine Produktion der pro-inflammatorischen Cytokine IL-1β, IL-6 und TNF-α wurde berichtet (Tiku et al., 1986; Cicco et al. 1990; Dubravec et al., 1990; Marucha et al., 1990; Arnold et al., 1994). Zusammengefasst wurden sowohl pro-inflammatorische wie auch anti-inflammatorische Mediatoren beschrieben, so dass die Rolle der neutrophilen Granulocyten in der Immunregulation noch nicht endgültig geklärt ist. Häufig ähneln die beschriebenen Cytokinspektren auffallend denen von Monocyten, die leicht Präparationen von Neutrophilen verunreinigen können.

In einer vorausgegangenen Dissertation zu dieser Thematik wurde daher eine Methode entwickelt, neutrophile Granulocyten hochrein und nicht voraktiviert zu isolieren (Altstaedt et al., 1996; Altstaedt, 1998). Die erreichte Reinheit lag bei durchschnittlich 98,5% mit einer Kontamination vor allem durch eosinophile Granulocyten. Mit diesen hochreinen Neutrophilen konnten Altstaedt et al. (1996) eine Sekretion von pro-inflammatorischen Cytokinen wie IL-1β, IL-6 und TNF-α nicht bestätigen. Zwar wurden mit Hilfe von PCR die mRNAs aller drei Cytokine detektiert, jedoch war keine Sekretion des Proteins nachweisbar. Altstaedt et al. (1996) fanden jedoch eine Sekretion des Chemokins IL-8. In weiteren Versuchen mit den hochreinen Neutrophilen konnten von der Ohe et al. (2001) eine Produktion der Chemokine MIP-1α, -1β und GRO-α zeigen. Eine Produktion von IFN–α, wie in der Literatur beschrieben (Shirafuji et al., 1990, Brandt et al., 1994), konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (von der Ohe et al., 2001).

Absichtliche Verunreinigungen der Präparationen mit PBMCs führten schon ab einer Menge von 5% PBMCs zu einer detektierbaren Menge an IFN-α (von der Ohe et al., 2001). Auch für die pro-inflammatorischen Cytokine IL-1β und IL-6 konnte Altstaedt diesen Effekt bei noch geringeren Kontaminationsraten von 1% (IL-1β) bzw. 0,5% (IL-6) nachweisen (Altstaedt, 1998). Dies ist ein Hinweis darauf, dass viele publizierte Beobachtungen auf Kontaminationen in der PMN-Präparation zurückzuführen sein könnten.

# 2. Zielsetzung

Neutrophile Granulocyten bilden mit 60 – 70% die größte zelluläre Fraktion unter den Leukocyten des Blutes. Sie sind darüber hinaus die ersten Zellen, die an den Ort einer Infektion einwandern, wo sie eingedrungene Mikroorganismen phagocytieren können (Cassatella, 1995). Lange Zeit wurde diese Phagocytose von Erregern als einzige Fähigkeit der Neutrophilen angesehen, erst in den letzten Jahren wurde den Zellen eine Produktion von Cytokinen und damit ein Beitrag zum Cytokinnetzwerk zugeschrieben (Lloyd und Oppenheim, 1992). Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen widersprechen sich jedoch und beinhalten sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Cytokine, so dass die Rolle der neutrophilen Granulocyten in der Immunregulation noch nicht geklärt ist.

1996 etablierten Altstaedt et al. eine neue Methode mit der neutrophile Granulocyten hochrein und nicht voraktiviert isoliert werden können. Mit diesen Zellen konnten Altstaedt et al. zeigen, dass Neutrophile keine pro-inflammatorischen Cytokine wie IL-1β und IL-6, wohl aber das Chemokin IL-8 sezernieren (Altstaedt et al., 1996). Auch in weiteren Untersuchungen mit den hochreinen Neutrophilen konnten keine pro-inflammatorischen Cytokine nachgewiesen werden, die Sekretion einiger Chemokine wie MIP-1α und MIP-1β konnte jedoch gezeigt werden (von der Ohe et al., 2001).

Die Zielsetzung dieser Dissertation ist es, die bisherigen Erkenntnisse über die Cytokinproduktion von Neutrophilen zu ergänzen und zu erweitern. Dazu soll die Produktion von Cytokinen durch Neutrophile sowohl auf der Proteinebene als auch auf der Ebene der mRNA charakterisiert werden. So sollen die Lysate der Neutrophilen auf Cytokine untersucht werden, die eventuell zwar produziert, aber nicht in den Überstand sezerniert werden und daher in den vorherigen Untersuchungen nicht detektiert wurden. Die Lokalisation der Cytokine innerhalb des Neutrophilen soll untersucht werden und ob die gefundenen Cytokine präformiert in den Zellen vorliegen oder eventuell *de novo* synthetisiert werden. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuche sollen durch die Aufklärung ihres Cytokinspektrums zu einem besseren Verständnis der Neutrophilen und ihrer Rolle in der Immunregulation beitragen.

# 3. Material und Methoden

## *3.1. Material*

### 3.1.1. Geräte

- Analysenwaage, 770/GS/GJ (Kern und Sohn, Balingen-Fommern)
- Belichtungskassette-K für Röntgenfilme, 20x25cm (BioRad Laboratories, München)
- BioMax TranScreen Verstärkerfolie (Kodak, USA)
- Blot-Transfer-Kammer, Mini-Trans (BioRad Laboratories, München)
- Brutschrank, 5042E (Heraeus, Osterode)
- Cell Disruption Bomb (Parr Instruments, USA)
- $CO_2$-Inkubator, MCO-17 AIC (Sanyo Fischer, München)
- Durchflußcytometer, FACS-Calibur (Becton-Dickinson, Heidelberg)
- Elektrophorese-Kammer, Mini-Protean 3 (BioRad Laboratories, München)
- Elektorphorese-Netzgerät, Power-Pack 300 System (BioRad Laboratories, München)
- Elektrophorese-Kammer, Mini-Sub Cell GT (BioRad Laboratories, München)
- ELISA-Reader, Magellan (Tecan, Crailsheim)
- ELISA-Washer, Atlantis (Asys Hitech, Eugendorf)
- Entwickler, Agfa Cruix HT350 (Agfa, Köln)
- Folienschweißgerät, Polystar 100 (Rische und Herfurth, Hamburg)
- Gefrierschrank, -20°C (Bosch, München)
- Gefrierschrank, -80°C, MDF-U71VS (Sanyo, Japan)
- Geltrockner Pherotemp (Biotec Fischer, Reiskirchen)
- Kühlschrank, +4 - +8°C (Bosch, München)
- Laborwaage, 1265MP (Sartorius AG, Göttingen)
- MidiMACS Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- Magnetrührer, MR3001 (Heidolph, Schwabach)
- Mikroskop (Hund, Wetzlar)
- Strahlungsmonitor (Berthold, Bad Wildbad)
- Multipipette, Multipette plus (Eppendorf, Hamburg)
- pH-Meter, HI9321 (Hanna Instruments, Kehl am Rhein)

- Photometer, BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
- Pipetten, 0,5-10µl, 10-100µl und 100-1000µl, Research (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettierhilfe, Pipettus akku (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
- Schüttler HS 250 basic (IKA-Werke, Staufen)
- Sequence Detection System 7000, Taqman (Applied Biosystems, USA)
- Standzentrifuge, Varifuge 3.0RS (Heraeus, Osterode)
- Standzentrifuge, Z 400 K (Hermle, Wehingen)
- Sterile Werkbank, KR130 und KR-210 (Kojair, Finnland)
- Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge, 5417 R (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge, Biofuge A (Heraeus, Osterode)
- UV-Cleaner Box, UVC/T (Lab4You, Berlin)
- Vortex, Reax (Heidolph, Schwabach)
- Zellzählgerät, Casy 1 TT (Schärfe System, Reutlingen)
- Zentrifuge Sorvall RC5C PLUS (Kendro, Langenselbold)

### 3.1.2. Laborbedarf

- Bakterienfilter, 0,2 µM (Pall, Dreiech)
- Casy cups (Schärfe-System, Reutlingen)
- Cellscraper, 25cm (Sarstedt, Nümbrecht)
- Einmalküvetten, 10x4x45mm (Sarstedt, Nümbrecht)
- FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)
- Filterpapier 3MM (Whatman, Großbritannien)
- Frischhaltefolie (RUF, Bremen)
- Gel Blotting Papier GB003 (Schleicher und Schuell, Dassel)
- Glasplatten, Outer Glass PLT W/1.5mm, M-P 3 (BioRad Laboratories, München)
- Glasplatten, Short Plates, M-P 3 (BioRad Laboratories, München)
- Klebefolien, Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, USA)
- Kanülen, 21G (BD, Heidelberg)
- Kunststoffröhrchen, steril, mit Schraubverschluß, 15ml und 50ml (Greiner, Nürtingen)

- Latex Einmalhandschuhe (Kimberley-Clark, Belgien)
- LS Säulen für MidiMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- Nitrocellulosemembran (0,45µm) (BioRad Laboratories, München)
- PCR-Reaktionsgefäß, 0,2ml (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen Combitips, 1ml, 2,5ml, 5ml und 10ml (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen, 100-1000µl (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen, 1-10µl und 10-100µl (Sarstedt, Nümbrecht)
- Pipettenspitzen, gestopft, 1-10µl, 10-100µl und 100-1000µl (Biozym, Oldendorf)
- PPN-Röhrchen mit Verschlußkappe, steril, 5ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- Reaktionsgefäße, 1,5ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- Reaktionsplatten, MicroAmp Optcical 96-Loch (Applied Biosystems, USA)
- Röntgenfilm, X-OMAT UV Film (Kodak Deutschland, Stuttgart)
- Schlauchfolie, PE, 0,2 mm (VWR International, Darmstadt)
- Schwammkissen, 8x11cm (BioRad Laboratories, München)
- Serologische Pipetten, 5ml, 10ml und 25ml (Greiner, Nürtingen)
- UV-Einmalküvetten, UVette 220-1600nm (Eppendorf, Hamburg)
- Vakuumfilter, Stericup-GV (Millipore, Schwalbach)
- Zellkulturflaschen, Nunclon Surface, 25cm$^2$ (Nunc, Dänemark)
- Zellkulturplatte, 24-Loch (BD, Heidelberg)
- Zellkulturplatte, 6-Loch (BD, Heidelberg)
- Zellkulturschale, 100mm (Sarstedt, Nümbrecht)
- Zellsieb, 70µM (BD, Heidelberg)

### 3.1.3. Zellkulturmedien und Zusätze

- Kulturmedium RPMI 1640 (Cambrex, Belgien)
- FCS, Fetales Kälberserum (Cambrex, Belgien)
- L-Glutamin, 200mM (Cambrex, Belgien)
- Penicillin 10000U/ml + Streptomycin 10000µg/µl (Cambrex, Belgien)
- StemSpanTM SF Expansion Medium (Stemcell Technologies, USA)
- Humaner Stammzell Faktor (SCF) (Peprotech, USA)
- Humanes Thrombopoetin (TPO) (Peprotech, USA)
- Humaner Flt3-Ligand (Peprotech, USA)

- hyper-IL-6 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. M. Zenke, Aachen)
- Humanes M-CSF (Peprotech, USA)
- Humanes GM-CSF (Peprotech, USA)
- RPMI 1640 Methionin- und Cysteinfrei (Biowhittaker, Heidelberg)
- Redivue Pro-Mix (Methionin u. Cystein) 2,5 mCi (GE Healthcare, Freiburg)

### 3.1.4. Stimulantien

- Granulocyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) (Strathmann, Hannover)
- Lipopolysaccharid (LPS) aus Escherichia coli, Serotyp O111:B4 (Sigma, Deisenhofen)

### 3.1.5. Antikörper

- biotinylierter Anti-human IL-1β Antikörper BAF201, polyklonal Ziege (R&D Systems, Wiesbaden)
- biotinylierter Anti-human IL-1RA Antikörper BAF280, polyklonal Ziege (R&D Systems, Wiesbaden)
- Anti-human IL-1RA Antikörper AF-280-NA, polyklonal Ziege (R&D Systems, Wiesbaden)
- biotinylierter Anti-human IL-6 Antikörper BAF206, polyklonal Ziege (R&D Systems, Wiesbaden)
- Maus Anti-Human IL-8 Antikörper G265-5 (BD PharMingen, Heidelberg)
- Maus PE-konjugierter Anti-Human IL-8 Antikörper G265-8 (BD PharMingen, Heidelberg)
- PE-konjugierte Maus IgG2bκ Isotypkontrolle 27-35 (BD PharMingen, Heidelberg)
- anti-Myeloperoxidase C-16 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- anti-Lactoferrin C-15 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Ziege Anti-Biotin Sekundärantikörper HRP konjugiert (Cell Signaling Technology, USA)

- Ratte biotinylierter Anti-Maus Ig Antikörper 187.1
  (BD PharMingen, Heidelberg)
- FITC-konjugierter Maus anti-Human CD66b Antikörper MOPC 315-43
  (Beckmann-Coulter, Krefeld)
- PE-konjugierter Maus anti-Human CD62L Antikörper SP2.0
  (Beckmann-Coulter, Krefeld)
- PE-konjugierter Maus anti-Human CD14 Antikörper MOP9
  (BD PharMingen, Heidelberg)
- FITC- und PE-konjugierte gemischte Maus IgG1 Isotypkontrolle 679.1Mc7
  (Beckmann-Coulter, Krefeld)
- FITC-konjugierter Maus anti-Human CD66b Antikörper G10F5
  (BD PharMingen, Heidelberg)
- FITC-konjugierte Maus IgM Isotypkontrolle G155-228
  (BD PharMingen, Heidelberg)

### 3.1.6. Rekombinante Proteine

- IL-1β, rekombinant, Human (Strathmann, Hannover)
- IL-1RA 17 kDa, rekombinant, Human (Strathmann, Hannover)
- IL-6, rekombinant, Human (Strathmann, Hannover)
- IL-8, rekombinant, Human (Strathmann, Hannover)

### 3.1.7. Molekularbiologische Reagenzien

- Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen)
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10mM (Applied Biosystems, USA)
- HotStar-Taq, 5U/µl (Qiagen, Hilden)
- Magnesiumchlorid, 25mM (Qiagen, Hilden)
- PCR-Puffer, 15mM (Qiagen, Hilden)
- Rox, 100mM (TIB MOLBIOL, Berlin)
- Auftragssynthesen von Oligonucleotiden (TIB MOLBIOL, Berlin)

### 3.1.8. Kommerziell erhältliche Kits

- $CD34^+$ Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- BD OptEIA ELISA Sets für humanes IL-1β, IL-6 und IL-8 (BD Biosciences, Heidelberg)

- DuoSet ELISA Development Set für humanes IL-1RA (R&D Systems, Wiesbaden)
- iscript cDNA Synthesis Kit (BioRad Laboratories, München)

### 3.1.9. Sonstige Reagenzien

- Acrylamid/bis-Acrylamid, 30%ige Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- APS, Ammoniumpersulfat (BioRad Laboratories, München)
- Aqua Spüllösung (Delta Select, Dreieich)
- β-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
- BioRad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (BioRad Laboratories, München)
- Bromphenolblau (Fluka, Schweiz)
- BSA, Albumin aus Rinderserum (Fluka, Schweiz)
- Chloroform (Merck, Darmstadt)
- Density Marker Beads (GE Healthcare, Freiburg)
- DEPC (Merck, Darmstadt)
- DTT, Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- EDTA (Merck, Darmstadt)
- EGTA (Merck, Darmstadt)
- Essigsäure, 100% (Merck, Darmstadt)
- Ethanol, absolut (J.T. Baker, Niederlande)
- FACS Lysing Solution (BD, Heidelberg)
- Ficoll-Trennlösung 1,077g/ml (Biochrom, Berlin)
- Giemsa Lösung (Merck, Darmstadt)
- Glycin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Hanks' Balanced Salts ohne Calciumchlorid, Magnesiumsulfat, Phenolrot und Natriumhydrogencarbonat (HBSS) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Heparin-Natrium, Liquemin N 5000 (Roche, Mannheim)
- HEPES Puffer (BioWhittaker, Heidelberg)
- Hydroxyethylstärke Plasmasteril 6% (HES 45/0,7) (Fresenius, Bad Homburg)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt)
- Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Krebs-Ringer Bicarbonat Puffer (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Magermilchpulver (Trade Service International, Zeven)

- Mai-Grünwald Färbelösung (Merck, Darmstadt)
- Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Methanol (Merck, Darmstadt)
- NatriumATP (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natriumazid (Merck, Darmstadt)
- Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Natriumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt)
- Natriumvanadat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Paraformaldehyd (Riedel-de Haën, Seelze)
- PBS ohne $Ca^{2+}$ und $Mg^{2+}$, 1x (Cambrex, Belgien)
- PBS 10fach Konzentrat (Gibco, Karlsruhe)
- Pefabloc SC (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Percoll (1,131 +/- 0,005 g/ml, GE Healthcare, Freiburg)
- Peroxid (Cell Signaling, USA)
- PIPES Puffer (Sigma Aldrich, Steinheim)
- PMSF, Phenylmethansulfonyl Fluorid (Fluka, Schweiz)
- Ponceau-S-Lösung (Fluka, Schweiz)
- Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Protein-Leiter, biotinyliert (Cell Signaling, USA)
- Saccharose (Merck, Darmstadt)
- Saponin (Riedel-de Haën, Seelze)
- SDS, Sodiumdodecylsulfat (Merck, Darmstadt)
- TEMED, N, N, N´, N´-Tetramethylenthylendiamin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- TrisBase, Tris(hydroxymethyl-)-aminomethan (Merck, Darmstadt)
- TrisHCl, Tris(hydroxymethyl-)-aminomethan-hydrochlorid (Merck, Darmstadt)
- Triton X-100 (Merck, Darmstadt)
- Trizol® Reagenz (Gibco BRL, Karlsruhe)
- Tween-20 (Merck, Darmstadt)

## *3.2. Methoden*

### 3.2.1. Zellbiologische Methoden

#### *3.2.1.1. Isolierung von neutrophilen Granulocyten*

*Prinzip:*

Basis für die Isolierung der neutrophilen Granulocyten bildet der Buffy coat, ein bei der Blutspende nach der Gewinnung von Plasmen und Erythrocytenkonzentraten anfallendes, leukocytenreiches Restprodukt. Der Buffy coat enthält außer Leukocyten auch noch Thrombocyten und erhebliche Mengen an Erythrocyten. Diese werden zunächst mit Hilfe eines Sedimentationsschrittes mit HES abgereichert und der Rest später durch eine hypotone Lyse mit destilliertem Wasser entfernt. Die verbleibenden Leukocyten werden über einen dreischichtigen Dichtegradienten aus Percoll zentrifugiert. Entsprechend den Interphasen des Gradienten entstehen drei Ringe aus Zellen: unten die eosinophilen Granulocyten, darüber die neutrophilen und oben die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die vorsichtig abpipettierten neutrophilen Granulocyten werden erneut über eine Percoll-Lösung zentrifugiert, um verbliebene PBMCs zu entfernen. Nach dem abschließenden Waschen werden die Zellen dann in der gewünschten Konzentration in Kulturmedium aufgenommen. Für die Isolierung von PMN wurde z.T. auch frisches, heparinisiertes (5U/ml) Vollblut genommen, die Sedimentationszeit wurde dann verkürzt.

*Verwendete Reagenzien:*

PBS (10fach, 2fach und 1fach konzentriert)
Percoll
Hydroxyethylstärke (HES)
Aqua Spüllösung, steril
Humanmedium (siehe 3.2.1.4.)

*Angesetzte Lösungen:*

| | |
|---|---|
| Percoll 85% (1,105 g/ml) | PBS (1x) 7,5 ml<br>Percoll 42,5 ml |
| Percoll 75% (1,093 g/ml) | PBS (1x) 12,5 ml<br>Percoll 37,5 ml |
| Percoll 66 % (1,082 g/ml) | PBS (1x) 17 ml<br>Percoll 33 ml |

*Herstellung des Gradienten:*

- Das Percoll wird zunächst 10:1 mit 10x PBS vorverdünnt.
- Aus dieser Stocklösung ( = 100%) werden durch weitere Verdünnung mit 1x PBS Gradienten-Lösungen der folgenden Dichten hergestellt: 85 %, 75 % und 66%.
- Für einen Gradienten wird in einem 50 ml Röhrchen 5 ml 85% Percoll mit 10 ml 75% und 15 ml 66% überschichtet.
- Durch eine Kontrolle der Lösungen mittels Density Marker Beads kann die korrekte Dichte der Gradientenstufen überprüft werden.

*Durchführung:*

- Der Buffy coat wird auf zwei bis drei 50 ml Röhrchen aufgeteilt, im Verhältnis 2:1 mit HES gemischt und 30-40 min zum Sedimentieren stehen gelassen. (Für die Isolierung von PMN aus frischem Vollblut wird die Sedimentationszeit um ca. 10 min verkürzt (optische Kontrolle der Sedimentation).)
- Mittels einer Pipette werden die Überstände abgesaugt, in neue 50 ml Röhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen. (300 g, 10 min 20°C)
- Die Pellets werden in je 10 ml steriler Aqua Spüllösung gut resuspendiert, wobei die Erythrocyten lysieren. Sofort anschließend werden mit 10 ml 2x PBS isotone Verhältnisse wiederhergestellt.
- Erneut wird zweimal in PBS gewaschen (s.o.)
- Die Pellets eines Buffy coats werden resuspendiert, in 20 ml PBS vereint, auf den Percollgradienten geschichtet und 20 min mit 600 g bei 20°C zentrifugiert. Für diesen Zentrifugationsschritt sind langsame Beschleunigungs- und Bremsphasen essentiell.

- Überstand und Interphase auf 66% Percoll (dies sind die PBMCs) werden vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Die PMN werden aus der Interphase zwischen 66% und 75% abgesaugt.
- Die erhaltene Zellsuspension wird einmal in PBS gewaschen (s.o.).
- Das in 10 ml PBS resuspendierte Pellet wird erneut auf 10 ml 66% Percoll geschichtet und 20 min mit 600 g bei 20°C zentrifugiert. Für diesen Zentrifugationsschritt sind langsame Beschleunigungs- und Bremsphasen essentiell.
- Erneut werden Überstand und Interphase verworfen, die PMN sammeln sich als lockeres Pellet am Boden des Gefäßes und werden abschließend zweimal in PBS gewaschen (s.o.).
- Die isolierten Zellen werden in Humanmedium aufgenommen, gezählt und weiter verwendet.

#### *3.2.1.2. Isolierung von mononucleären Zellen des peripheren Blutes*

*Prinzip:*

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von PBMCs dienen ebenfalls Buffy coats bzw. frisches Vollblut. Nach der Zentrifugation der Leukocytenfraktion über eine Ficoll-Lösung befinden sich die gewünschten PBMC in einer Interphase unterhalb des Plasmas, während sich die Granulocyten und Erythrocyten im Pellet befinden. Eine Erythrocytenlyse ist in diesem Fall nicht erforderlich, und die PBMC können nach einem weiteren Waschschritt weiter verwendet werden.

*Verwendete Reagenzien:*

PBS 1fach konzentriert
Ficoll
Humanmedium (siehe 3.2.1.4.)

*Zellisolierung:*

- Der Buffy coat bzw. das Vollblut werden mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt.
- In ein 50 ml Röhrchen werden 25 ml Ficoll-Lösung vorgelegt, mit 25 ml des verdünnten Blutes überschichtet und 20 min. bei 600 g und 20°C

zentrifugiert. Für diesen Zentrifugationsschritt sind eine langsame Brems- und Beschleunigungsphase essentiell.

- Die PBMCs (der helle Ring der Interphaseschicht) werden mit Hilfe einer Pipette abgenommen und die so gewonnenen Zellen dreimal mit PBS gewaschen (10 min bei 300 g, RmT)
- Die isolierten Zellen werden in Humanmedium aufgenommen, gezählt und weiter verwendet.

#### *3.2.1.3. Isolierung und Differenzierung von $CD34^+$ Stammzellen*

*Prinzip:*

Zum Zeitpunkt der Geburt befinden sich hämatopoetische Stammzellen im kindlichen Blutkreislauf, die als Bestandteile des Nabelschnurblutes aus Plazenta und Nabelschnur entnommen werden können. Gemeinsames Merkmal der Stammzellen aus dem Nabelschnurblut ist die Expression von CD34, und mit Hilfe von spezifischen Antikörpern für dieses Oberflächenantigen können die Zellen isoliert werden. Spezielle Mediumzusätze verhindern die Differenzierung und erhöhen die Proliferationsrate der undifferenzierten Zellen, die so zunächst expandiert werden können. *In vitro* können die blutbildenden Zellen dann mit Hilfe von Cytokinen in unterschiedliche Zelltypen differenziert werden.

*Verwendete Reagenzien:*

BSA

$CD34^+$ Isolierungskit von Miltenyi Biotec

EDTA

PBS (1x)

Stammzellmedium (siehe 3.2.1.4.)

*Angesetzte Lösungen:*

| | |
|---|---|
| MACS-Puffer | BSA 0,3% (w/v)<br>EDTA 2 mM<br>PBS |
| Waschpuffer | EDTA 2 mM<br>PBS |

*Zellisolierung:*

- Das heparinisierte Nabelschnurblut wird durch ein 70 µm Zellsieb gegeben, um Koagulate zu entfernen
- Jeweils 10 ml Blut werden anschließend in einem 50 ml Röhrchen mit Waschpuffer auf 40 ml aufgefüllt, mit 10 ml Ficoll unterschichtet und für 25 Minuten bei 800 g zentrifugiert.
- Die PBMC-Ringe jedes Röhrchens werden abgenommen, vereint, und mit Waschpuffer einmal gewaschen (450 g, 5 min bei RT).
- Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wird das Pellet in 20 ml Waschpuffer resuspendiert und ein Aliquot (10 µl) zum Zellzählen entnommen. (An dieser Stelle kann man falls gewünscht auch die Zellen mehrerer Patienten vereinen).
- Die restlichen Zellen werden erneut bei 450 g für 5 min zentrifugiert. Die nachfolgenden Schritte gelten maximal für eine Zellzahl von $10^8$ Zellen
- Das Pellet wird in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert und 100 µl Fcγ-Blocking Reagenz sowie 100 µl anti-CD34 Hapten hinzugegeben (beides aus dem $CD34^+$ Isolierungskit). Alles zusammen wird für 15 min bei 4°C inkubiert.
- Nachdem mit Waschpuffer auf 20 ml aufgefüllt wurde und ein weiterer Waschschritt (450 g für 5 min bei RmT) folgte, wird das Pellet erneut in diesmal 400 µl MACS-Puffer resuspendiert. 100 µl anti-Hapten Beads (aus dem Kit) werden hinzugegeben und alles für 15 min bei 4°C inkubiert.
- Nach einem weiteren Waschschritt mit 20 ml Waschpuffer (450 g, 5 min, RmT) werden die Zellen in 1 ml Waschpuffer resuspendiert.
- Eine 21 G Kanüle wird an eine MACS Säule gekoppelt, diese in den Magnethalter eingespannt und zur Äquilibrierung wird über die Säule zunächst 500 µl Waschpuffer gegeben.
- Anschließend werden die Zellen auf die Säule gegeben und dreimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen.
- Wenn es nicht mehr tropft, wird die Säule vom Magnethalter abgenommen, in ein frisches 15 ml Röhrchen gehängt, 1 ml Waschpuffer draufgegeben und die Zellen mit dem zur Säule gehörenden Stopfen herausgedrückt.

- Dieser Durchlauf wird dann auf eine zweite im Magnethalter eingespannte und ebenfalls äquilibrierte Säule gegeben und dreimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen.
- Nachdem die Säule nicht mehr tropft, wird sie erneut in ein frisches 15 ml Röhrchen gehängt und nach Zugabe von 1 ml Waschpuffer werden die Zellen mit dem Stopfen herausgedrückt.
- Ein Aliquot wird zum Zellzählen abgenommen und der Rest herunterzentrifugiert (300 g, 10 min, RmT)

*Expandierung von Stammzellen:*

- Die isolierten $CD34^+$-Zellen werden anschließend in Stammzellmedium mit den erforderlichen Zusätzen aufgenommen (siehe Protokoll für Stammzellmedium 3.2.1.4., ca. 2 x $10^5$ Zellen / ml) und zunächst für 14 Tage expandiert.
- Alle zwei Tage muß dafür die Zellzahl kontrolliert und gegebenenfalls gesplittet werden.

*in vitro Differenzierung von Stammzellen:*

- Im Anschluß an die Expansion können die Stammzellen *in vitro* in monocytäre bzw. granulocytäre Zellen differenziert werden.
- Die Differenzierung in monocytäre Zellen ist nach ca. 7 Tagen abgeschlossen und wird mit Hilfe von M-CSF als Mediumzusatz erreicht (siehe Protokoll für Differenzierungsmedium Monocyten).
- Granulocytäre Zellen entstehen durch Zusatz von G-CSF (siehe Protokoll für Differenzierungsmedium Granulocyten) im Verlauf von 14 Tagen.
- Begleitend kann eine Kontrolle der Zellmorphologie und eine Abschätzung der Vitalität mikroskopisch durchgeführt werden.
- Abschließend wurde eine morphologische Kontrolle mittels May-Grünwald-Giemsa-Färbung durchgeführt (siehe 3.2.1.5.) sowie eine Analyse der Oberflächenexpression von CD14 und CD66b (siehe 3.2.4.1.).
- Die fertig differenzierten Zellen werden für 3h mit LPS stimuliert, eine unstimulierte Kontrolle wird mitgeführt.

- Nach Ablauf der Stimulationszeit werden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst, herunterzentrifugiert und das Pellet in Lysispuffer aufgenommen. Das Lysat wird bis zur weiteren Verwendung eingefroren (-20°C)

### *3.2.1.4. Kultivierung und Stimulation der Zellen*

- Die in dieser Arbeit verwendeten Primärzellen werden stets bei 37°C, 5% $CO_2$ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.
- Die Stimulantien werden immer in der gleichen Konzentration eingesetzt (GM-CSF 50U/ml, LPS 250 ng/ml).
- Einen Überblick über die Zubereitung der Kulturmedien mit ihren Zusätzen gibt die folgende Tabelle:

*Verwendete Zellkulturmedien*

| | |
|---|---|
| Humanmedium | RPMI 1640<br>FCS (30min. bei 56°C inaktiviert) 10% v/v<br>L-Glutamin 1% v/v<br>Penicillin/Streptomycin 1% v/v |
| Stammzellmedium | StemSpan™ SF Expansion Medium<br>Penicillin/Streptomycin 1% v/v<br>Human Flt3-Ligand (50 ng/ml)<br>Human Stemcell Factor (SCF, 50 ng/ml)<br>Human Thrombopoietin (TPO, 20 ng/ml)<br>hyper-IL-6 (25 ng/ml) |
| Differenzierungsmedium Monocyten | RPMI 1640<br>FCS (30min. bei 56°C inaktiviert) 10% v/v<br>L-Glutamin 1% v/v<br>Penicillin/Streptomycin 1% v/v<br>Human M-CSF (25 ng/ml) |
| Differenzierungsmedium Granulocyten | RPMI 1640<br>FCS (30min. bei 56°C inaktiviert) 10% v/v<br>L-Glutamin 1% v/v<br>Penicillin/Streptomycin 1% v/v<br>Human G-CSF (10 ng/ml) |

| | |
|---|---|
| $^{35}$S-Labelling Medium für Proteinsynthesemessung | RPMI 1640 Cystein- und Methioninfrei<br>FCS (30min. bei 56°C inaktiviert) 10% v/v<br>L-Glutamin 1% v/v<br>Penicillin/Streptomycin 1% v/v<br>Redivue ProMix 0,1 mCi/ml<br>($^{35}$S-markiertes Methionin und Cystein) |

### *3.2.1.5. May-Grünwald-Giemsa Färbung*

*Prinzip:*

Durch die May-Grünwald-Giemsa Färbung werden die Zellen differentiell angefärbt, so dass sie lichtmikroskopisch unterscheidbar sind. Dies wird mit Hilfe mehrerer Farbstoffe erreicht. Die May-Grünwald Lösung besteht aus Eosin-Methylenblau, die Giemsa-Lösung enthält Azur-Eosin-Methylenblau. Durch die unterschiedlichen Färbungen der verschiedenen Kompartimente der Zellen sind die morphologischen Unterschiede der Zellen deutlich zu sehen. Kerne werden durch Einlagerung von Methylenblau in die DNA dunkel rötlich violett angefärbt, das Cytoplasma abhängig vom pH-Wert in den Myelocyten graurosa und in Lymphocyten hellblau. Die Thrombocyten erscheinen blass rötlichviolett und die Erythrocyten rosa. Während Monocyten wie auch Lymphocyten einen großen, in seiner Form gleichmäßig gerundeten Kern und nur wenig Cytoplasma aufweisen, verfügen die polymorphkernigen neutrophilen Granulocyten ihrem Namen entsprechend über einen gelappten Kern, der in jeder Zelle unterschiedlich geformt ist. Im Gegensatz zu den Granula der basophilen und eosinophilen Granulocyten, die sich blau bzw. rot färben, lassen sich die Granula der neutrophilen Granulocyten nicht anfärben.

*Verwendete Reagenzien:*

Aqua bidest.
Giemsalösung
May-Grünwald Färbelösung

*Angesetzte Lösungen:*

| | |
|---|---|
| frisch verdünnte Giemsalösung | 300 µl Giemsa-Lösung<br>ad 10 ml Aqua bidest. |

*Zellfärbung:*

- Ein Blutstropfen oder ca. 1x $10^6$ isolierte Zellen werden auf einen Objektträger getropft und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers dünn ausgestrichen.
- Der Ausstrich wird 15 min an der Luft getrocknet und anschließend für 3 min mit 1,5 ml May-Grünwald-Lösung bedeckt (Fixierung).
- Auf den Objektträger wird die gleiche Menge Aqua bidest. zugegeben und mit der May-Grünwald-Lösung vorsichtig gemischt. (Färbung 1)
- Nach 1 min wird die Färbelösung abgekippt und ohne zu spülen der Ausstrich für 10-15 min mit frisch verdünnter Giemsalösung bedeckt (Färbung 2).
- Anschließend wird der Objektträger von beiden Seiten gründlich mit Aqua bidest. abgespült, an der Luft getrocknet und kann dann unter dem Mikroskop betrachtet werden.

#### *3.2.1.6. Subzelluläre Fraktionierung*

*Prinzip:*

Die PMN werden mittels eines besonders schonenden Verfahrens lysiert, der Stickstoff-Dekompressionsmethode. Die Zellsuspension wird in ein Druckgefäß gegeben und unter langsam ansteigendem Druck löst sich eine große Menge Stickstoff in den Zellen. Bei anschließendem, plötzlichem Druckabfall, entstanden durch rauströpfeln der Zellsuspension aus dem Druckbehälter, expandiert der gelöste Stickstoff in Form von vielen kleine Blasen. Diese Blasen zerstören die Zellmembran und lysieren so die Zelle.

Anders als mit mechanischen Lysemethoden wie French Press oder Ultraschall entwickelt sich hier keine Wärme, im Gegenteil kühlt sich die Zellsuspension durch die Expansion des Gases sogar ab. Da jede einzelne Zelle den Druckabfall mitmacht, findet eine sehr homogene, quantitative Lyse statt. Anschließend werden die verschiedenen Granulatypen durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten aufgetrennt. Das Protokoll für die subzelluläre Fraktionierung wurde Kjeldsen et al., 1999 entnommen.

*Verwendete Reagenzien:*

Aqua bidest.

Natrium-ATP ($ATPNa_2$)

EGTA

Kaliumchlorid (KCl)

KRG

Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)

Natriumchlorid (NaCl)

Percoll

PIPES

PMSF

*Angesetzte Lösungen:*

| | |
|---|---|
| Disruption Puffer, 1x<br>(pH 7,2) | Aqua bidest.<br>KCl 100 mM<br>NaCl 3 mM<br>$MgCl_2$ 3,5 mM<br>PIPES 10 mM<br><br>frisch dazu:<br>$ATPNa_2$ 50 mM<br>PMSF 100 mM |
| Percoll 1,050 g/ml | 10,2 ml Percoll (1,131 g/ml)<br>3 ml 10x Relaxation Puffer<br>ad 30 ml Aqua bidest. |
| Percoll 1,120 g/ml | 26,2 ml Percoll (1,131 g/ml)<br>3 ml 10x Relaxation Puffer<br>ad 30 ml Aqua bidest. |

| | |
|---|---|
| Relaxation Puffer, 10x<br>(pH 7,2) | Aqua bidest.<br>KCl 1000 mM<br>NaCl 30 mM<br>$MgCl_2$ 35 mM<br>PIPES 100 mM<br>EGTA 12,5 mM<br><br>frisch dazu:<br>$ATPNa_2$ 50 mM |

*Herstellung des Percoll-Gradienten (2 Stufen):*

- Percoll, 10x Relaxation Puffer und Aqua bidest. werden wie angegeben zu zwei Lösungen unterschiedlicher Dichte zusammen pipettiert.
- Jeweils 15 ml der Lösung mit der Dichte 1,120 g/ml wird in klare Polypropylen-Zentrifugenbecher pipettiert und jeweils 15 ml der Lösung mit der Dichte 1,050 (g/ml) vorsichtig darüber geschichtet.
- Mit den angegebenen Volumina können zwei Percoll-Gradienten vorbereitet werden. Die Gradienten werden bis zur Verwendung am gleichen Tag auf 4°C vorgekühlt.
- Formel für die Berechnung der Percoll-Lösungen:
  $V_p = V_0(D_0\text{-}1.0056)/(D_p\text{-}1)$
  Dabei ist $V_p$ das benötigte Volumen der Percoll-Stocklösung, $V_0$ das Endvolumen der angesetzten Lösung, $D_0$ die Dichte der gewünschten Lösung, $D_p$ die Dichte der Percoll-Stocklösung (hier 1,131 g/ml) und 1.0056 die Dichte des 10x Relaxation Buffers.

*Durchführung:*

- Fertig isolierte PMN (ca. 4 x $10^8$ Zellen, siehe 3.2.1.1.) werden in 10 ml eiskalter KRG aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend wird alles herunterzentrifugiert (300 g, 5 min, 4°C) und in 20 ml Disruption Puffer resuspendiert.
- Die Zellsuspension wird in das vorgekühlte Zellaufschlussgefäß gegeben, fest verschlossen und der Stickstoff langsam aufgedreht bis auf 380 psi.

- Nach 5 min Äquilibrierung wird die Zellsuspension über das Auslassventil langsam in 300 µl EGTA (100 mM, pH 7,4) getröpfelt. Bei Kontakt mit Atmosphärendruck lysieren die Zellen.
- Nuclei und restliche ganze Zellen werden anschließend bei 400 g für 15 min pelletiert und der Überstand vorsichtig auf den vorbereiteten Percollgradienten geschichtet.
- Der Percollgradient wird bei 37.000 g für 30 min (4°C) zentrifugiert.
- Die einzelnen Fraktionen ordnen sich folgendermaßen an:

  Fraktion 1, der Überstand über den beiden Percoll-Lösungen, enthält alle cytoplasmatischen Bestandteile. Von unten angefangen folgen dann Fraktionen 2 bis 4: Die Fraktion 2 (azurophile Granula) befindet sich deutlich sichtbar pelletiert am Boden des Zentrifugenbechers. Im Bereich der Phasentrennung zwischen den Percoll-Lösungen befindet sich Fraktion 3, die die spezifischen und Gelatinase Granula enthält. Auf der Percoll-Lösung mit der geringeren Dichte ist dann Fraktion 4 (Membranfragmente).
- Mit Hilfe einer Pasteurpipette können die einzelnen Fraktionen abgenommen und in frische 50 ml Zentrifugenbecher überführt werden.
- Um das Percoll aus den Fraktionen herauszuwaschen, werden die vier Zentrifugenbecher mit Disruptions Puffer auf 50 ml aufgefüllt und 30 min bei 20.000g zentrifugiert (4°C).
- Das biologische Material kann anschließend als lockeres Pellet mit einer Pasteurpipette in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt werden.
- Die einzelnen Fraktionen werden mit 1% Triton vermischt, 15 min auf Eis inkubiert und für die weitere Verwendung im Rahmen einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese bei –20°C verwahrt.
- Direkt vor der Gelelektrophorese werden die Ansätze aufgetaut, mit 2.000 g für 3 min zentrifugiert und der Überstand verwendet.

### *3.2.1.7. Proteinsynthesemessung mit $^{35}S$*

*Prinzip:*

Frisch isolierte Neutrophile und als Kontrolle PBMC werden in Medium kultiviert, welches radioaktiv markierte Aminosäuren beinhaltet. In neu translatierte Proteine werden diese Aminosäuren eingebaut und eine *de novo* Synthese kann durch das radioaktive Signal nachgewiesen werden. Für dieses Experiment wird eine Mischung von radioaktiv markiertem Methionin und Cystein verwendet, da das reife IL-8 kein Methionin aufweist. Die Zellen werden wie gewohnt stimuliert und lysiert. Anschließend wird eine Immunpräzipitation mit Antikörpern auf IL-1RA und auf IL-8 durchgeführt, die Präzipitate mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mit einer Autoradiographie sichtbar gemacht (siehe auch 3.2.2.3.).

*Verwendete Reagenzien:*

Cystein- und Methionin-freies Medium (zum Waschen)
Dithiothreitol (DTT)
EDTA
NaCl
Natriumvanadat
Pefabloc
Protease Inhibitor Cocktail
TrisBase
Triton X-100
$^{35}$S-Labellingmedium für Proteinsynthesemessungen (siehe 3.2.1.4.)

*Angesetzte Lösungen:*

| | |
|---|---|
| Lysispuffer (pH 8,0): | EDTA 1 mM |
| | NaCl 50 mM |
| | TrisBase 50 mM |
| | immer frisch dazugeben: |
| | DTT 0,5 mM |
| | Natriumvanadat 0,1 mM |
| | Pefabloc 0,5 mM |
| | Protease Inhibitor Cocktail 1% v/v |
| | Triton X-100 1% (v/v) |

*Durchführung:*

- Aufgrund der Radioaktivität muß im Isotopenlabor auf gummiertem Filterpapier gearbeitet werden. Es werden gestopfte Spitzen verwendet und alle Abfälle gesondert entsorgt. Ein Strahlenmonitor wird benutzt um eventuelle Kontaminationen mit Radioaktivität zu erkennen.
- Die frisch isolierten PMN und PBMC werden einmal in Cystein- und Methionin-freiem Medium gewaschen (300 g, 10 min, RT) und gezählt.
- 3 x $10^7$ PMN bzw. 1 x $10^7$ PBMC werden herunterzentrifugiert und in 6 ml bzw. 2 ml $^{35}$S-Labelling Medium für Proteinsynthesemessung (siehe 3.2.1.4.) aufgenommen.
- Die Zellen werden mit Stimulanzien (LPS, GM-CSF) in einer 6 Loch-Platte für 3h im Brutschrank kultiviert. Aufgrund der Aerosolbildung des $^{35}$S-haltigen Mediums sollte die Platte mit Parafilm versiegelt werden.
- Nach Ablauf der Inkubation werden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst, und herunterzentrifugiert (300 g, 10 min, 4°C).
- Die Pellets werden in je 1000 µl fertigen eiskalten Lysispuffer aufgenommen, 15 min auf Eis inkubiert und bei –20°C aufbewahrt.

### 3.2.2. Proteinchemische Methoden

#### *3.2.2.1. ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay)*

*Prinzip:*

Die ELISA-Technik ist ein sensitives Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinen - hier Cytokinen -, die spezifisch an Antikörper auf einer entsprechend beschichteten Mikrotiterplatte binden. Nach Bindung des Antigens an den Primärantikörper wird im zweiten Schritt ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper aufgetragen, der an ein anderes Epitop des zu messenden Cytokins bindet. Nach Inkubation und mehrmaligem Waschen kann im letzten Schritt das zugegebene Substrat durch die Peroxidase in einen Farbstoff umgesetzt werden. Die Extinktion wird photometrisch gegen einen Leerwert bestimmt und ist der Cytokin-Konzentration direkt proportional. Für die Bestimmung der IL-1β, IL-8 und IL-6 Sekretion wurden OptEIA ELISA-Sets der Firma BD Biosciences

verwendet, für die Messung von IL-1RA im Überstand ein ELISA-Set der Firma R&D Systems.

*Verwendete Reagenzien und Protokoll:*

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten und die Durchführung des ELISAs erfolgte exakt nach der Anleitung des Herstellers.

#### *3.2.2.2. Probenaufbereitung für die Gelelektrophorese und Westernblot*

*Prinzip:*

Die Zellen werden lysiert und vor der Verwendung in der Gelelektrophorese der Proteingehalt im Lysat bestimmt, damit die Proben hinsichtlich ihres Gesamtproteingehaltes angeglichen werden können. Die Proteingehaltsbestimmung wird nach der Methode von Bradford durchgeführt und erfolgt mit Hilfe des BIO-RAD-Reagenz.

*Verwendete Reagenzien:*

Aqua Spüllösung
BIORAD Reagenz
BSA
DTT
EDTA
NaCl
Natriumvanadat
Pefabloc
Protease Inhibitor Cocktail
TrisBase
Triton X-100

*Angesetzte Lösungen:*

| | |
|---|---|
| BSA-Lösung | BSA 10 mg<br>ad 10 ml Aqua Spüllösung |

| | |
|---|---|
| Lysispuffer (pH 8,0): | EDTA 1 mM<br>NaCl 50 mM<br>TrisBase 50 mM<br><br>immer frisch dazugeben:<br>DTT 0,5 mM<br>Na-Vanadat 0,1 mM<br>Pefabloc 0,5 mM<br>Protease Inhibitor Cocktail 1% v/v<br>Triton X-100 1% (v/v) |

*Lyse der Zellen:*

- Nach Ablauf der Stimulationszeit werden die Zellen mittels eines Zellschabers gelöst und pelletiert (300 g, 10 min, RT).
- Das Zellpellet wird in 100 µl pro $2x10^6$ Zellen Lysispuffer aufgenommen, für 15min auf Eis inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.
- Nach dem Auftauen werden die Membranfragmente abzentrifugiert (10 min. bei 2.000 g, 4°C) und der Überstand abgenommen (enthält die gewünschten Proteine).

*Proteingehaltsbestimmung:*

- 4µl Probe (in Lysispuffer) werden in 796 µl $H_2O$ verdünnt, mit 200µl Bradford-Reagenz versetzt und 5 min. inkubiert.
- Die Messung der Extinktion bei 595 nm erfolgt im Vergleich zum Blindwert (Lysispuffer mit $H_2O$ und Bradford-Reagenz).
- Die Werte werden mit Hilfe einer Eichgeraden ausgewertet, welche mittels einer Verdünnungsreihe von BSA (1 µg bis 25 µg) in Lysispuffer erstellt wird. Bei jeder Proteingehaltsbestimmung wird eine neue Eichgerade erstellt.

### *3.2.2.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese*

*Prinzip:*

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von denaturierten Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Anschließend können die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran „geblottet“ und mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Alternativ kann bei der Detektion von radioaktiv markierten Proteinen (siehe 3.2.1.7.) auch eine Autoradiographie direkt vom getrockneten Gel hergestellt werden.

*Verwendete Reagenzien:*

Acrylamid/Bisacrylamid 30% Lösung
Ammoniumpersulfat (APS)
Aqua bidest.
Aqua Spüllösung
Bromphenolblau
β-Mercaptoethanol
Glycin
Molekulargewichtsmarker
rekombinante Proteine IL-1β, IL-1RA 17kDa, IL-6, IL-8
Saccharose
SDS
TEMED
TrisBase
TrisHCl

*Angesetzte Lösungen:*

| | |
|---|---|
| APS-Stamm (10%): | APS 0,1g<br>ad 1ml Aqua Spüllösung |
| SDS-Stamm (20%): | SDS 200g<br>ad 1000ml Aqua bidest.<br>bei 70-80°C lösen |

| | |
|---|---|
| Laemmli-Puffer (7x): | Saccharose 56g<br>SDS 14g<br>in Sammelgel-Puffer lösen,<br>β-Mercaptoethanol 1,4 µl<br>und eine Spatelspitze Bromphenolblau<br>dazu,<br>ad 100ml Sammelgel-Puffer |
| Elektroden-Puffer: | TrisBase 3,03 g<br>Glycin 14,4g<br>SDS (20%ige Lösung) 5ml<br>ad 1000ml Aqua bidest. |
| Sammelgel-Puffer (pH 6,8): | TrisHCl 6,05g<br>SDS ( 20%ige Lösung) 2ml<br>ad 100ml Aqua bidest. |
| Trenngel-Puffer (pH 8,8): | TrisHCl 18,15g<br>SDS ( 20%ige Lösung) 2ml<br>ad 100ml Aqua bidest. |

*Gele:*

Sammelgel, 5%:

| | 1 Gel (1,5mm), 6 ml |
|---|---|
| Aqua bidest. | 3,66 ml |
| Sammelgelpuffer | 1,56 ml |
| AA-Stamm (30%) | 780 µl |
| APS-Stamm (10%) | 60 µl |
| TEMED | 6 µl |

Trenngel, 15%:

| | 1 Gel (1,5mm), 9 ml |
|---|---|
| Aqua bidest. | 2,16 ml |
| Trenngelpuffer | 2,34 ml |
| AA-Stamm (30%) | 4,5 ml |
| APS-Stamm (10%) | 90 µl |
| TEMED | 9 µl |

*Protokoll:*

- Die Glasplatten werden mit Ethanol und fusselfreien Tüchern gesäubert und in die Gießhalterung eingebaut.
- Die Komponenten für das Trenngel (15%) werden gemischt, luftblasenfrei zwischen die Glasplatten pipettiert, mit Aqua bidest. überschichtet und ca. 20 min zum Polymerisieren stehen gelassen.
- Anschließend wird das Wasser abgegossen, die Bestandteile für das Sammelgel (5%) gemischt, luftblasenfrei auf das Trenngel (15%) pipettiert, der Gelkamm wird eingesetzt und das Gel ca. 20 min zum Polymerisieren stehen gelassen.
- Die Glasplatten mit dem fertig polymerisierten Gel werden in die Montagehalterung festgeklemmt und diese in die Elektophoresekammer eingespannt.
- Der Elektrodenpuffer wird in die Kammer gefüllt und der Gelkamm vorsichtig entfernt.
- Mit Hilfe einer Spritze und Kanüle werden die Geltaschen gespült.
- Die Proben werden mit Lysispuffer verdünnt, so dass jeweils die gleiche Menge an Protein in 30 µl aufgetragen werden kann (siehe Proteinbestimmung 3.2.2.2.).
- Zu jeder Probe wird 5µl Laemmli- Puffer (7x) gegeben und zur Denaturierung werden die Proben 5 min. bei 95°C erhitzt.
- Der Molekulargewichtsgrößenstandard (5 µl) wird ebenfalls mit Lysispuffer (25 µl) verdünnt und mit Laemmli-Puffer (5 µl, 7x) versetzt und für 5 min. bei 95°C erhitzt.
- Die Proben und der Molekulargewichtsgrößenstandard werden in die Geltaschen pipettiert und die Proteine bei 200V für ca. 1h aufgetrennt.

### *3.2.2.4. Western Blotting und Detektion*

*Prinzip:*

Mittels Western Blotting können die in der SDS-PAGE (siehe 3.2.2.3.) aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Bei diesem Verfahren kommt ein Blot-Sandwich zu Einsatz, bestehend aus Schwammkissen, Filterpapier, Nitocellulosemembran, Gel, Filterpapier und Schwammkissen. Die Proteine werden durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf die Membran übertragen.

Anschließend werden die gesuchten Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert. Um sicherzustellen, dass negative Ergebnisse im Fall von IL-1β und IL-6 nicht auf zuwenig Protein zurückzuführen sind, wird die Membran „gestrippt“ und erneut mit spezifischen Antikörpern gegen IL-1RA bzw. IL-8 inkubiert.

*Verwendete Reagenzien:*

Aqua bidest.
β-Mercaptoethanol
Glycin
LumiGLO
Magermilchpulver
Methanol
NaCl
Peroxid
Ponceau-S-Lösung
SDS
TrisBase
TrisHCl
Tween-20

*Angesetzte Lösungen:*

| | |
|---|---|
| Transferpuffer (pH 8,3): | TrisBase 3,03 g<br>Glycin 14,4 g<br>Methanol 200 ml<br>ad 1000 ml Aqua bidest. |
| TrisHCl-Stamm (1M): | TrisHCl 78,8 g<br>ad 500 ml Aqua bidest. |
| TBS (1x) (pH 7,5) | TrisHCl-Stamm 20 ml<br>NaCl 8,8 g<br>ad 1000 ml Aqua bidest**.** |
| TBS/T (pH 7,5): | Tween 20 1 ml<br>ad 1000 ml TBS(1x) |
| Blocking-Puffer: | Magermilchpulver 2,5 g<br>ad 50 ml TBS/T |

| | |
|---|---|
| Stripping-Puffer (pH 6,8): | TrisBase 7,6 g<br>SDS 20 g<br>β-Mercaptoethanol 7 ml<br>ad 1000 ml Aqua bidest. |
| Primärantikörper-Verdünnung:<br>1:500 | 20 µl in 10 ml Blockingpuffer |
| Sekundärantikörper-Verdünnung:<br>1:1000 | 10 µl in 10 ml Blocking-Puffer |
| Tertiärantikörper-Verdünnung:<br>1:1000 (Nur IL-8) | 10 µl in 10 ml Blocking-Puffer |
| Detektionslösung (frisch ansetzen): | LumiGLO (20x) 0,5 ml<br>Peroxid (20x) 0,5 ml<br>ad 10 ml Aqua bidest. |

*Western Blotting und Detektion:*

- Membran und Filterpapier werden auf Größe des Gels zurechtgeschnitten und zuammen mit Schwammkissen und Gel kurz in Transferpuffer äquilibriert
- Das Blot-Sandwich wird zusammengebaut und in das Blot-Modul gesetzt, die Kühleinheit hinzugefügt und der Transferpuffer eingefüllt.
- Über Nacht wird bei 30V konstant geblottet
- Die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran wird durch eine Ponceaufärbung bestätigt. Dafür wird die Membran für 5 min in der Ponceau-S-Lösung gefärbt und anschließend unter fließendem, deionisiertem Wasser entfärbt. Die Proteine erscheinen als rote Banden.
- Eine vollständige Entfärbung wird durch Schwenken in Transferpuffer für ca. 10 min erreicht.
- Mit ca. 25ml Blocking-Puffer wird die Membran 2h bei Raumtemperatur inkubiert (Blocken der Membran).
- Die Membran wird mit dem Primärantikörper in Plastikfolie eingeschweißt, für 2h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert und anschließend dreimal für 5 min mit TBS/T gewaschen.
- Mit dem Sekundärantikörper wird die Membran für 1h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal mit TBS/T gewaschen

- Zur Detektion wird die Membran für 1 min in die Detektionslösung gelegt, vorsichtig geschwenkt und dann in Frischhaltefolie eingewickelt in einer Belichtungskassette befestigt.
- Für zunächst 10 s wird ein Röntgenfilm belichtet und anschließend entwickelt. Bei Bedarf ist dies mit längeren Belichtungszeiten zu wiederholen.

*Stripping der Membran:*

- Die Membran wird dreimal mit TBS/T gewaschen und 30 min. bei 70°C mit Stripping-Puffer unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.
- Danach wird erneut dreimal mit TBS/T gewaschen und die Membran kann jetzt, beginnend mit dem Schritt „Blocken" wiederverwendet werden.

### 3.2.3. Molekularbiologische Methoden

#### *3.2.3.1. RNA-Isolierung*

*Prinzip:*

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde mittels eines Fertigreagenzes (Trizol) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Guanidinisothiocyanat ist ein chaotropes Salz, das sehr effektiv Proteine denaturiert, sogar RNasen. Während der Lyse und Aufbewahrung im Trizol ist die empfindliche RNA daher stabil. Nach Zugabe von Chloroform trennt sich eine wässrige Phase ab, in der dann die RNA lokalisiert ist und durch Zugabe von Isopropanol präzipitiert werden kann. Da die RNA nach dem Abnehmen der wässrigen Phase leicht durch RNasen degradiert werden kann, müssen alle Arbeitsschritte unter streng RNase-freien Bedingungen durchgeführt werden. Alle benötigten Plastikmaterialien waren vor Gebrauch steril verpackt und es wird RNase freies Wasser verwendet. Bei allen Arbeiten werden Einmal-Latexhandschuhe getragen.

*verwendete Reagenzien:*

Aqua bidest.

Chloroform

DEPC

Ethanol

Isopropanol

Trizol® Reagenz

*Angesetzte Lösungen:*

| | |
|---|---|
| DEPC-behandeltes Wasser (RNase-frei) | Aqua bidest.<br>DEPC 0,01% w/v<br>über Nacht stehen lassen,<br>dann autoklavieren |
| 75% Ethanol (RNase-frei) | DEPC-behandeltes Wasser<br>Ethanol 25% v/v |

*RNA-Präparation:*

- Das Zellpellet von $1x10^7$ Zellen wird in 1 ml Trizol gründlich resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Bei Bedarf kann das Lysat bei –80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren werden.
- 200 µl Chloroform wird hinzupipettiert und das Eppendorf Reaktionsgefäß (verschlossen) für 15 s kräftig geschüttelt, dann für 2 –3 min bei RT stehen gelassen.
- Anschließend wird mit 12.000 g bei 4°C für 15 min zentrifugiert. Es bildet sich eine untere, rötliche Phenol-Chloroform Phase, eine schleimig-weiße Interphase und die obere, wässrige Phase.
- Die obere, wässrige Phase wird absolut ohne Interphase in ein neues Röhrchen transferiert und mit Hilfe von 500 µl Isopropylalkohol RNA präzipitiert. Der Ansatz wird dafür 10 min bei RT stehen gelassen und anschließend bei 12.000 g, 4°C 10 min zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Pellet einmal mit 1 ml 75% EtOH (DEPC) gewaschen (vortexen und bei 7.500 g, 4°C 5 min zentrifugieren.)
- Erneut wird der Überstand verworfen und das Pellet 5 – 10 min an der Luft trocknen gelassen.
- Anschließend wird das RNA-Pellet in 15 µl RNase freiem Wasser durch auf- und abpipettieren und 10 min Inkubation bei 55-60°C resuspendiert.

### *3.2.3.2. Bestimmung des RNA-Gehaltes*

*Prinzip:*

Durch spektralphotometrische Messung der optischen Dichte lässt sich sowohl die Menge als auch die Reinheit der zuvor isolierten RNA quantifizieren. Während Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm ein Maximum ihrer Lichtabsorption aufweisen, befindet sich das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die absolute Extinktion der Lösung gegen Wasser bei 260 nm ist nach dem Lambert-Beer-Gesetz linear vom Nukleinsäure-Gehalt abhängig, wohingegen der Quotient beider Extinktionswerte (260 nm/280 nm, sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen) ein Maß für die Kontamination der Probe mit Proteinen darstellt.

*Verwendete Reagenzien:*

RNase-freies Wasser (siehe 3.2.3.1.)

*Durchführung*

- Zur Bestimmung der RNA-Konzentration werden 2 µl der RNA mit 98 µl RNase freiem Wasser in eine UV-Einweg Küvette gegeben und im Photometer gemessen

### *3.2.3.3. Reverse Transkription (cDNA Synthese)*

*Prinzip:*

Mittels der Reversen Transkription (RT) kann RNA revers in cDNA transkribiert werden. Die Abkürzung cDNA steht dabei für complementary (= komplementäre) DNA. Analog zur PCR werden Puffer, Primer, Nukleotide, Enzym und Template in ein Gefäß pipettiert. Meist werden noch RNase-Inhibitoren zugesetzt. Oft gewährleisten oligo dT- Primer (12-18 Nukleotide lange Thymidinoligomere), dass ausschließlich mRNA als Template für die cDNA-Synthese verwendet wird. Die oligo dT-Nukleotide sind komplementär zum Poly-A-Schwanz am 3`-Ende der mRNA und bilden so mit diesem einen DNA/RNA-Doppelstrang, der dem Enzym, der Reversen Transkriptase, als Ausgangspunkt zur Synthese der cDNA dient.

*Verwendete Reagenzien:*

BIORAD iscript cDNA synthesis Kit

*Durchführung:*

- Die cDNA Synthese erfolgt weitgehend nach Anleitung des Herstellers, wobei 1 µg RNA pro 1-fachem Ansatz eingesetzt wird.
- Der Synthese-Schritt bei 42°C wird jedoch auf eine Stunde erhöht. Das Volumen des zugefügten Wassers richtet sich nach dem in Schritt 3.2.3.2. bestimmten Volumen von 1 µg RNA.
- Alle benutzten Reagenzien sind Bestandteil des Kits und wurden nach folgendem Schema pipettiert:

| | |
|---|---|
| 5x iscript Reaction Mix (Puffer) | 4 µl |
| iscript Reverse Transcriptase | 1 µl |
| RNase-freies Wasser | 15 - x µl |
| RNA-Template (1 µg) | x µl |
| Gesamtvolumen | 20 µl |

- Die cDNA-Synthese findet in einem Eppendorf-Gefäß in einem Thermoblock nach folgendem Temperaturprofil statt:

| | |
|---|---|
| 25°C | 5 min |
| 42°C | 60 min |
| 85°C | 5 min |

- Anschließend wird die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

### *3.2.3.4. Real-time PCR (Echtzeit-Polymerasekettenreaktion)*

*Prinzip:*

Die Real-time PCR kann angewendet werden, wenn eine quantitative Aussage bezüglich der zu untersuchenden mRNA gewünscht wird.

Diese PCR basiert auf der Detektion und Quantifizierung eines Fluoreszenz-Reporters, dessen Signal direkt proportional zur Menge des PCR-Produkts in der Reaktion zunimmt. Zusätzlich zu den PCR-Primern kommt hier eine „Sonde“ zum Einsatz, welche 20-30 Nukleotide groß ist und sich während der Annealingphase an die innere Region des zu amplifizierenden Bereichs anlagert. Diese Sonde ist am

5`-Ende mit einem Fluoreszenz-Farbstoff (hier: FAM) und am 3´-Ende mit einem Quencher (hier: TAMRA) versehen. Ist die Sonde intakt, emittiert der Fluoreszenz-Farbstoff bei Bestrahlung kein Licht wegen seiner Nähe zum Quencher, auf den die für die Fluoreszenz notwendige Energie aufgrund des FRET-Phänomens (Fluorescence Resonance Energy Transfer) übertragen wird. Während der Amplifikation wird die Sonde jedoch durch die 5´-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase gespalten. Durch die räumliche Trennung wird das FRET-Phänomen aufgehoben und der Fluoreszenz-Farbstoff emittiert detektierbares Licht.
Durch die Aufzeichnung der Fluoreszenz-Emission in jedem Zyklus wird das Beobachten der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion möglich. Dabei wird der Parameter $C_T$ als diejenige Zyklusnummer definiert, in der die Fluoreszenz-Emission einen bestimmten, frei wählbaren Schwellenwert übersteigt. Bei der relativen Quantifizierung wird der $C_T$-Wert des zu untersuchenden Gens auf den $C_T$-Wert eines housekeeping-Gens, ein ubiquitär exprimiertes Gen (hier: GADPH), normalisiert, um die Expression des Gens mit anderen Genen vergleichbar zu machen.

*Folgende Primer und Sonden wurden verwendet:*

| Name: | Sequenzen: |
|---|---|
| GAPDH | Sense-Primer:<br>TGC TGA TGC CCC CAT GTT C<br>Antisense-Primer:<br>GGC AGT GAT GGC ATG GAC TG<br>Sonde:<br>6FAM-TCA AGA TCA TCA GCA ATG CC XT CC TGC A - PH |
| sIL-1RA/<br>icIL-1RA<br>(16kDa) | Sense-Primer:<br>CCT CCG CAG TCA CCT AAT CAC T<br>Antisense-Primer:<br>TGG TTG TTC CTC AGA TAG AAG GTC TT<br>Sonde:<br>6FAM-TAA CAT CCC AGA TTC TGA AGG CTT GCA TC XT-PH |
| icIL-1RA<br>(18kDa) | Sense-Primer:<br>CAT GGC TTT AGA GAC GAT CTG C<br>Antisense-Primer:<br>TGG TTG TTC CTC AGA TAG AAG GTC TT<br>Sonde:<br>6FAM-TAA CAT CCC AGA TTC TGA AGG CTT GCA TC XT-PH |
| IL-8 | Sense-Primer:<br>TCT TGG CAG CCT TCC TGA TTT C<br>Antisense-Primer:<br>TGT GGT CCA CTC TCA ATC ACT CTC A<br>Sonde:<br>6FAM-CAG CTC TGT TGA AGG TGC AGT TTT GCC AA XT – PH |

- Für icIL-1RA 18kDa und sIL-1RA/icIL-1RA 16kDa wurden die zum amplifizierenden Sequenzen so ausgewählt, dass die Sonde und der Antisense-Primer für beide PCRs genutzt werden konnten, nur der Sense-Primer unterscheidet zwischen sIL-1RA/icIL-1RA 16kDa und icIL-1RA 18kDa.
- Die zu untersuchende mRNA wurde mittels Reverser Transkription (siehe 3.2.3.3.) bereits in cDNA umgeschrieben.
- Sowohl für das housekeeping-Gen GAPDH als auch für die zu untersuchenden Cytokine werden stets je ein separater Mastermix pipettiert.

*Verwendete Reagenzien pro Ansatz (50 µl):*

| Reagenz: | Volumen: | Endkonzentration: |
|---|---|---|
| Aqua ad injectabilia | 34 µl | |
| PCR-Puffer, 15mM | 5,0 µl | 1,5 mM |
| $MgCl_2$, 25mM | 5,0 µl | 2,5 mM |
| dNTP, 10mM | 1,0 µl | 0,2 mM |
| Sense-Primer, 20µM | 0,75 µl | 0,3 µM |
| Antisense-Primer, 20µM | 0,75 µl | 0,3 µM |
| Rox, 100mM | 0,5 µl | 1 mM |
| Sonde, 20µM | 0,5 µl | 0,2 µM |
| HotStar-Taq-Qiagen 5U/µl | 0,5 µl | 0,05 U/µl |

*Durchführung:*

- Der Mastermix wird auf Eis in einem sterilen Polypropylenröhrchen pipettiert.
- Zunächst werden 48 µl Mastermix und anschließend 2 µl cDNA in die Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettiert (50 µl Gesamtansatz je Vertiefung). Dabei wird jede Probe als Dreifach-Bestimmung angesetzt
- Die Reaktionsplatte wird mit einer Folie abgedeckt und in den Cycler gestellt und folgende Temperaturprofile eingestellt.

*PCR-Temperaturprofile:*

| sIL-1RA/icIL-1RA 16kDa | | |
|---|---|---|
| 50°C | 2 min | 1x |
| 95°C | 15 min | 1x |
| 95°C | 30 sec | 45x |
| 60°C | 60 sec | |

| icIL-1RA 18kDa | | |
|---|---|---|
| 50°C | 2 min | 1x |
| 95°C | 15 min | 1x |
| 95°C | 30 sec | 45x |
| 60°C | 60 sec | |

| IL-8 | | |
|---|---|---|
| 50°C | 2 min | 1x |
| 95°C | 15 min | 1x |
| 95°C | 15 sec | 45x |
| 60°C | 60 sec | |

### 3.2.4. Immunologische Methoden

#### *3.2.4.1. Durchflußcytometrische Analyse von Oberflächenantigenen*

*Prinzip:*

Zelloberflächenmoleküle, die von bestimmten monoklonalen Antikörpern erkannt werden, bezeichnet man als *cluster of differentiation*, kurz CD. In der Reihenfolge ihrer Entdeckung wurden sie nummeriert, und können zur Charakterisierung von Zellen herangezogen werden. CD62L steht für das von allen Leukocyten exprimierte Adhäsionsmolekül L-Selektin. Es kann als Aktivierungsmarker für die frisch isolierten Neutrophilen benutzt werden. Eine starke Expression von CD62L spricht dafür, dass die Zellen nicht schon durch die Präparation aktiviert wurden, da L-Selektin bei Aktivierung abgeworfen wird („shedding"). Die endgültige Funktion von CD66b ist noch nicht geklärt (siehe Einleitung), da es jedoch nur von Granulocyten exprimiert wird, dient es als pan-Granulocytenmarker. CD14 ist der

LPS Rezeptor und wird von Monocyten hoch, aber auch von Neutrophilen schwach exprimiert.

Die zu untersuchenden Zellen werden mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert. Um nur die spezifische Bindung auszuwerten, wurden mit Hilfe von Isotypkontrollen die Grenzen gesetzt. Isotypkontrollen sind Antikörper des gleichen Isotyps wie der benutzte, z.B. IgG1 oder IgG2b, die jedoch eine Spezifität aufweisen, für die im untersuchten Organismus kein Antigen existiert. Auf diese Weise kann die unspezifische Bindung durch z.B. Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von der spezifischen, die Antigenbindungsstelle des Antikörpers betreffend, unterschieden werden. Am Durchflußcytometer wird anschließend die Intensität der Fluoreszenz pro Zelle gemessen.

*Verwendete Reagenzien:*

Antikörper und zugehörige Isotypkontrollen:

| | | | |
|---|---|---|---|
| CD14 PE | unverd., 20 µl | IgG2b | 1:4, 20 µl |
| CD62L PE | unverd., 20 µl | IgG1 PE | unverd., 20 µl |
| CD66b FITC | unverd., 20 µl | IgG1 FITC | unverd., 20 µl |

BSA

PBS

*Angesetzte Lösungen*:

| | |
|---|---|
| PBS 1% BSA | BSA 1 g<br>ad 100 ml PBS |

*Färbung und durchflußcytometrische Analyse:*

- Für jeden Ansatz werden $2x10^6$ Zellen in 200 µl PBS/BSA aufgenommen und in zwei Polystyrol-FACS-Röhrchen jeweils 100 µl gegeben.
- Jeweils 20 µl des fertig verdünnten Antikörpers werden in das eine und die ebenfalls fertig verdünnte zugehörige Isotypkontrolle in das andere Röhrchen gegeben und 15 - 20 min inkubiert.
- Die Intensität der Fluoreszenz wird mit Hilfe eines Durchflußcytometers gemessen.

- Dabei ist die Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle ein Maß für die unspezifische Bindung, als spezifisches Signal wird eine Erhöhung der Fluoreszenz in Bezug auf die Isotypkontrolle gewertet.

#### *3.2.4.2. Intrazelluläre Färbung von Cytokinen in Neutrophilen*

*Prinzip:*

Die Zellen werden mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend wird mit dem Detergenz Saponin die Zellmembran perforiert. Dadurch können Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper in die Zelle eindringen und eventuell vorhandenes IL-8 detektieren.

*Verwendete Reagenzien:*

BSA
FACS Lyse Lösung
Hanks' Balanced Salts (HBSS)
HEPES
Natriumhydrogencarbonat
Paraformaldehyd (PFA)
PBS
PE-konjugierter Maus Anti-humanes IL-8 Antikörper IgG2b
PE-konjugierte Isotypkontrolle Maus IgG2b
Saponin

*Angesetzte Lösungen:*

| | |
|---|---|
| HBSS | 1 Glas HBSS – Pulver<br>Natriumhydrogencarbonat 0,35 g<br>ad 1000 ml $H_2O$ |
| PFA 4% | PFA 500 mg<br>ad 12,5 ml HBSS<br>(bei 50°C lösen) |
| Saponinpuffer (10%, Stocklösung) | Saponin 1 g<br>ad 10 ml HBSS |

| | |
|---|---|
| Saponinpuffer (Gebrauchslösung) | Saponin 10% 500 µl<br>HEPES 500 µl<br>ad 50 ml HBSS |
| PBS 1% BSA | BSA 1 g<br>ad 100 ml PBS |

*Durchführung:*

- Je 100 µl Vollblut (EDTA) werden in ein Polypropylen-FACS-Röhrchen gegeben.
- Dazu werden 2 ml FACS Lyse Lösung, nach Vorschrift 1:10 vorverdünnt gegeben, gründlich gevortext und 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.
- Anschließend wird das Röhrchen mit HBSS aufgefüllt und bei 300 g 5 min zentrifugiert (waschen)
- Nach Abkippen des Überstandes werden pro Röhrchen 500 µl 4% PFA dazugegeben und unter gelegentlichem vortexen für 10 min im Dunkeln inkubiert.
- Erneut wird das Röhrchen mit HBSS aufgefüllt und bei 300 g 5 min zentrifugiert.
- Das fixierte Zellpellet wird in 100 µl Saponinpuffer 0,1% resuspendiert und jeweils 1 µg des PE-konjugierten Anti-IL-8 Antikörpers bzw. der zugehörigen Isotypkontrolle IgG2b (je 5 µl) hinzugegeben.
- Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wird das Röhrchen diesmal mit Saponinpuffer 0,1% aufgefüllt und bei 300 g 5 min zentrifugiert.
- Anschließend werden die Zellen in 300 µl PBS/1%BSA aufgenommen und durchflußcytometrisch analysiert.
- Die Neutrophilen werden anhand ihrer Eigenschaften (Größe und Granularität) als Zellpopulation ausgewählt und das Signal im PE-Kanal ausgewertet.

### *3.2.4.3. Immunpräzipitation von $^{35}$S-markiertem IL-1RA und IL-8*

*Prinzip:*

Aus dem Gesamtlysat der Zellen können mit Hilfe von spezifischen Antikörpern bestimmte Proteine isoliert werden. Dazu werden die Antikörper an Agarose Beads gebunden. Diese sind mit Protein A und G beschichtet, die den Fc Teil der Antikörper binden. Das über die Antikörper an die Beads gebundene Protein kann nun in mehreren Waschschritten herunterzentrifugiert werden und schließlich mit Hilfe eines denaturierenden Probenpuffers freigesetzt werden. In diesem Experiment sind die Zellen während der Stimulation in Medium mit radioaktiv markierten Aminosäuren (Methionin und Cystein) kultiviert worden. Die präzipitierten Cytokine IL-1RA und IL-8 können daher, sofern sie *de novo* synthetisiert wurden, direkt mittels einer Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

*Verwendete Reagenzien:*

Aqua bidest.
BSA
PBS
Protein A/G PLUS Agarose

*Angesetzte Lösungen:*

| | |
|---|---|
| BSA 10% | Aqua bidest.<br>BSA 10% w/v |

*Durchführung:*

- Für die Bindung der Antikörper an die Protein A/G Agarose Beads werden pro Ansatz 30 µl der direkt vorher gevortexten Bead-Lösung, 500 µl eiskaltes PBS sowie 1 µg des gewünschten Antikörpers eingesetzt.
- Die Eppendorfgefäße werden ca. 2h bei 4°C rotiert und anschließend für 2 sec bei 16.000 g anzentrifugiert um die Beads zu pelletieren.
- Der Überstand wird mit einer Hamilton-Spritze abgenommen und zweimal nach Auffüllen mit 1ml Lysispuffer wie im vorigen Schritt gewaschen
- Anschließend wird der Überstand abgenommen und die Antikörper-gebundenen Beads können bis zu 6h bei 4°C aufbewahrt werden.

- Für die eigentliche Immunpräzipitation werden die in 3.2.1.7. erhaltenen Zell-Lysate aufgetaut und für 3 min bei 2.000 g, 4°C zentrifugiert.
- Jeweils 400 µl eines Lysat-Überstandes wird in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit fertigen Antikörper-gebundenen Beads gegeben. Da der Lysatüberstand ca. 900 µl beträgt, kann für jeden in 3.2.1.7. erhaltenen Ansatz eine IL-1RA und eine IL-8 Immunpräzipitation erfolgen.
- Nach Zugabe von 10 µl 10% BSA pro Reaktionsgefäß werden diese für 1-2 h bei 4°C rotiert.
- Durch Zentrifugation bei 300 g für 5 min (4°C) werden die Beads pelletiert.
- Der Überstand wird mit einer Hamilton-Spritze abgenommen und zweimal nach Auffüllen mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen (300 g 5 min 4°C)
- Beim letzten Mal wird der Überstand vollständig abgenommen und die Ansätze bis zur weiteren Verwendung bei –20°C eingefroren.
- Am nächsten Tag erfolgt dann eine SDS-Gelelektrophorese wie in 3.2.2.3. beschrieben. Anstelle eines Western Blots wird dann jedoch das Gel auf dem Geltrockner getrocknet (ca. 2,5 h bei 70°C im Vakuum) und direkt ein Röntgenfilm aufgelegt (Autoradiographie). Um eine schnellere Belichtung zu erhalten wurde mit einer Verstärkerfolie gearbeitet und 2 bis 5 Tage belichtet.

# 4. Ergebnisse

Neutrophile Granulocyten gehören zu den ersten Zellen, die an den Ort einer Infektion wandern, um die eingedrungenen Pathogene zu phagocytieren. Obwohl die Hauptaufgabe der PMN lange Zeit nur in der Tötung von Bakterien gesehen wurde, konnten neuere Publikationen die Produktion von Cytokinen durch Neutrophile zeigen. Die beschriebenen Cytokinspektren sind jedoch widersprüchlich und beinhalten oft sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Mediatoren (Lloyd und Oppenheim, 1992; Cassatella, 1995), so dass die Rolle der neutrophilen Granulocyten in der Immunregulation noch nicht endgültig geklärt ist.

1996 entwickelten Altstaedt et al. eine Methode zur Isolierung hochreiner neutrophiler Granulocyten. Im Gegensatz zu anderen Verfahren werden die Zellen dabei nicht schon durch die Prozedur an sich aktiviert. Die mit dieser Methode erreichte Reinheit an PMN lag bei durchschnittlich 98,5%. Bei den kontaminierenden Zellen handelte es sich hauptsächlich um eosinophile Granulocyten. Eine Überlagerung der gemessenen Cytokine durch das Cytokinspektrum von anderen Zellen mit einer hohen Kapazität zur Proteinsynthese (wie z.B. Monocyten) ist daher unwahrscheinlich. Mit diesen hochreinen Zellen konnte die in der Literatur beschriebene Sekretion der pro-inflammatorischen Cytokine IL-1β, IL-6 und TNF-α (Tiku et al., 1986; Cicco et al. 1990; Marucha et al., 1990; Dubravec et al., 1990; Arnold et al., 1994) nicht nachvollzogen werden (Altstaedt et al., 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in den folgenden Versuchen die Cytokinproduktion der hochreinen neutrophilen Granulocyten auf Proteinebene und auf mRNA-Ebene untersucht. Dabei sollte besonderes Augenmerk auf eventuell intrazellulär vorhandene Cytokine gerichtet werden, da in den vorhergehenden Arbeiten zum Thema lediglich die Zellkulturüberstände untersucht wurden. Von Interesse war außerdem, ob die Granulocyten die nachweisbaren Cytokine *de novo* synthetisieren können oder ob sie in den reifen PMN präformiert vorliegen und bei Stimulation lediglich ausgeschüttet werden. Die Neutrophilen wurden aus Vollblut isoliert oder aus Buffy coats, einem Nebenprodukt der Blutspende, in dem die ansonsten nicht benötigten Leukocyten angereichert sind.

Als Stimulanz wurde in erster Linie Lipopolysaccharid (LPS) von *Escherichia coli* verwendet, welches bei Monocyten die Produktion von IL-1β induziert (Beuscher et al., 1990). Außerdem wurde der Wachstumsfaktor GM-CSF verwendet, der *in vivo* die Proliferation und Reifung der Neutrophil-Vorläuferzellen vermittelt (Hord et al., 1995) und damit die Anzahl der zirkulierenden PMN erhöht. Auf reife Neutrophile hat GM-CSF einen aktivierenden Effekt (Gosselin et al., 1993).

## *4.1. Cytokinproduktion von neutrophilen Granulocyten*

### 4.1.1. Reinheitskontrolle der Neutrophilen-Präparationen

Jede PMN-Präparation mit genügend hoher Zellzahl für die nachfolgenden Versuche (ca. 50-70% der Präparationen) wurde zunächst durchflußcytometrisch auf ihre Reinheit und den Aktivierungsgrad der Zellen überprüft. Dazu wurde mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD66b und CD62L gearbeitet. CD66b (CEACAM-8) ist ein granulocytenspezifischer Marker, CD62L (L-Selectin) ist auf allen Leukocyten zu finden und wird von den Neutrophilen bei einer Aktivierung der Zelle von der Oberfläche entfernt, „gesheddet". Nur Präparationen mit einer Reinheit von über 98,5% wurden für weitere Versuche verwendet. Abbildung 4 zeigt exemplarisch eine durchflußcytometrische Reinheitskontrolle.

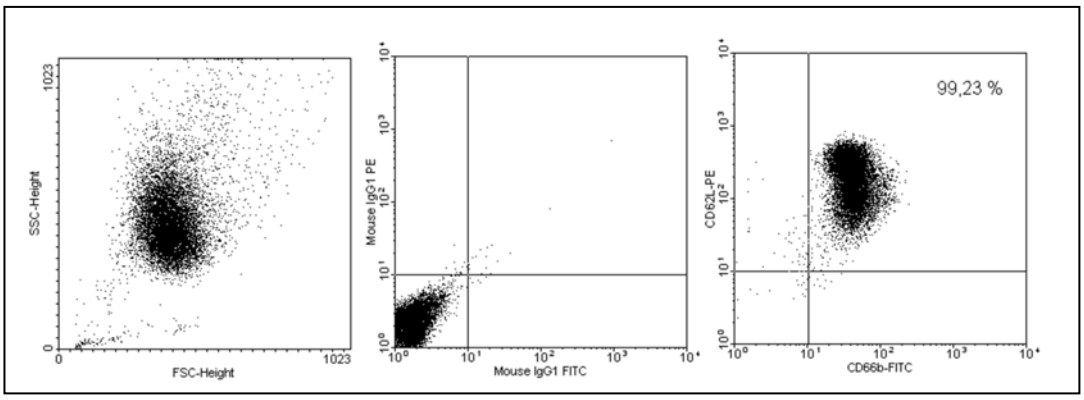



**Abbildung 4: Reinheitskontrolle der isolierten PMN mittels CD66b und CD62L**

PMN wurden mit einem FITC-markierten Antikörper gegen CD66b (X-Achse) und einem PE-markierten Antikörper gegen CD62L (Y-Achse) inkubiert und einer durchflußcytometrischen Analyse unterzogen. 99,23 % der Zellen sind positiv für CD66b und CD62L: es handelt sich also um hochreine, nicht voraktivierte Granulocyten.
Repräsentatives Experiment von n = 65.

### 4.1.2. Untersuchung der Cytokinproduktion im Zellkulturüberstand

Zunächst wurde die Cytokinproduktion von neutrophilen Granulocyten als Antwort auf eine Stimulation mit LPS untersucht. Die frisch aus Buffy coats isolierten, hochreinen PMN wurden für 1, 2, 3 und 24 Stunden mit LPS stimuliert. Zusätzlich wurden für 1 und 24 Stunden unstimulierte Kontrollansätze mitgeführt. Mit Hilfe von ELISAs wurden die Zellkulturüberstände auf die pro-inflammatorischen Cytokine IL-1β und IL-6 sowie auf das anti-inflammatorische Cytokin IL-1RA und auf das Chemokin IL-8 untersucht. Abbildung 5 zeigt zusammengefasst die gemessenen Mengen der unterschiedlichen Cytokine nach 24 Stunden.

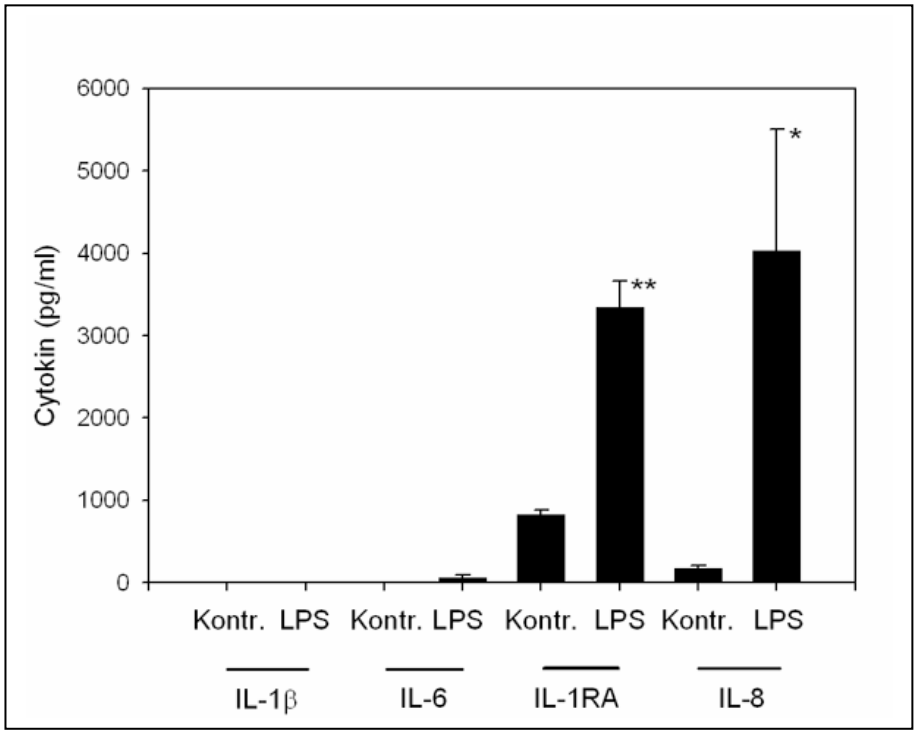



**Abbildung 5: Cytokinsekretion von PMN nach 24 Stunden**

Die PMN wurden mit (**LPS**) bzw. Kontrollansätze ohne Stimulanz (**Kontr.**) für 24 h inkubiert (37°C, 5% $CO_2$). Die Menge des jeweiligen Cytokins im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt.
**: $p < 0,01$ bzw. *: $p < 0,05$, verglichen mit den jeweiligen Kontrollwerten.
Gezeigt sind für n = 10 Experimente die Mittelwerte nach 24h +/- Standardfehler.

Wie aufgrund der Vorergebnisse mit anderen Stimulantien (Altstaedt et al., 1996) zu erwarten war, konnte eine Sekretion von IL-1β auch nach Stimulation mit LPS nicht nachgewiesen werden. Eine nach LPS-Zugabe beobachtete sehr geringe Menge an

sezerniertem IL-6 (64 pg/ml) erwies sich als nicht signifikant gegenüber der unstimulierten Kontrolle, in der wiederum keine IL-6 Sekretion messbar war.

Im Gegensatz dazu konnte eine Menge von durchschnittlich 826 pg/ml IL-1RA bzw. 179 pg/ml IL-8 im Überstand von unstimulierten Neutrophilen gemessen werden. Diese stieg nach LPS-Stimulation signifikant auf 3342 pg/ml IL-1RA bzw. 4034 pg/ml IL-8 an. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass PMN auch nach LPS-Stimulation keine pro-inflammatorischen Cytokine wie IL-1β und IL-6 sezernieren, andererseits jedoch das anti-inflammatorische IL-1RA und das chemotaktische IL-8 produzieren.

### 4.1.3. Cytokinnachweis im Lysat von neutrophilen Granulocyten

Theoretisch wäre es möglich, dass die bisher in dieser Arbeitsgruppe verwendeten Stimulantien (Zymosan, GM-CSF, fMLP und in dieser Arbeit LPS) die Neutrophilen nicht ausreichend aktivieren und pro-inflammatorische Cytokine zwar produziert werden, aber intrazellulär verbleiben. Diese würden dann im bisher untersuchten Überstand nicht nachweisbar sein.

Für eine Klärung wurden daher Zell-Lysate der stimulierten PMN mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit spezifischen Antikörpern gegen die oben genannten Cytokine detektiert. Die PMN wurden mit LPS für 1, 2, 3 und 24h stimuliert. Unstimulierte Kontrollen wurden für 3 und 24h mitgeführt, sowie als Positivkontrolle das jeweilige rekombinante Cytokin. Die Abschätzung des Molekulargewichtes der erhaltenen Banden erfolgte mit Hilfe eines biotinylierten Markers.

Die erhaltenen Westernblots sind zusammengefasst in Abbildung 6 auf der nachfolgenden Seite.

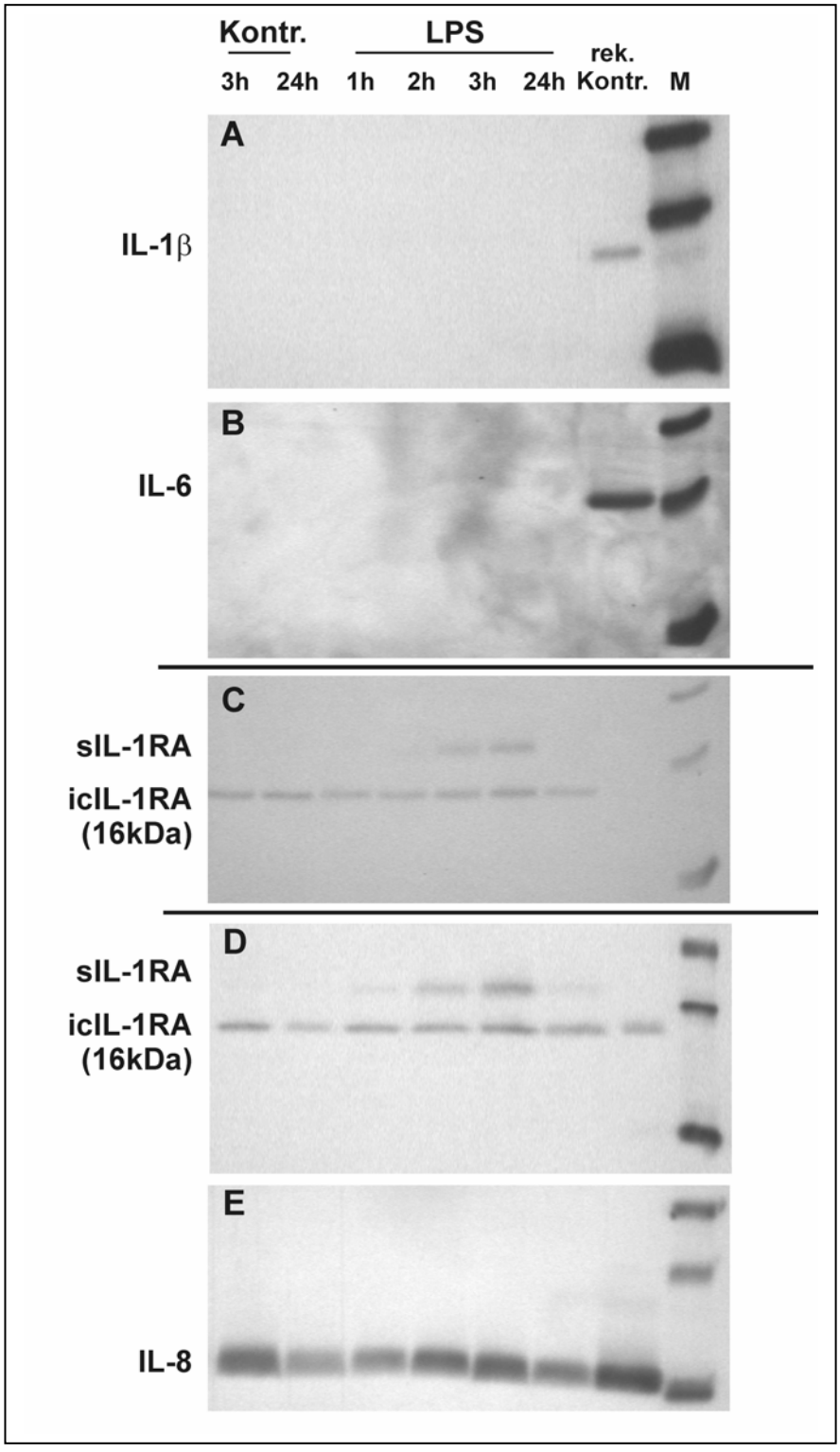



**Abbildung 6: Cytokinnachweis im Lysat von PMN**

Die PMN wurden mit LPS (250 ng/ml) bzw. Kontrollansätze ohne Stimulanz (**Kontr.**) für die angegebenen Zeiten inkubiert (37°C, 5% $CO_2$). Mit spezifischen Antikörpern wurde IL-1β (**A**), IL-6 (**B**), IL-1RA (**D**) und IL-8 (**E**) detektiert. Um eine zu geringe Proteinmenge auszuschließen, wurde im Falle von IL-6 die Membran gestrippt und anschließend mit anti-IL-1RA detektiert (**C**). Für jedes Cytokin wurde das rekombinante Protein als Kontrolle (**rek. Kontr.**) mit aufgetragen. Ein biotinylierter Marker (**M**) dient als Größenvergleich.
Für jede Teilabbildung gilt: repräsentatives Experiment von n = 3.

Wie zuvor im Zellkulturüberstand (4.1.2.) konnten auch im Gesamtzell-Lysat von neutrophilen Granulocyten die pro-inflammatorischen Cytokine IL-1β und IL-6 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 6A und B). Die Positivkontrollen in Form von rekombinanten Cytokinen waren jedoch deutlich sichtbar (rek. Kontr.). Die IL-6 Westernblots wurden zudem nach „strippen" der Membran („Abwaschen" der anti-IL-6 Antikörper im niedrigen pH-Bereich) mit anti-IL-1RA Antikörpern erfolgreich neu detektiert (6C). Eine zu geringe Proteinmenge auf der Membran als Grund für den fehlenden Nachweis kann daher ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu den pro-inflammatorischen Cytokinen konnten IL-1RA (Abbildung 6D) und IL-8 (Abbildung 6E) im Lysat nachgewiesen werden. Von IL-1RA waren zwei Isoformen zu erkennen, die sich aufgrund ihres Laufverhaltens im Vergleich zur 17kDa rekombinanten Kontrolle der sezernierten Variante sIL-1RA (ca. 23 kDa) und der kleinen intrazellulärenVariante icIL-1RA 16kDa zuordnen liessen. Die große intrazelluläre Isoform icIL-1RA 18kDa konnte nicht detektiert werden.

Während icIL-1RA 16kDa auch in den unstimulierten Zellen zu finden war, wurde das sIL-1RA erst durch Zugabe von LPS induziert. IL-8 konnte ebenfalls auch in den unstimulierten Kontrollen detektiert werden. Bei den beiden konstitutiv vorhandenen Cytokinen IL-8 und icIL-1RA 16kDa konnte zusätzlich eine leichte Zunahme der Bandenstärke im Verlauf der LPS-Stimulation erkannt werden. Diese Intensitätssteigerung lässt darauf schließen, dass die basale IL-8 bzw. icIL-1RA 16kDa Expression durch Stimulation noch gesteigert werden konnte.

In den 24 Stunden Ansätzen wurde für alle drei nachgewiesenen Cytokine jeweils eine deutlich schwächere Bande detektiert als nach drei Stunden. Dieser Effekt galt für stimulierte wie unstimulierte Zellen und war besonders deutlich sichtbar im 24h LPS-Ansatz bei dem induzierten sIL-1RA. Eventuell weist dies auf eine Ressourcenknappheit in den enddifferenzierten PMN hin, so dass trotz langfristiger Stimulation nach einiger Zeit keine Proteinproduktion mehr stattfinden kann. Vermutlich ist das abnehmende Signal jedoch hauptsächlich auf das Absterben der kurzlebigen Neutrophilen (48 bis 72h im peripheren Blut) zurückzuführen. Eine nur transiente Antwort auf einen Dauerreiz ist jedoch nicht unüblich und auch in Zellen mit stärkerer Synthesekapazität zu finden. Auf alle Fälle kann mit dieser

Beobachtung davon ausgegangen werden, dass für eine Kinetik der Cytokinproduktion die richtigen Zeitpunkte gewählt worden sind. Es ist daher unwahrscheinlich, dass längere Stimulationszeiten noch weitere Cytokine induzieren können.

### 4.1.4. Subzelluläre Lokalisation der gefundenen Cytokine

Da reife Neutrophile nur über eine geringe Kapazität zur Proteinsynthese verfügen, stellte sich die Frage, ob die auch in den unstimulierten Kontrollen gefundenen Cytokine IL-8 und icIL-1RA konstitutiv in den reifen Zellen exprimiert werden oder ob sie bereits im Verlauf der Neutrophilenreifung synthetisiert wurden und in den reifen Neutrophilen präformiert vorliegen. Für letztere Variante würde sprechen, wenn diese Cytokine in den Granula zu finden wären, da deren Zusammensetzung in den reifen Neutrophilen nicht mehr verändert wird. Die verschiedenen Granula entstehen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der PMN, und der Nachweis eines der oben genannten Cytokine in einem bestimmten Granulatyp kann Aufschluß darüber geben, in welchem Stadium der PMN-Reifung das Protein synthetisiert wurde.

Die PMN wurden daher mittels Stickstoffdekompression lysiert, einer besonders schonenden Lysemethode, bei der die meisten Zellorganellen intakt bleiben (siehe auch 3.2.1.6). Das Lysat wurde dann über einen Dichtegradienten aus Percoll zentrifugiert, mit dem sich die verschiedenen Granulatypen voneinander trennen lassen. Die einzelnen Ringe unterschiedlicher Dichte konnten mit einer Pasteurpipette abgehoben werden.

Die mit Hilfe eines zweischichtigen Gradienten aufgetrennten Fraktionen enthielten: cytoplasmatische Bestandteile (Fraktion 1), azurophile Granula (Fraktion 2), spezifische und Gelatinase-Granula (Fraktion 3) sowie leichte Membranen wie Zellmembran, Golgi-Apparat und endoplasmatisches Reticulum (ER) in Fraktion 4. Fraktion 2 befindet sich pelletiert am Boden des Zentrifugenröhrchens, Fraktion 3 befindet sich in der Phasentrennung zwischen den zwei Schichten, Fraktion 4 unmittelbar über der oberen Schicht und Fraktion 1 ist der Überstand über dem Gradienten.

Die isolierten Fraktionen wurden mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und wie unter 4.3. beschrieben im Westernblot detektiert (siehe Abbildung 7).

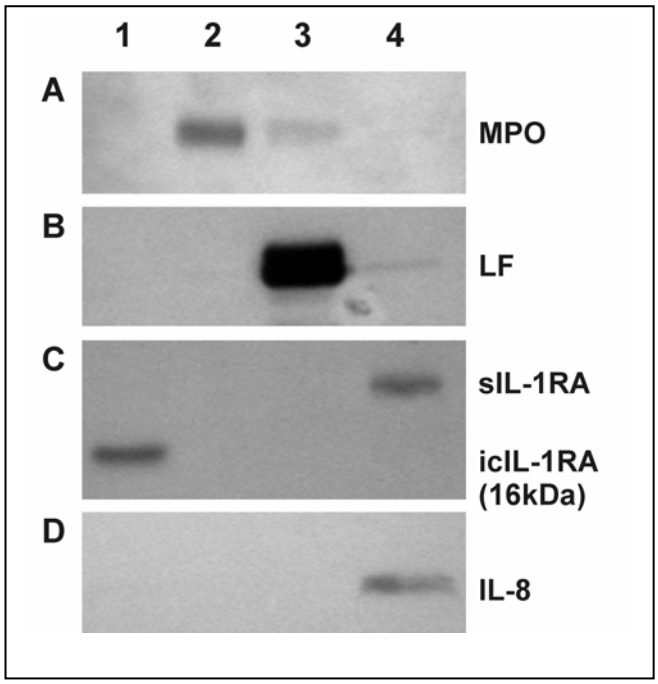



**Abbildung 7: Subzelluläre Lokalisation von IL-1RA und IL-8 in PMN**

Das PMN-Lysat wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation in vier Fraktionen unterteilt: cytoplasmatische Fraktion (**1**), azurophile Granula (**2**), spezifische und Gelatinase-Granula (**3**) und Membranfragmente, ER, Golgi-Apparat (**4**). Als Kontrolle für die Effizienz der Trennung wurden die Westernblots zunächst auf Myeloperoxidase (MPO, **A**) und Lactoferrin (LF, **B**) überprüft. Für die eigentliche Fragestellung wurde neu auf IL-1RA (**C**) und IL-8 (**D**) detektiert.
Repräsentatives Experiment von n = 3.

Eine qualitative Trennung der unterschiedlichen Granula konnte in Kontroll-Detektionen mit anti-Myeloperoxidase- und anti-Lactoferrin-Antikörpern bestätigt werden (Kjeldsen et al., 1999). Myeloperoxidase als Markerprotein für azurophile Granula war deutlich in Fraktion 2 zu erkennen (7A), während Lactoferrin, der Marker für spezifische und Gelatinase-Granula, fast ausschließlich in Fraktion 3 detektiert wurde (7B). In der cytoplasmatischen Fraktion 1 konnte keines der beiden Markerproteine gefunden werden, ein Beweis für die gute Lysemethode, bei der die Organellen intakt bleiben.

Jedoch konnten weder die IL-1RA Varianten noch IL-8 in den Granula-Fraktionen nachgewiesen werden (7C und D). Die sezernierte Isoform sIL-1RA und auch IL-8

wurden ausschließlich in Fraktion 4 detektiert (Abbildung 7C und D). Diese Fraktion enthält Fragmente der Zellmembran sowie den Golgi-Apparat und das ER. Aufgrund der fehlenden Signalsequenz für die Prozessierung über den Golgi-Apparat wurde icIL-1RA 16kDa in der cytoplasmatischen Fraktion erwartet. Dies konnte auch bestätigt werden (Fraktion 1 in 7C). Eine Aussage über den Synthesezeitraum dieses Cytokins ist hingegen nicht möglich, da auch für eine potentielle Einlagerung in Granula eine Signalsequenz für den Golgi nötig ist. So könnte es durchaus sein, dass icIL-1RA 16kDa auch schon in Neutrophilen-Vorläuferzellen exprimiert wurde, sich jedoch im Cytoplasma ansammelte.

Allgemein schließt eine Detektion der Cytokine ausserhalb der Granula eine Präformierung während der Neutrophilenreifung nicht automatisch aus. Der gemeinsame Nachweis von IL-8 und sIL-1RA in der Fraktion des Golgi-Apparates deutet jedoch auf eine *de novo* Synthese hin, besonders da sIL-1RA in den Westernblotexperimenten (Abbildung 6) induzierbar, also eindeutig *de novo* synthetisiert war.

### 4.1.5. Relative Quantifizierung der Cytokin-mRNAs

Meist geht einer Proteinsynthese eine erhöhte Transkription der zugehörigen mRNA voraus. Um die Möglichkeit einer *de novo* Synthese zu überprüfen wurde daher für sIL-1RA (und damit gleichzeitig auch icIL-1RA 16kDa) und IL-8 die mRNA mittels Real-time PCR (Taqman®) quantifiziert. Zusätzlich mitgeführt wurde die als Protein bisher nicht detektierte Isoform icIL-1RA 18kDa. Die Zellen wurden wie in den vorigen Experimenten stimuliert, Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit spezifischen Primern und Sonden wurde dann die relative Menge der jeweiligen Cytokin-mRNA im Vergleich zum gleichmäßig exprimierten housekeeping-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) zu verschiedenen Stimulationszeitpunkten bestimmt (Abbildung 8 A-C). Als Basiswert, der auf eins gesetzt und von dem ausgehend eine Änderung der mRNA Menge nach Stimulation dargestellt werden kann, wurde ein Sofortwert mitgeführt, d.h. RNA unmittelbar nach der Zellpräparation isoliert (Kontr.).

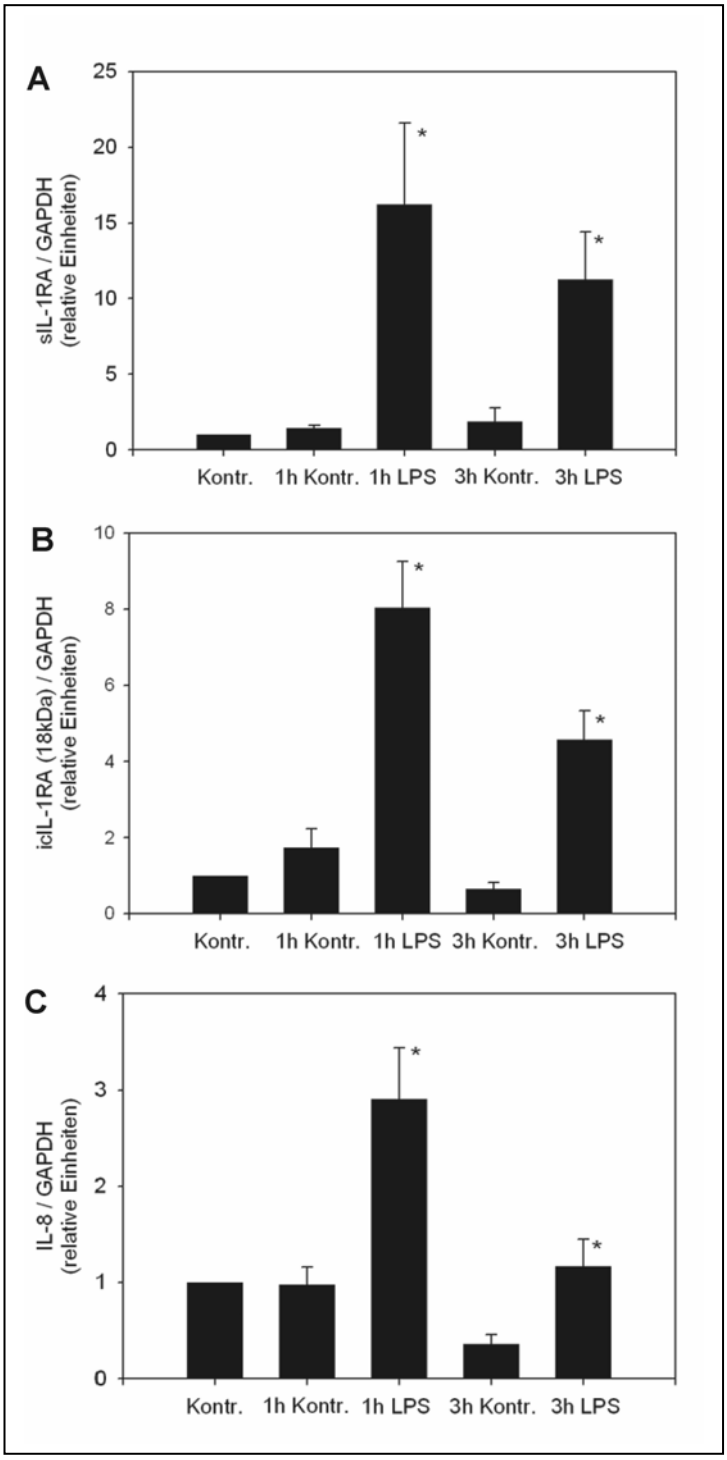



**Abbildung 8: Relative Quantifizierung der Cytokin mRNAs im Zeitverlauf**

Die PMN wurden mit **LPS** (250 ng/ml) bzw. Kontrollansätze ohne Stimulanz (**1h** und **3h Kontr.**) für die angegebenen Zeiten inkubiert (37°C, 5% $CO_2$), anschließend RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zusätzlich wurde ein Kontroll-Wert direkt nach der Zellpräparation mitgeführt (**Kontr.**). Die relative mRNA- bzw. cDNA-Menge wurde mit Hilfe von spezifischen Primern und Sonden für sIL-1RA (**A**), icIL-1RA 18kDa (**B**) bzw. IL-8 (**C**) in Real-time-PCR Experimenten bestimmt. Die Cytokin-mRNA wurde auf das housekeeping-Gen GAPDH normiert und der Sofortwert (**Kontr.**) als Basiswert bestimmt von dem aus die Erhöhung berechnet wurde.
*: $p < 0,01$ verglichen mit den zugehörigen Kontrollwerten. Gezeigt sind für n = 4-7 Experimente die Mittelwerte +/- Standardfehler.

Für alle drei mRNAs konnte bei den stimulierten Ansätzen eine signifikante Erhöhung der Menge im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden. Dies galt sowohl für eine Stunde als auch für drei Stunden Stimulationszeit und weist auf eine erhöhte Transkription hin, in deren Verlauf dann auch eine *de novo* Synthese des zugehörigen Proteins stattfinden könnte. Interessant ist dies besonders für icIL-1RA 18kDa, denn diese Variante konnte als Protein in den PMN nicht detektiert werden.

Die mRNA-Menge nach drei Stunden war jeweils geringer als die nach einer Stunde Stimulation, das Maximum der Transkription muss also in weniger als drei Stunden, vermutlich schon nach einer Stunde erreicht gewesen sein. Dieses Ergebnis passt gut zu den Westernblots von 4.3., in denen das erkennbare Maximum der Proteinsynthese ungefähr bei drei Stunden liegt.

Die Induzierbarkeit der unterschiedlichen Cytokin-mRNAs variierte stark. Mit ca. 20-facher mRNA-Menge nach einer Stunde LPS-Stimulation verglichen mit dem Kontroll-Wert wies sIL-1RA die stärkste Induktion auf. Danach folgten icIL-1RA 18kDa mit ca. 9-facher und IL-8 mit ca. 3-facher Menge. Zum direkten Vergleich der unterschiedlichen mRNA Mengen sind daher in Abbildung 9A die Werte nach einer Stunde LPS-Stimulation im einheitlichen Maßstab aufgetragen.

Erstaunlicherweise wurde IL-8 wesentlich weniger stark induziert als sIL-1RA, obwohl in den ELISA-Experimenten ähnliche Mengen beider Cytokine im Überstand gemessen wurden (siehe Abbildung 5). In den Auswertungen von Abbildung 8 wurde jedoch immer ein Basiswert (Kontr., unmittelbar nach der Zellpräparation) festgelegt, von dem ausgehend die Zunahme der mRNA dargestellt wurde. Ein eventuell vorhandener Unterschied in der Menge an bereits vorhandener mRNA der verschiedenen Cytokine wurde also nicht berücksichtigt. Die Ausgangsmengen aller drei Cytokine sofort nach der Zellpräparation (Kontr.) wurden daher normiert auf das housekeeping-Gen GAPDH und unmittelbar miteinander verglichen (Abbildung 9B). Dabei stellte sich heraus, dass die Ausgangsmenge von IL-8-mRNA in den unstimulierten Zellen deutlich größer war als die von sIL-1RA und diese wiederum größer als die von icIL-1RA 18kDa.

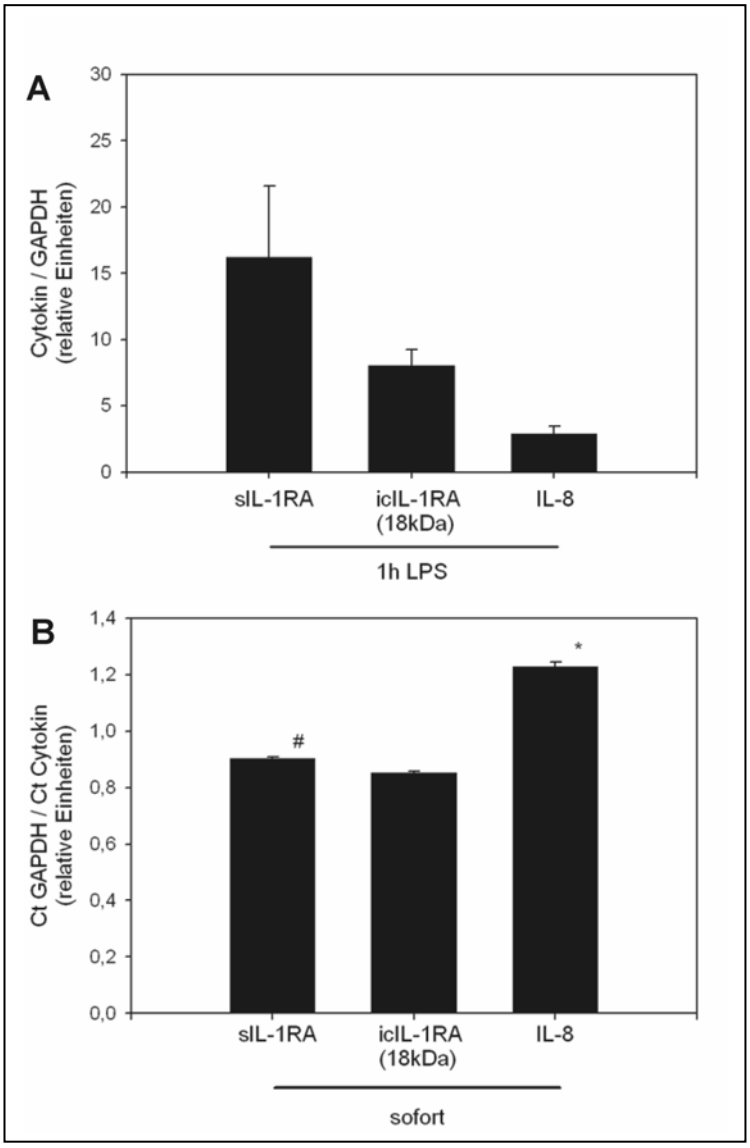



**Abbildung 9: Vergleich der relativen Quantifizierung der Cytokin mRNAs**

Für Abbildung 9 wurden die bereits in 8 gezeigten Daten neu ausgewertet um den direkten Vergleich der mRNA-Menge nach 1h LPS Stimulation (**A**) und sofort nach der Isolierung der Zellen (**B**) zu ermöglichen.
*: $p < 0,01$ verglichen mit sIL-1RA und icIL-1RA 18kDa, #: $p < 0,01$ verglichen mit icIL-1RA 18kDa.
Gezeigt sind für n = 4-7 Experimente die Mittelwerte +/- Standardfehler.

### *4.1.6. De novo* Synthese von IL-1RA und IL-8

Um eine eventuelle *de novo* Proteinsynthese der Cytokine nachweisen zu können, wurden die PMN in der Gegenwart von $^{35}$S-markierten Aminosäuren (Methionin und Cystein) kultiviert. Für diesen Versuch wurde ein Kulturmedium ohne Methionin

und Cystein verwendet, so dass bei neu synthetisierten Proteinen die jeweils radioaktive Variante von Methionin und Cystein eingebaut wird.
Die Neutrophilen wurden für zwei Stunden mit LPS bzw. mit GM-CSF stimuliert. Zusätzlich wurden eine unstimulierte Negativkontrolle sowie mit LPS stimulierte PBMC als Positivkontrolle mitgeführt.

Die Cytokine wurden aus dem Lysat mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen IL-1RA und IL-8 präzipitiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. In Form einer Autoradiographie auf einem Röntgenfilm wurden die Banden dann sichtbar gemacht (Abbildung 10).

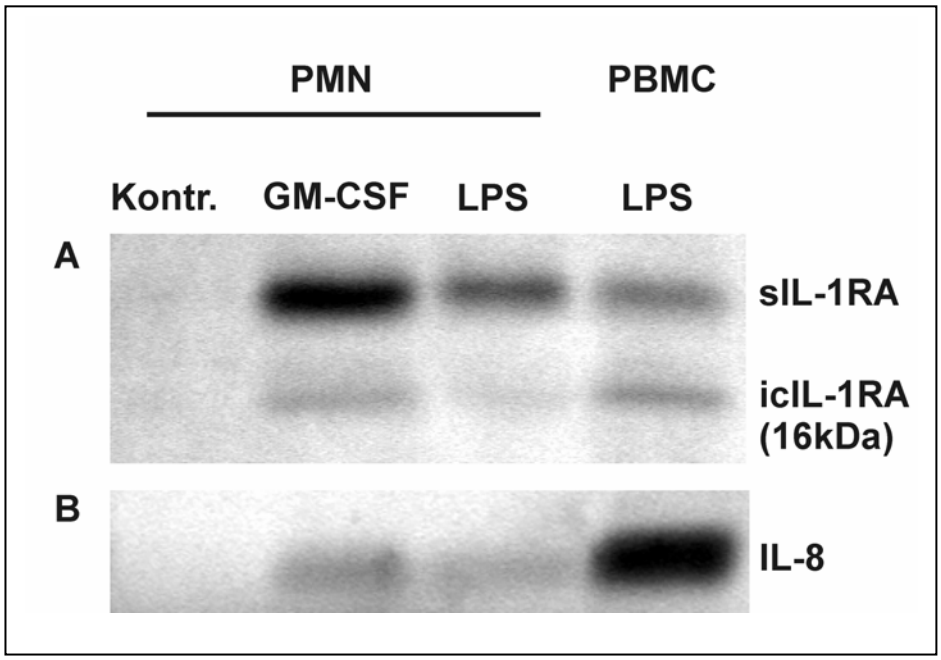



**Abbildung 10: *De novo* Synthese von IL-1RA und IL-8**

Aus dem Zell-Lysat wurden die Cytokine mit Hilfe spezifischer Antikörper präzipitiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Neben **LPS** wurde auch **GM-CSF** als Stimulanz benutzt, sowie eine unstimulierte Kontrolle (**Kontr.**) und LPS-stimulierte PBMC als Positivkontrolle mitgeführt.
Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von n=3 für IL-1RA (**A**) und IL-8 (**B**).

Im Lysat der unstimulierten PMN (Kontr.) konnte weder IL-1RA noch IL-8 detektiert werden. Deutliche Banden waren jedoch in den mit LPS und auch in den mit GM-CSF stimulierten PMN zu sehen sowie in den mit LPS stimulierten PBMC. Nach Stimulation findet also eine *de novo* Synthese der Cytokine statt. Während in den stimulierten PMN jeweils deutlich mehr sIL-1RA synthetisiert wurde als icIL-1RA 16kDa, waren die Banden für diese beiden Cytokine im PBMC-Ansatz nahezu

gleich stark. Auffallend war außerdem, dass sowohl GM-CSF- als auch in geringerem Maße LPS-stimulierte PMN mehr sIL-1RA synthetisierten als die ebenfalls mit LPS stimulierten PBMC. Für IL-8 war es genau umgekehrt: die stärkste Bande konnte im PBMC-Ansatz detektiert werden.

Besonders im Vergleich mit den Real-time-PCR Experimenten fällt daher auf, dass IL-8 nur in einem geringen Maße neu synthetisiert wird, ähnlich den mRNA Ergebnissen von 4.1.5. Wieder stehen im Gegensatz dazu die ELISA-Messungen der Zellkulturüberstände, in denen IL-8 mit ca. 4000 pg die größte Menge an sezerniertem Cytokin darstellt. Es wurde daher überlegt, ob die Zellen über einen intrazellulären Vorrat aus präformiertem IL-8 verfügen.

### 4.1.7. Intrazelluläre Färbung von IL-8 in unstimulierten PMN

Die bisherigen Versuche weisen auf eine konstitutive Expression von IL-8 in neutrophilen Granulocyten hin, die theoretisch zu einer Ansammlung an präformiertem IL-8 in der Zelle führen könnte.

Um dieses präformierte IL-8 in den unstimulierten Zellen zu detektieren, wurden Gesamtleukocyten aus Vollblutproben mit Paraformaldehyd fixiert und mit Saponin permeabilisiert. Das intrazellulär vorhandene IL-8 konnte dann mit Phycoerythrin-(PE-) markierten spezifischen Antikörpern detektiert und durchflußcytometrisch ausgewertet werden. In der Auswertung wurden die Granulocyten nach Größe und Granularität aus den Gesamtleukocyten vorselektiert. Als Spezifitätskontrolle fungierte ein Antikörper des gleichen Isotyps (Isotypkontrolle, IgG2b), dessen zugehöriges Antigen in humanen Zellen nicht vorhanden ist (Abbildung 11A).

Um die Genauigkeit der Selektion auf Granulocyten zu erhöhen, wurden zusätzliche Ansätze zunächst mit Fluoresceinthiocyanat (FITC-) markierten Antikörpern auf den pan-Granulocytenmarker CD66b inkubiert. Anschließend wurden diese Zellen fixiert und permeabilisiert und eine Doppelfärbung mit anti-IL-8 PE durchgeführt (Abbildung 11B).

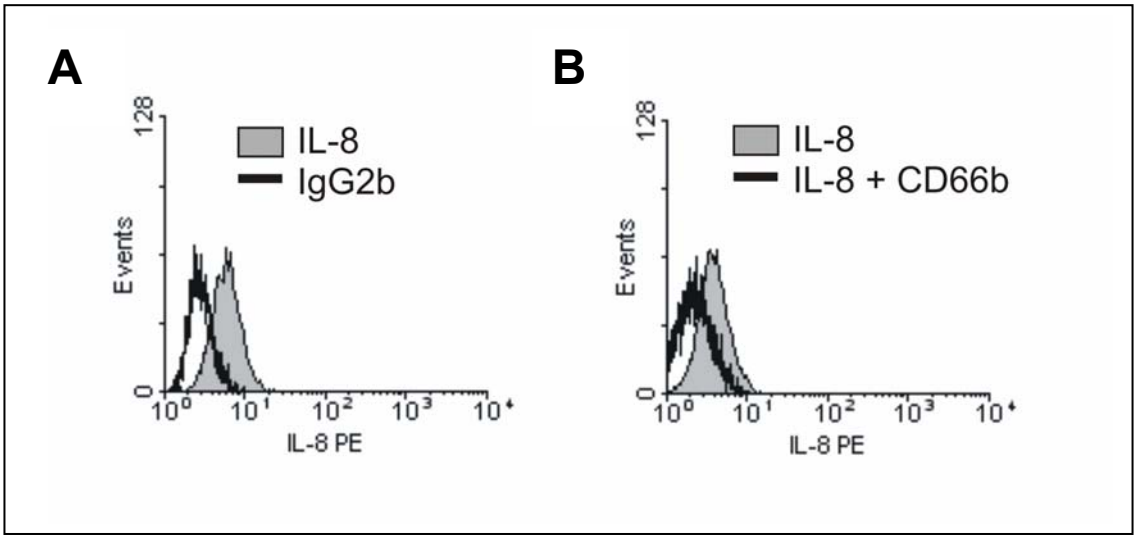



**Abbildung 11: Intrazelluläre Färbung von IL-8 in unstimulierten PMN**

Intrazelluläres IL-8 wurde in unstimulierten PMN mit Hilfe eines PE-markierten anti-IL-8 Antikörpers detektiert (IL-8, **A** und **B**). Bei zusätzlicher Oberflächenfärbung mit einem FITC-markierten anti-CD66b Antikörper nimmt das IL-8 Signal ab (IL-8 + CD66b, **B**).
Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von n = 6.

In den unstimulierten neutrophilen Granulocyten konnte ein spezifisches IL-8 Signal detektiert werden. Da für dieses Experiment Gesamtleukocyten verwendet wurden, kann eine Voraktivierung der PMN durch einen Isolierungsprozess ausgeschlossen werden, und das Ergebnis weist auf präformiertes IL-8 in den ruhenden Zellen hin.

Erstaunlicherweise reduziert sich das IL-8 Signal deutlich, wenn vor der Fixierung der Zellen mit anti-CD66b Antikörpern gegengefärbt wird. Dieses Phänomen konnte zunächst nicht erklärt werden. Da es jedoch reproduzierbar war, wurden für eine Klärung weitere Experimente durchgeführt (siehe 4.1.8.). Versuche, auch IL-1RA intrazellulär nachzuweisen, sind jedoch leider gescheitert, vermutlich aufgrund der geringen Konzentration der kommerziell erhältlichen anti-IL-1RA Antikörper.

### 4.1.8. Cytokinausschüttung nach Ligation von CD66b

Um dem Phänomen des reduzierten IL-8 Signals bei Doppelfärbung mit CD66b auf den Grund zu gehen, wurde zunächst untersucht, ob das Cytokin tatsächlich aus der Zelle freigesetzt wird.

Dafür wurden aus Vollblut isolierte PMN für 24h mit anti-CD66b Antikörpern inkubiert. Es wurde mit zwei verschiedenen, kommerziell vertriebenen Klonen gearbeitet, die jeweils direkt mit FITC markiert waren. Um eine unspezifische Reaktion auszuschließen, wurden die zugehörigen Isotypkontrollen mitgeführt. Von den Zellkulturüberständen wurden dann ELISAs für IL-8 und auch IL-1RA durchgeführt (Abbildung 12).

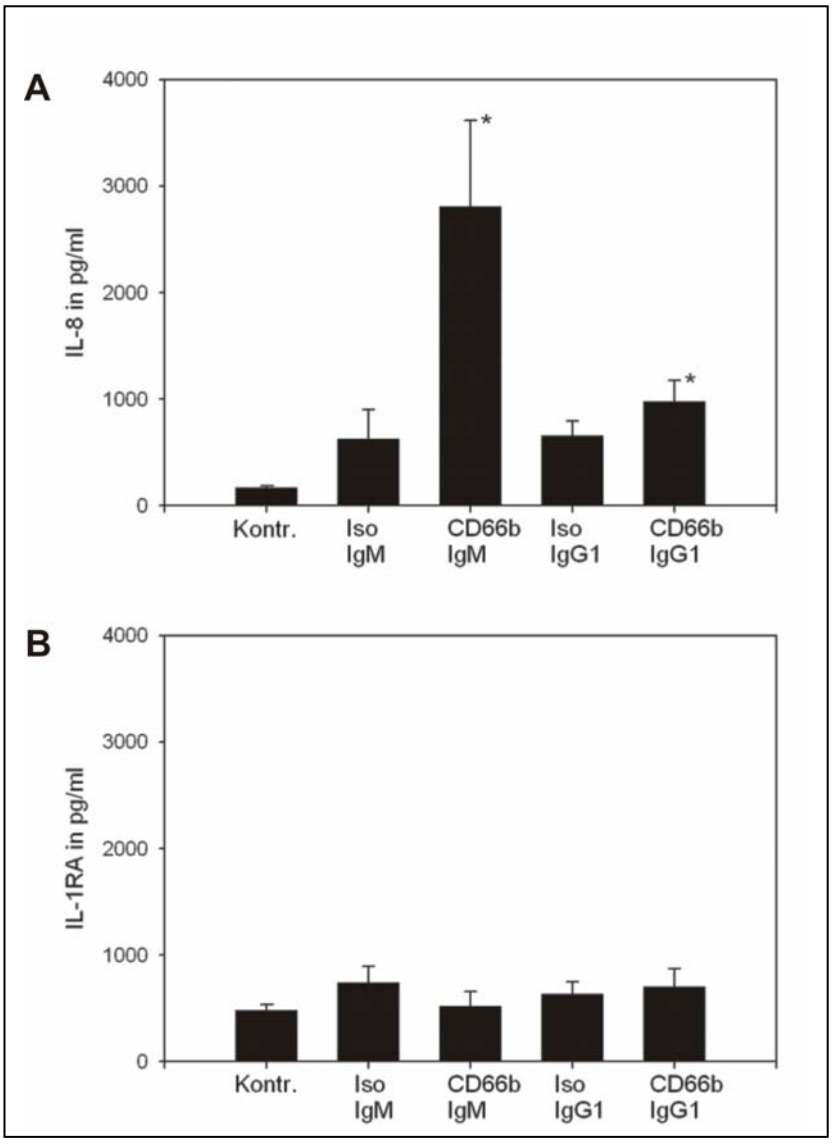



**Abbildung 12: Cytokinausschüttung nach Ligation von CD66b**

Die PMN wurden mit anti-CD66b Antikörpern (**CD66b IgM** und **CD66b IgG1**) sowie als Kontrollansätze ohne Stimulanz (Kontr.) bzw. mit den zugehörigen Isotypkontrollen (**Iso IgM** und **Iso IgG1**) für 24 h inkubiert (37°C, 5% $CO_2$). Von den Zellkulturüberständen wurden ELISAs für IL-8 (**A**) bzw. IL-1RA (**B**) durchgeführt.
*: $p < 0,01$, verglichen mit den jeweiligen Kontrollwerten.
Gezeigt sind für beide Cytokine n = 4 Experimente als Mittelwerte nach 24h +/- Standardfehler.

Die Analyse der Zellkulturüberstände zeigte tatsächlich eine erhöhte Menge IL-8 nach Stimulation mit CD66b (Abbildung 12A). Für beide anti-CD66b Klone konnte eine signifikante Erhöhung der IL-8 Konzentration gegenüber der jeweiligen Isotypkontrolle gemessen werden, die dementsprechend direkt auf die Ligation von oberflächenständigem CD66b zurückzuführen ist. Da IgM als Pentamer und teilweise auch als Hexamer vorliegt, kann die erhöhte Ausschüttung in diesem Ansatz vermutlich durch die stärkere Kreuzvernetzung der CD66b Moleküle erklärt werden. Die im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle leicht erhöhte Sekretion von IL-8 in den Ansätzen mit den Isotypkontrollen resultiert vermutlich aus der unspezifischen Bindung der Antikörper.

Wider Erwarten konnte im IL-1RA-ELISA jedoch keine Sekretion dieses Cytokins gemessen werden (Abbildung 12B). Bei allen bisher in dieser Arbeitsgruppe verwendeten Stimulantien wie LPS, fMLP oder Zymosan wurden immer sowohl IL-8 als auch IL-1RA detektiert, und auch aus der Literatur ist keine isolierte Produktion von IL-8 bekannt. Es wurde daher untersucht, ob die Ligation von CD66b einen Einfluss auf die Synthese von intrazellulärem IL-1RA hat.

### 4.1.9. *De novo* Synthese von IL-1RA nach CD66b-Ligation

Die PMN wurden unter Zugabe von $^{35}$S-markiertem Methionin und Cystein inkubiert. Parallel zum für die Stimulation genutzten anti-CD66b Antikörper wurde seine zugehörige Isotypkontrolle (IgM), mit LPS stimulierte PMN als Positivkontrolle (LPS) sowie ein unstimulierter Ansatz mitgeführt (Kontr.).
Analog zu Versuch 4.1.6 wurden die stimulierten PMN dann lysiert, das gewünschte Cytokin aus dem Lysat mit Hilfe eines spezifischen anti-IL-1RA Antikörpers präzipitiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. In Form einer Autoradiographie auf einem Röntgenfilm wurden die Banden dann sichtbar gemacht (Abbildung 13 auf der nächsten Seite).

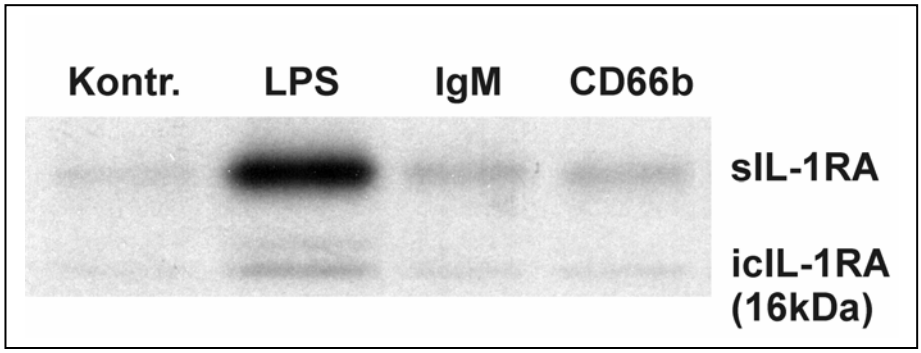



**Abbildung 13: Immunpräzipitation von $^{35}$S-markiertem IL-1RA**

Aus dem PMN-Lysat wurden das Cytokin mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers präzipitiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Neben **anti-CD66b** und **IgM** wurde als Positivkontrolle **LPS** und eine unstimulierte Kontrolle (**Kontr.**) mitgeführt.
Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von n=3.

Die Autoradiographie zeigte deutlich ein positives Signal in den LPS-stimulierten PMN. Weder der mit IgM noch der mit CD66b stimulierte Ansatz zeigten ein stärkeres Signal als die unstimulierte Kontrolle. Eine Ligation von CD66b bewirkt also keine *de novo* Synthese von IL-1RA.

### 4.1.10. Relative Quantifizierung der Cytokin mRNAs nach CD66b-Ligation

Analog zu Versuch 4.1.5. wurden die relativen mRNA Mengen der Cytokine nach CD66b Ligation mittels Real-time PCR bestimmt. Wieder wurde das housekeeping-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) für die relative Quantifizierung genutzt und die mRNA-Mengen auf einen unstimulierten Wert (Kontr.) normiert. Dazu wurden die Zellen für eine Stunde mit anti-CD66b Antikörpern inkubiert. Mitgeführt wurden außerdem eine Positivkontrolle (LPS-stimulierte PMN), eine Isotypkontrolle (IgM) und eine unstimulierte Kontrolle (Kontr.).

Abbildung 14 auf der nächsten Seite zeigt die Auswertungen für alle drei Cytokine sIL-1RA, icIL-1RA 16kDa und IL-8.

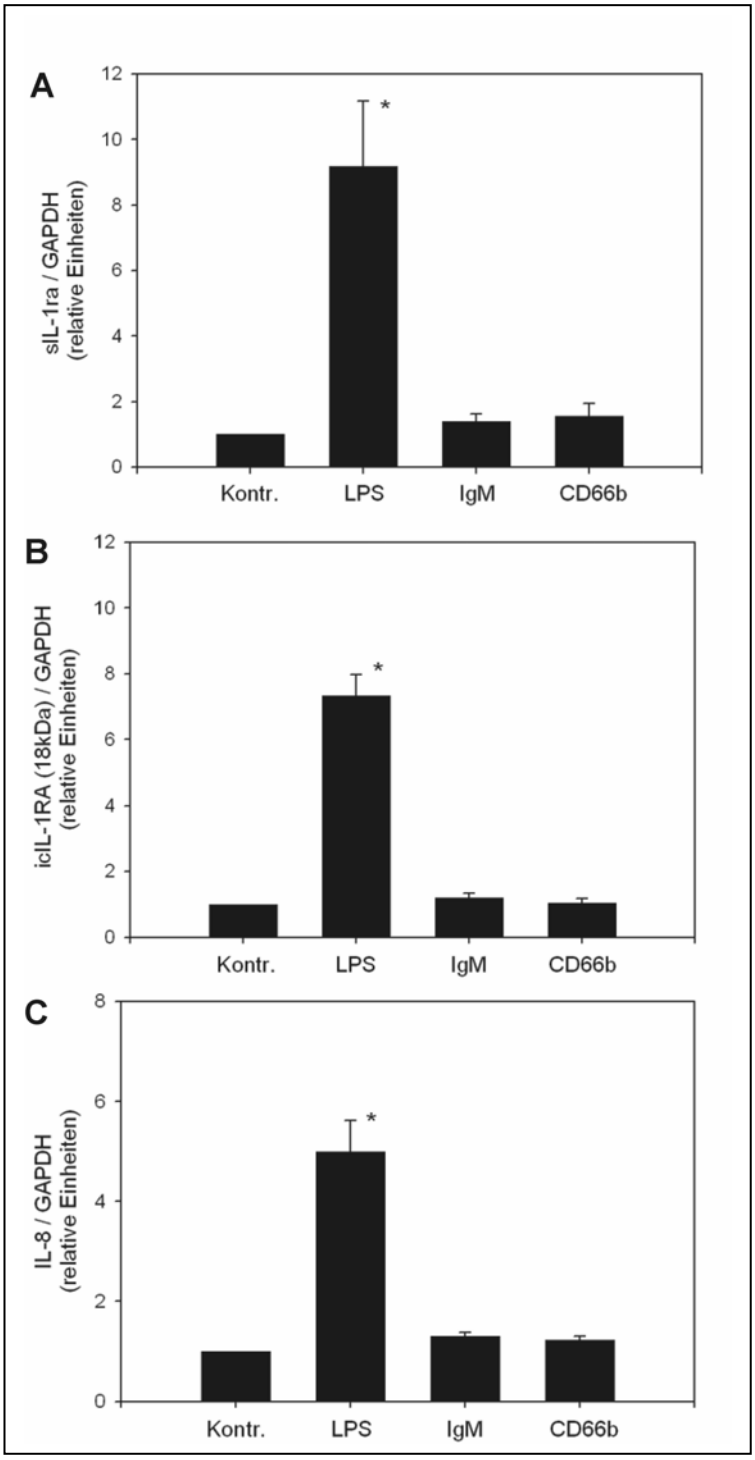



**Abbildung 14: Relative Quantifizierung der Cytokin mRNAs nach CD66b Ligation**

Die PMN wurden mit **anti-CD66b**, sowie als Negativkontrolle mit **IgM** und als Positivkontrolle mit **LPS** für eine Stunde inkubiert (37°C, 5% $CO_2$), anschließend RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zusätzlich wurde ein unstimulierter Basiswert mitgeführt (**Kontr.**). Die relative mRNA- bzw. cDNA-Menge wurde mit Hilfe von spezifischen Primern und Sonden für sIL-1RA (**A**), icIL-1RA (**B**) bzw. IL-8 (**C**) in Real-time-PCR Experimenten bestimmt. Die Cytokin-mRNA wurde auf das housekeeping-Gen GAPDH normiert und der unstimulierte Wert (Kontr.) als Basiswert bestimmt von dem aus die Erhöhung berechnet wurde.
*: $p < 0,01$ verglichen mit der zugehörigen Kontrolle.
Gezeigt sind für n = 4 Experimente die Mittelwerte +/- Standardfehler.

Für alle drei Cytokine konnte keine Erhöhung der mRNA Menge nach Stimulation mit CD66b festgestellt werden. Eine signifikante Zunahme an mRNA fand sich jedoch jeweils in der LPS-stimulierten Positivkontrolle. Besonders für IL-8 ist dieses Ergebnis interessant, da es sich dementsprechend bei der in Experiment 4.1.8. beobachteten Sekretion von IL-8 um präformiertes Protein handeln muss.

### 4.1.11. Vitalfärbung nach CD66b-Ligation

Da die im Überstand detektierte Menge an IL-8 nicht mit einem Anstieg an mRNA korrelierte, bestand die Möglichkeit, dass es von degranulierenden Zellen freigesetzt wurde. Um dies ausschließen zu können, wurde die Vitalität der Zellen nach der Stimulation über mehrere Tage verfolgt. Abbildung 15 belegt einen gleichmäßigen Anstieg an toten Zellen nach der Stimulation mit anti-CD66b bzw. der IgM Kontrolle oder ohne jegliches Stimulanz.

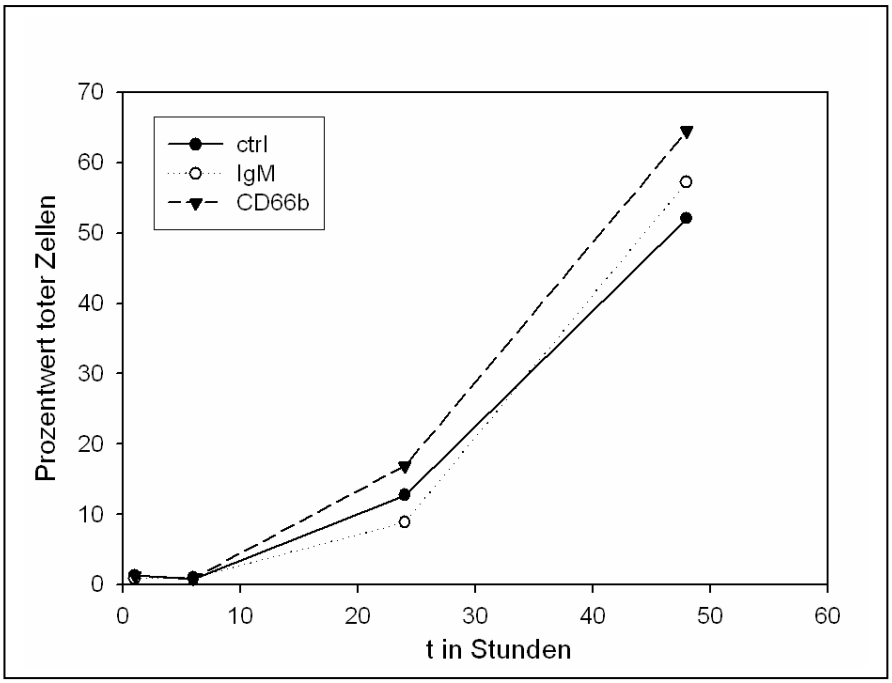



**Abbildung 15: Vitalität der Zellen nach CD66b Ligation**

Die PMN wurden mit anti-**CD66b** sowie als Kontrolle mit **IgM** für 1, 6, 24 und 48h inkubiert. Zusätzlich wurde eine unstimulierte Kontrolle (**Kontr.**) mitgeführt. Der Anteil an toten Zellen wurde anhand der Permeabilität der Zellmembran für Propidiumjodid ermittelt und durchflußcytometrisch bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von n=3.

Die mit anti-CD66b stimulierten Zellen weisen zu allen Zeitpunkten eine mit den Kontrollen vergleichbare Vitalität auf. Eine passive Freisetzung des IL-8 aufgrund massiver Degranulierung in den stimulierten, nicht jedoch in den unstimulierten Kontrollen ist daher auszuschließen. Der starke Anstieg an toten Zellen im Bereich zwischen 24 und 48h ist auf die kurze Lebensdauer von reifen Neutrophilen zurückzuführen.

Zusammenfassend konnte in stimulierten wie unstimulierten Neutrophilen keine Produktion der pro-inflammatorischen Cytokine IL-1β und IL-6 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu steht die differenzierte Synthese und Sekretion von zwei Varianten des anti-inflammatorischen IL-1RA sowie des Chemokins IL-8. Während das sezernierte sIL-1RA erst nach Stimulation induziert und sezerniert wird, konnte das intrazelluläre icIL-1RA 16kDa konstitutiv nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist dies besonders vor dem Hintergrund, dass für sIL-1RA und icIL-1RA 16kDa eine gemeinsame mRNA beschrieben wurde (Malyak et al., 1998). Des weiteren konnte die 18kDa Isoform von IL-1RA als mRNA, nicht jedoch als Protein detektiert werden. Für IL-8 ist nach LPS-Stimulation zwar eine Induktion auf mRNA- und auf Proteinebene zu beobachten, diese fällt jedoch weitaus geringer aus als die *de novo* Synthese von sIL-1RA. Dass trotz der geringen Induzierbarkeit von IL-8 die sezernierte Menge dieses Cytokins die von sIL-1RA sogar noch übertrifft, liegt vermutlich an einem intrazellulären Vorrat an präformiertem IL-8, das bei Stimulation freigesetzt werden kann. Während Stimulantien wie LPS und GM-CSF die Sekretion und auch *de novo* Synthese von IL-1RA und IL-8 induzieren, vermittelt die Ligation von oberflächenständigem CD66b lediglich die Freisetzung von präformiertem IL-8.

## *4.2. Cytokinproduktion von PMN aus CD34$^+$ Stammzellen*

### 4.2.1. Differenzierung von CD34$^+$ Stammzellen in Neutrophile

Die bisher beschriebenen Versuche wurden alle mit Neutrophilen durchgeführt, die aus Buffy coats bzw. Vollblut isoliert wurden. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass PMN auch nach Stimulation keine pro-inflammatorischen Cytokine produzieren.

Um der Kritik entgegenzugehen, dass mit diesem Isolierungsprotokoll eventuell nur eine anti-inflammatorische Subpopulation aufgereinigt wird, wurden aus Nabelschnurblut CD34$^+$ hämatopoetische Stammzellen isoliert. Diese wurden dann *in vitro* 14 Tage mit G-CSF in Richtung Granulocyten und als Kontrolle 7 Tage mit M-CSF in Richtung Monocyten differenziert. Dadurch sollte gezeigt werden, dass durch die Festlegung auf eine granulocytäre Entwicklung die Expression pro-inflammatorischer Cytokine ausgeschlossen wird, im Verlauf der monocytären Entwicklung aus Stammzellen des gleichen Individuums diese Expression jedoch stattfindet.

Um die Differenzierung in granulocytäre und monocytäre Zellen zu kontrollieren, wurden die Zellen im Durchflußcytometer auf die Expression bestimmter Oberflächenantigene analysiert. Granulocyten exprimieren den pan-Granulocytenmarker CD66b und schwach CD14. Monocyten exprimieren CD14 wesentlich stärker als Granulocyten, CD66b hingegen nicht. Die expandierten Stammzellen als Kontrolle sollten weder CD14 noch CD66b auf ihrer Oberfläche aufweisen. Außerdem wurden die Zellen angefärbt und unter dem Lichtmikroskop auf ihre morphologischen Eigenschaften untersucht. Abbildung 16 zeigt zusammengefasst die durchflußcytometrischen und die lichtmikroskopischen Analysen.

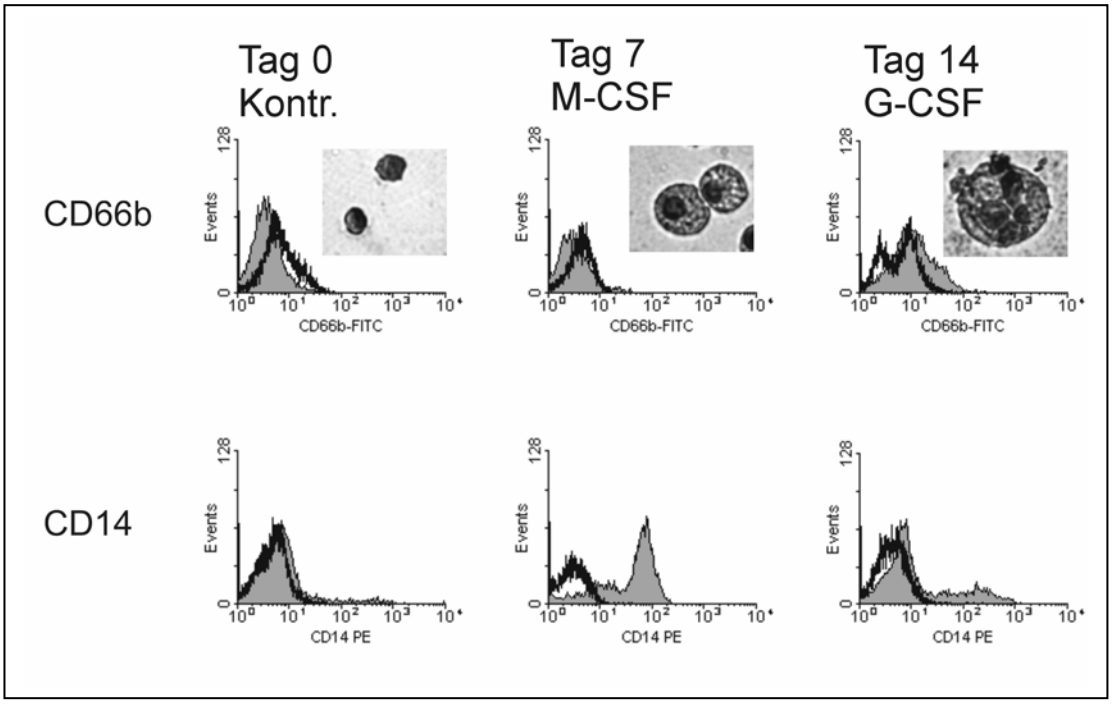



**Abbildung 16: Differenzierung von CD34$^+$ Stammzellen in Neutrophile**

Die differenzierten granulocytären (**Tag 14 G-CSF**) und monocytären (**Tag 7 M-CSF**) Zellen sowie undifferenzierte, expandierte Stammzellen (**Tag 0 Kontr.**) wurden durchflußcytometrisch auf die Expression von **CD14** und **CD66b** untersucht. Zusätzlich wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf ihre Morphologie untersucht.
Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von n = 3.

Die lichtmikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zellen wiesen auf eine erfolgreiche Differenzierung hin. Im Stammzellstadium (Tag 0) war nur ein kleiner Plasmasaum um den Zellkern zu erkennen. In dem für 7 Tage mit M-CSF differenzierten Ansatz (Tag 7 M-CSF) war im Vergleich deutlich die veränderte Kern-Plasma Relation zu erkennen. Die meisten Zellen zeigten monocytäre Eigenschaften mit viel Cytoplasma um einen kompakten Kern. Auch im mit G-CSF behandelten Ansatz konnte eine Erhöhung des cytoplasmatischen Anteils beobachtet werden. Einige Zellen wiesen die charakteristische Morphologie von PMN-Vorläufern wie stabkernigen Neutrophilen auf, und zum Teil konnten auch segmentierte Kerne wie von reifen PMN beobachtet werden (Tag 14 G-CSF).

Die durchflußcytometrische Analyse bestätigte diese Ergebnisse. Die mit M-CSF differenzierten Zellen wiesen eine starke Expression von CD14 auf, es konnte jedoch kein CD66b Signal detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte bei den mit G-CSF

behandelten Zellen zumindest eine leichte Expression von CD66b und auch von CD14 festgestellt werden. Die Kontrollzellen vom Tag 0 waren für beide Oberflächenmarker negativ.

### 4.2.2. Cytokinproduktion der differenzierten Zellen

Die Cytokinproduktion der drei verschiedenen Zelltypen – undifferenziert, M-CSF differenziert und G-CSF differenziert – wurde mittels Westernblot untersucht. Dazu wurde von den Zellen jeweils ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne LPS-Stimulation für drei Stunden inkubiert, lysiert und auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nachdem die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet wurden, konnten die Cytokine mit spezifischen Antikörpern wie in 4.1.3 detektiert werden (Abbildung 17).

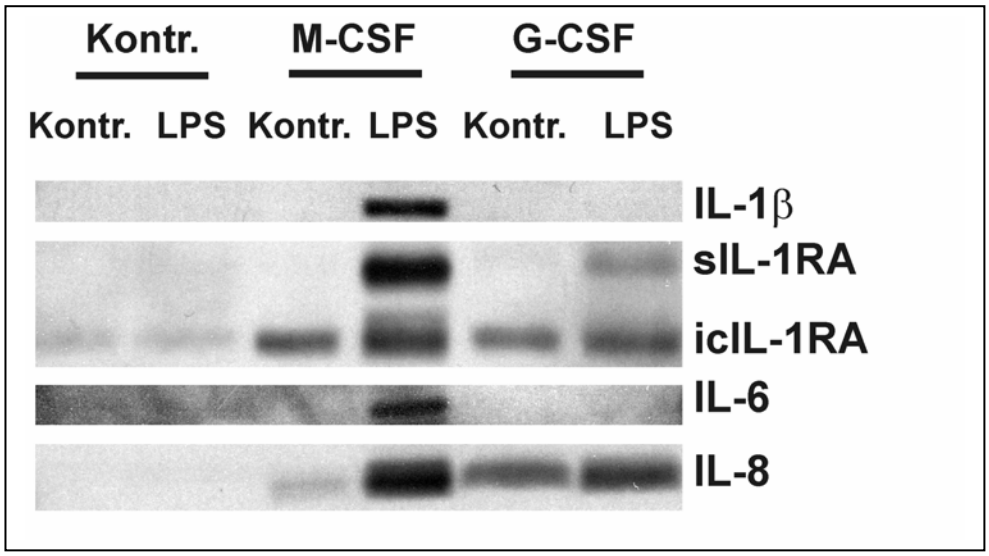



**Abbildung 17: Cytokinproduktion der differenzierten Zellen**

Die $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen wurden in vitro mit **M-CSF** bzw. **G-CSF** in monocytäre bzw. granulocytäre Zellen differenziert. Kontrollzellen (**Kontr.**) blieben unbehandelt.
Die Lysate der drei verschiedenen Zelltypen wurden nach Stimulation mit **LPS** bzw. unbehandelter Kontrollinkubation (**Kontr.**) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot auf die Cytokine **IL-1β**, **IL-1RA**, **IL-6** und **IL-8** detektiert.
Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von n = 3.

Die erhaltenen Westernblots zeigen deutlich, dass eine Expression der pro-inflammatorischen Cytokine IL-1β und IL-6 ausschließlich in den mit LPS

stimulierten monocytären Zellen stattfindet. In den granulocytären Zellen sind – auch nach Stimulation - weder IL-1β noch IL-6 nachweisbar. IL-8 und IL-1RA konnten dagegen sowohl in den monocytären Zellen als auch in den granulocytären Zellen detektiert werden.

Die *in vitro* differenzierten granulocytären Zellen verhalten sich hinsichtlich ihrer Cytokinproduktion also genau wie die aus Buffy coat bzw. Vollblut isolierten Primärzellen der vorherigen Experimente. Dies spricht für eine Zelltypspezifische Expression der pro-inflammatorischen Cytokine in Monocyten, aber nicht in Granulocyten. In den granulocytären Zellen werden IL-8 und zwei Isoformen von IL1-RA, sIL-1RA und icIL-1RA 16kDa exprimiert. Zu erkennen ist auch eine Induzierbarkeit von sIL-1RA. In den unstimulierten Kontrollen war es nicht nachweisbar, konnte jedoch in den LPS-stimulierten Ansätzen gut detektiert werden. Auch dies stimmt mit den aus Primärzellen erhaltenen Ergebnissen überein.

In den LPS-stimulierten monocytären Zellen konnte zusätzlich zu sIL-1RA und icIL-1RA 16kDa noch eine weitere Bande direkt über icIL-1RA 16kDa detektiert werden. Dies entspricht aktueller Literatur, denn Monocyten exprimieren auch die lange icIL-1RA Variante mit 18 kDa (Malyak et al., 1998a). Im direkten Vergleich der IL-8 Expression von monocytären und granulocytären Zellen fällt außerdem auf, dass bei den granulocytären Zellen auch in der unstimulierten Kontrolle eine intensive Bande zu sehen ist. Dies weist auf eine konstitutive IL-8 Produktion hin, wie auch in den Versuchen mit den Primärzellen zu erkennen war. Zusammengefasst entsprechen die mit den *in vitro* differenzierten Zellen erhaltenen Ergebnisse erstaunlich gut den mit den Primärzellen erhaltenen Resultaten und unterstützen damit die Hypothese, dass Granulocyten die pro-inflammatorischen Cytokine IL-1β und IL-6 nicht produzieren.

# 5. Diskussion

Neutrophile Granulocyten stellen mit ca. 60-70% die größte zelluläre Fraktion der Leukocyten dar. Sie sind zudem die ersten Zellen, die an den Ort einer Infektion einwandern, wo sie die eingedrungenen Erreger phagocytieren (Cassatella, 1998). Größere Erreger werden bekämpft, indem die Neutrophilen die Inhalte ihrer Granula ausschütten (Degranulation), und es wird vermutet, dass sie mit Hilfe der Sekretion von Cytokinen weitere Zellen rekrutieren können (Lloyd und Oppenheim, 1992). PMN verlassen das Knochenmark jedoch als enddifferenzierte Zellen, sie weisen wenig Ribosomen und endoplasmatisches Reticulum auf und überleben nur 48-72 Stunden. Im peripheren Blut beträgt die Halbwertszeit von Neutrophilen sogar nur sechs bis sieben Stunden (Hellewell und Williams, 1994). Ihre Fähigkeit, Proteine zu produzieren ist daher in Frage gestellt, und die Cytokinproduktion der PMN ist eine zentrale Thematik, mit der sich in den letzten Jahren viele Forschergruppen beschäftigt haben.

Aufgrund der Tatsache, dass neutrophile Granulocyten die ersten Zellen am Ort einer Infektion sind, und sie in entzündetem Gewebe in großer Zahl zu finden sind, wurde angenommen, dass sie pro-inflammatorisch wirken. Zunächst wurde daher hauptsächlich die Produktion von pro-inflammatorischen Cytokinen wie IL-1β, IL-6 und TNF-α, sowie das auf Neutrophile chemotaktisch wirkende IL-8 untersucht. Die Ergebnisse dieser technisch ähnlich durchgeführten Untersuchungen widersprechen sich jedoch zum Teil beträchtlich. Meist wurde von einer Produktion der pro-inflammatorischen Cytokine und von IL-8 berichtet, und das mutmaßliche Cytokinspektrum der Neutrophilen stimmte daher auffallend mit dem der Monocyten überein (Lloyd und Oppenheim, 1992; Cassatella 1995).

Altstaedt et al. (1996) entwickelten ein Verfahren, mit dem es möglich war, hochreine neutrophile Granulocyten ohne Voraktivierung zu isolieren. Mit diesen Zellen konnte die z.T. in der Literatur beschriebene Sekretion der pro-inflammatorischen Cytokine IL-1β, IL-6 und TNF-α jedoch nicht nachvollzogen werden. Bestätigt wurde dagegen die Sekretion von IL-8 (Altstaedt et al., 1996), sowie des anti-inflammatorischen IL-1RA (Altstaedt, 1998).

Eine Erklärung für diese Abweichung könnten von der Ohe et al. liefern: Die Sekretion von Typ-I Interferon, wie von Shirafuji und Brandt beschrieben (Shirafuji et al., 1990; Brandt et al., 1994), konnte mit den hochreinen Neutrophilen nicht gezeigt werden. Eine willkürliche Kontamination mit geringen Anteilen von PBMCs resultierte jedoch in der Detektion von IFN-α (von der Ohe et al., 2001). Auch für die pro-inflammatorischen Cytokine IL-1β und IL-6 konnte dieser Effekt nachgewiesen werden (Altstaedt, 1998). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur auf kontaminierende Zellen zurückzuführen sind.

Im Rahmen dieser Dissertation konnten zunächst die Daten über die Cytokinproduktion der hochreinen Neutrophilen ergänzt werden. So konnte gezeigt werden, dass weder im Überstand (Abbildung 5) noch im Lysat (Abbildung 6) der Neutrophilen die pro-inflammatorischen Cytokine IL-1β oder IL-6 nachweisbar sind. Auch durch Stimulation mit LPS, mit dem eine Induktion von IL-1 in Monocyten beschrieben ist (Beuscher et al., 1990), konnte keine Produktion von IL-1β oder IL-6 in PMN erreicht werden. Die Fähigkeit von zirkulierenden PMN, pro-inflammatorische Cytokine zu synthetisieren ist daher unwahrscheinlich.

Im Gegensatz dazu konnten das Chemokin IL-8 und das anti-inflammatorische IL-1RA sowohl im Überstand als auch im Lysat detektiert werden (Abbildungen 5 und 6). Des Weiteren konnte eine *de novo* Synthese von IL-1RA und IL-8 in stimulierten PMN auf mRNA und auch auf Proteinebene gezeigt werden (Abbildungen 8 und 10). Mit Hilfe subzellulärer Fraktionierungstechniken wurde dann die Lokalisation der Cytokine innerhalb der Zelle aufgedeckt (Abbildung 7) und durch intrazelluläre Färbungen konnte ein Vorrat aus präformiertem IL-8 in unstimulierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 11). Schließlich konnte mit aus hämatopoetischen Stammzellen differenzierten granulocytären Zellen das Cytokinspektrum der reifen Neutrophilen nachvollzogen werden. Wie auch die aus peripherem Blut isolierten PMN, exprimierten die *in vitro* differenzierten Zellen kein IL-1β und IL-6, dafür aber zwei IL-1RA Isoformen und IL-8. Als Kontrolle mitgeführte *in vitro* differenzierte monocytäre Zellen zeigten ein deutliches Signal für IL-1β und IL-6 (Abbildung 17).

IL-1RA ist der Antagonist von IL-1, beide konkurrieren um den gemeinsamen, signalweiterleitenden Rezeptor IL-1RI. Die Bindung von IL-1RA an IL-1RI verhindert jedoch dessen Wechselwirkung mit dem IL-1Rezeptor assoziierten Protein (IL-1rap), das für die Signaltransduktion essentiell ist (siehe Abbildung 2). IL-1RA kann also mittels kompetetiver Hemmung direkt der pro-inflammatorischen Wirkung von IL-1β entgegenwirken (Arend et al., 1998). Vermutlich auf diesem Weg kann IL-1RA die LPS-induzierte Produktion von IL-1 und TNF-α in PBMCs inhibieren, ebenso die IL-1-induzierte Produktion von IL-1, IL-6 und TNF-α (Granowitz et al., 1992a; Granowitz et al., 1992b). Durch die Sekretion von IL-1RA können Neutrophile also einem von IL-1 dominierten, pro-inflammatorischen Milieu entgegenwirken. Besonders effektiv wird die anti-inflammatorische Wirkung dadurch, dass PMN als einzige bekannte Zellen IL-1RA, gleichzeitig aber nicht IL-1 produzieren.

Kürzlich wurde die Fähigkeit der PMN publiziert, mit Hilfe des Typ II IL-1Rezeptors (IL-1RII) große Mengen an IL-1 Molekülen zu internalisieren und damit aus der Umgebung zu entfernen (Bourke et al., 2003). IL-1RII bindet zwar IL-1, leitet jedoch kein Signal weiter (siehe Abbildung 2). PMN exprimieren zu 90% diesen stillen Rezeptor und recyclen ihn nach Entfernung des Liganden schnell wieder auf der Oberfläche (Bourke et al., 2003). Diese von den Autoren als „Aas fressen“ bezeichnete Entfernung von IL-1 aus der Umgebung der Zelle bildet eine ideale Ergänzung zum sezernierten IL-1RA: während der pro-inflammatorische Faktor IL-1 entfernt wird, wird das anti-inflammatorische IL-1RA hinzugefügt und damit das IL-1/IL-1RA-Gleichgewicht der Umgebung in die anti-inflammatorische Richtung verschoben.

PMN exprimieren auf Proteinebene zwei Varianten von IL-1RA, die 23 kDa sezernierte Variante sIL-1RA und die 16 kDa Form des icIL-1RA (Abbildung 6 und Arend). Da icIL-1RA keine Signalsequenz für die Prozessierung über den Golgi-Apparat aufweist, wurde in der Literatur davon ausgegangen, dass beide icIL-1RA Varianten im Cytoplasma zu finden sind. Im Rahmen der subzellulären Fraktionierung konnte dies für icIL-1RA 16kDa in Neutrophilen bestätigt werden (Abbildung 7). Das Experiment zeigt deutlich die Restriktion von icIL-1RA 16kDa auf das Cytoplasma.

Da PMN kein IL-1β produzieren, stellt sich die Frage des Nutzens eines IL-1-Antagonisten im Zellinneren. Ein möglicher Mechanismus wäre die Bindung von icIL-1RA an den internalisierten IL-1Rezeptor und damit eine Abschwächung des pro-inflammatorischen Signals von ebenfalls internalisiertem IL-1. Dieses Modell ist jedoch fraglich, da das icIL-1RA für die Interaktion mit dem IL-1Rezeptor in endocytotischen Vesikeln lokalisiert sein müsste. Aufgrund der fehlenden Signalsequenz ist dies eben gerade nicht der Fall. In der subzellulären Fraktionierung konnten in der Fraktion mit Membranbestandteilen und Vesikeln (Fraktion 4) lediglich sIL-1RA und IL-8 detektiert werden (Abbildung 7). Zudem wird von PMN zu 90% der IL-1RII exprimiert, der signalweiterleitende IL-1RI ist nur zu einem geringen Teil auf der Oberfläche vorhanden (Bourke et al., 1993). Trotzdem konnte beobachtet werden (Watson et al., 1995), dass hohe Level an intracellulärem IL-1RA in IL-1-stimulierten Zellen zu einer gedrosselten Expression von Chemokin-mRNA führen, also zu einer Verminderung des pro-inflammatorischen Signals von außen. Für die von PMN nicht exprimierte 18kDa Variante icIL-1RA long wurde dieser Effekt erst kürzlich der Hemmung der p38 Map-Kinase (MAPK) und NF-κB Signaltransduktionswege zugeschrieben (Garat et al., 2003). Ein möglicher Mechanismus, der auf einer Interaktion des icIL-1RA long mit einer Komponente des COP9 Signalosoms basiert, wurde vorgestellt (Banda et al, 2005). Dies wäre zwar auch ein möglicher Mechanismus für icIL-1RA 16kDa, eine Assoziation von COP9 mit dieser kurzen Variante konnte jedoch noch nicht gezeigt werden (Banda et al, 2005). Die Proteinsequenzen von icIL-1RA 16kDa und long unterscheiden sich um 21 Aminosäuren am n-terminalen Ende.

Teilweise wurde beschrieben, dass auch icIL-1RA von Epithelzellen ausgeschüttet werden kann (Bigler et al., 1992; Arend, 1993, Levine et al., 1997). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unbekannt, inwieweit es auf mehr als nur die Freisetzung aus beschädigten Zellen zurückzuführen sein könnte, ist nicht klar (Levine et al., 1997). PMN sind äußerst kurzlebige Zellen, und auch durch exzessive Degranulierung können intrazelluläre Bestandteile freigesetzt werden. Das intrazelluläre Reservoir an IL-1RA könnte dann als letztes Mittel gegen eine überhandnehmende Entzündungsreaktion dienen, in deren Verlauf die PMN so stark aktiviert wurden, dass sie degranulieren.

Die geringe Induzierbarkeit von icIL-1RA 16kDa in Neutrophilen spricht gegen seine Sekretion als Hauptfunktion. Gegenüber der Menge an sIL-1RA die induziert und ausgeschüttet werden kann, ist das icIL-1RA 16kDa, das durch einen noch unbekannten Mechanismus in den extrazellulären Raum gelangen könnte, vermutlich zu vernachlässigen.

Bemerkenswert ist die starke Induzierbarkeit des sIL-1RA Proteins im Vergleich zur konstitutiven Expression von icIL-1RA 16kDa, da für beide eine gemeinsame mRNA beschrieben wurde, die ebenfalls stark reguliert ist. (Malyak et al., 1998; Arend 2002). Denkbar wäre eine sehr niedrige Effizienz des zu icIL-1RA 16kDa führenden Translationsstartpunktes. Diese niedrige Translationsrate, verbunden mit der fehlenden Signalsequenz, könnte so über längere Zeit zur beobachteten Menge icIL-1RA 16kDa akkumulieren. Ein Hinweis darauf könnte die *in vitro* Differenzierung der $CD34^+$ Zellen geben: in Abbildung 17 ist eine Expression von IL-1RA 16kDa bereits in den undifferenzierten Kontrollzellen zu erkennen, während die anderen Cytokine erst in den reiferen Zellen detektiert wurden. Eine Expression von icIL-1RA 16kDa, die niedrig aber konstant vom Stadium der myeloischen Vorläuferzellen bis zum reifen Neutrophilen verläuft, könnte die konstitutive icIL-1RA 16kDa Menge gut erklären. Auch wenn bei Stimulation der Zelle die mRNA-Menge stark ansteigt, ist bei einer sehr niedrigen Translationseffizienz eine Erhöhung des detektierbaren icIL-1RA 16kDa im Westernblot vielleicht nicht sichtbar.

Durch die kurze Lebensdauer von PMN und die Tatsache, dass sie nur über wenig Ribosomen und endoplasmatisches Reticulum verfügen, ist fraglich, ob die gefundenen Cytokine *de novo* synthetisiert werden oder ob eine geringe Synthese-kapazität vielleicht ausschliesslich auf den Haushalt der Zelle verwandt wird.
Während sIL-1RA von den PMN erst nach LPS-Stimulation exprimiert wird, sind icIL-1RA 16kDa und IL-8 auch in den unstimulierten Kontrollen nachweisbar (Abbildung 6). Durch die Induzierbarkeit von sIL-1RA ist zunächst die Kapazität der PMN zur *de novo* Synthese von Proteinen bewiesen. Da jedoch IL-8 und auch icIL-1RA konstitutiv detektiert werden konnten, wurden noch weitere Experimente durchgeführt. Diese zeigten, dass für alle Cytokine nach Stimulation der PMN die mRNA Menge ansteigt (Abbildung 8) und dass ein Einbau an radioaktiv markierten Aminosäuren nachweisbar ist (Abbildung 10).

IL-8 zeigt ähnlich wie icIL-1RA nur eine geringe Induktion nach Stimulation, sowohl auf mRNA Ebene, als auch auf Protein Ebene (Abbildung 8 und 10). Trotzdem ist im ELISA ein starker Anstieg an sezerniertem IL-8 von stimulierten gegenüber unstimulierten PMN zu erkennen (Abbildung 5). Während im Überstand der unstimulierten Zellen durchschnittlich nur 179 pg/ml messbar waren, stieg die Menge an IL-8 in den Überständen von LPS-stimulierten PMN auf im Durchschnitt 4034 pg/ml an. Diese Menge an IL-8 ist vergleichbar mit sIL-1RA (3342 pg/ml). Bei einem Vergleich der Molekulargewichte wird zudem deutlich, dass für diese Menge fast dreimal so viele IL-8 Moleküle (8 kDa) synthetisiert werden müssen wie sIL-1RA (23 kDa).

Die geringe Induzierbarkeit der IL-8 mRNA steht daher im Gegensatz zur stark regulierten Sekretion des Proteins. Eine mögliche Erklärung bietet der Vergleich zwischen den Cytokin mRNAs unstimulierter PMN (Abbildung 9). In den unstimulierten Zellen direkt nach der Präparation ist deutlich mehr IL-8 mRNA vorhanden als icIL-1RA und auch sIL-1RA mRNA. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine Regulation der IL-8 Expression in den Neutrophilen post-transkriptionell stattfinden könnte.

Tatsächlich kann die Synthese von Cytokinen auch durch Mechanismen reguliert werden, die den Abbau der mRNAs modulieren (Holtmann et al., 1999). In einigen Zelllinien konnte eine Modulation von mRNA Halbwertszeiten für IL-8 gezeigt werden (Stoeckle et al., 1991; Chaudhary et al., 1996). In der 3´ untranslatierten Region von IL-8 sind zudem AU-reiche Sequenzen enthalten, die charakteristisch für einen schnellen Abbau von Cytokin-Transkripten sind. Spezialisierte Proteine können mit diesen Sequenzen interagieren und dadurch den Abbau der Transkripte verhindern (Shaw et al., 1986, Chen und Shyu, 1995). Ein Einfluss der p38 MAP Kinase Kaskade auf die Stabilität der IL-8 mRNA konnte gezeigt werden (Holtmann et al., 1999). Möglich wäre also, dass die Neutrophilen konstitutiv eine hohe Menge an IL-8 mRNA transkribieren, die im unstimulierten Zustand schnell wieder abgebaut wird. Durch Stimulation der Zelle könnte die Halbwertszeit der IL-8 mRNA verlängert werden, und dann eine erfolgreiche Translation stattfinden.

Jedoch ist auch auf der Proteinebene nur eine geringe Induktion von IL-8 in PMN zu erkennen (Abbildung 10). Im Versuch mit $^{35}$-S markiertem Methionin und Cystein ist in den stimulierten Lysaten für IL-8 ein deutlich schwächeres Signal als für sIL-1RA zu sehen. Zwar ist in der unstimulierten Kontrolle keine Bande zu erkennen, verglichen mit der gemessenen Sekretion des Proteins könnte man jedoch eine deutlichere Steigerung erwarten.

Mit Hilfe von direkt markierten Antikörpern konnte in unstimulierten PMN im Vollblut präformiertes IL-8 Protein entdeckt werden (Abbildung 11). Es ist daher möglich, dass IL-8 während der Entwicklung der Neutrophilen produziert wird und in den ausgereiften, zirkulierenden Zellen präformiert vorliegt. Matzer et al. unterstützen dieses Hypothese im Mausmodell (Matzer et al., 2001). Sie fanden das homologe Protein zu IL-8, MIP-2, jedoch nicht dessen mRNA in den reifen Neutrophilen der Maus. MIP-2 positive PMN fanden sich sowohl in der Milz von mit *Yersinia enterocolitica* infizierten Mäusen als auch in den gesunden Kontrollen. Die Infektion bewirkte dabei einen Anstieg der Anzahl an MIP-2 positiven Neutrophilen um das vierfache. Dies könnte mit der Mobilisierung von PMN aus dem Knochenmark erklärt werden.

IL-8 wird in Form eines Präkursors von 99 Aminosäuren (AS) synthetisiert, der von noch unbekannten Proteasen in die reifen Proteine mit 72 bzw. 77 AS gespalten wird. Aktuell konnte gezeigt werden, dass Elastase und Cathepsin *in vitro* das 77 AS IL-8 in 72 AS IL-8 spalten (Padrines et al., 1994). Diese Enzyme sind auch in den azurophilen Granula von Neutrophilen zu finden. Ein möglicher Mechanismus für die Prozessierung von IL-8 wäre daher der Transport des IL-8 Präkursors in die azurophilen Granula während der PMN-Reifung. Dort könnte es dann in die aktiven Formen gespalten werden, gespeichert und letztlich als Antwort auf einen Reiz ausgeschüttet werden. IL-8 wurde jedoch nicht in den azurophilen Granula detektiert, sondern in der Fraktion mit Golgi-Apparat und ER. Dies könnte entweder dadurch zu erklären sein, dass der benutzte Antikörper den IL-8 Präkursor nicht erkennt, sondern nur die reife Variante oder aber der Speicherort des präformierten IL-8 ist im Bereich des Golgi-Apparates.

Erstaunlicherweise bewirkt eine gleichzeitige Oberflächenfärbung mit anti-CD66b eine Abnahme des intrazellulären IL-8 Signals in den PMN (Abbildung 11). Tatsächlich konnte nach Ligation von CD66b mit monoklonalen Antikörpern eine Ausschüttung von IL-8 im ELISA gemessen werden (Abbildung 12A). Eine Sekretion von IL-1RA war jedoch nicht nachweisbar (Abbildung 12B) und eine mRNA Quantifizierung ergab zudem, dass für beide Cytokine keine Induktion, also Erhöhung der mRNA Menge stattfindet. Besonders für IL-8 ist dies interessant, da die im ELISA gemessene Menge dann auf die Ausschüttung präformierten Cytokins zurückzuführen sein muss. Auch nach der Stimulation mit anti-CD66b Antikörpern bleiben die Zellen vital (Abbildung 15), dies spricht für einen gerichteten Mechanismus und nicht für die Freisetzung infolge übermäßen Degranulierens.

Nach wie vor ist jedoch durch die Stimulation mit z.B. LPS eine Induktion von IL-8 zu messen. Die intrazelluläre Speicherung von präformiertem IL-8 kann daher ein akzessorischer Mechanismus sein, der eine schnelle Mobilisierung größerer Mengen an Cytokin ermöglicht. Die Freisetzung von präformiertem IL-8 nach CD66b Ligation könnte sogar einen neuen, besonders niedrigen Aktivierungstatus der Neutrophilen darstellen. Der natürliche Ligand für CD66b ist noch nicht endgültig bestimmt worden, so dass der *in vitro* mit Hilfe von kreuzvernetzenden Antikörpern gemessene Effekt vielleicht nicht ohne weiteres auf die Situation *in vivo* übertragbar ist. Trotzdem stellt die Ligation von CD66b eine Möglichkeit dar, einen Mechanismus zu untersuchen, der zu einer gerichteten Freisetzung eines präformierten Proteins führt, aber nicht dessen *de novo* Synthese induziert.

Die Ligation von CD66b auf der Oberfläche von Neutrophilen erhöht die Adhäsion von PMN an Fibronektin (Nair et al., 2001), einem multifunktionellen Glykoprotein der extrazellulären Matrix, das an der Zellmigration beteiligt ist (Blum et al., 2005). CD66a und b sind darüber hinaus als Rezeptoren für Galektin-3 (Feuk-Lagerstedt et al., 1999) vorgeschlagen worden, einem beta-Galaktosid bindenden Lektin, dessen physiologische Rolle noch nicht endgültig geklärt ist. Für Galektin-3 konnte gezeigt werden, dass es Laminin (Cherayil, 1990) und Elastin (Ochieng et al., 1999) bindet, weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix.

Die Kombinierung der oben genannten Referenzen, die eine Interaktion von CD66b mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix suggerieren, mit unseren Erkenntissen, der gerichteten Freisetzung von IL-8 nach CD66b Ligation, könnte auf eine Rolle für CD66b in der Neutrophilen-Migration hindeuten. Neutrophile sind die ersten Zellen, die aus dem Blut in das Gewebe, an den Ort einer Infektion auswandern. Dieser Prozess der Extravasation setzt die Expression und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen auf der Zelle sowie den Aufbau eines chemotaktischen Gradienten im extravaskulären Raum voraus. Da IL-8 chemoattraktiv auf alle migratorischen Leukocyten wirkt und darüber hinaus ganz spezifisch neutrophile Granulocyten aktiviert (Mukaida und Matshushima, 1996), könnte seine Freisetzung infolge einer Interaktion mit der extrazellulären Matrix eine Art chemotaktische Fährte für die nachfolgenden Zellen darstellen.

Die Kontrolle der Chemokinexpression ist ein kritischer Schritt in der Regulation der Leukocyteninfiltration und steuert die Intensität und Art der entstehenden Immunantwort. Die starke Kontrolle der Expression von IL-8 wird dadurch deutlich, dass unter Normalbedingungen von PMN kein oder nur wenig IL-8 sezerniert wird (Abbildung 5). Auf eine Stimulation der Neutrophilen folgt jedoch eine schnelle Antwort. Vermutlich wird zunächst das präformierte IL-8 ausgeschüttet. Ist der Stimulationsreiz stark genug, so wird darüber hinaus die *de novo* Synthese von IL-8 induziert. Vermutlich verfügen die Neutrophilen sogar über einen Mechanismus, um die Migration nachfolgender Zellen abzustellen: Hattar et al. konnten zeigen, dass eine erhöhte Zelldichte an Neutrophilen die Sekretion von IL-8 hemmt. Als hauptsächlich dafür verantwortlich wurde IL-1RA identifiziert (Hattar et al., 2001).

Als erste Zellen am Ort einer Infektion, bestimmen die Neutrophilen mit ihrem anti-inflammatorischen Cytokinspektrum zunächst das Milieu in ihrem Umfeld. Denkbar wäre sogar eine Beseitung kleinerer Infektionen durch die phagocytierenden PMN bevor die nachfolgenden Makrophagen einwandern. In Abwesenheit von Monocyten könnte eine „stille Infektion“ stattfinden, da die klassischen Entzündungssymptome wie Rötung, Schwellung und Schmerz erst durch pro-inflammatorische Cytokine hervorgerufen werden. Trotz der alltäglichen Konfrontation mit Krankheitserregern entsteht nämlich nur selten eine von uns bemerkte Entzündung im Körper, und wenn

möglich können wertvolle Ressourcen des Immunsystems gespart werden. Dies wäre mit dem gängigen Bild der Neutrophilen nicht zu erklären, wohl aber mit der in dieser Arbeit charakterisierten, anti-inflammatorischen Rolle dieses Phagocyten.

Schaffen es die PMN nicht rechtzeitig vor Einwanderung der Monocyten/Makrophagen die Erreger zu beseitigen, d.h. ist die Infektion schwerwiegender, wird durch pro-inflammatorische Cytokine eine Entzündungsreaktion in Gang gesetzt. Diese bedeutet für den Körper jedoch immer auch eine Gewebeschädigung. Im extremsten Fall einer dysregulierten inflammatorischen Reaktion, der Sepsis, besteht Lebensgefahr aufgrund multiplen Organversagens. Das Immunsystem kommt mit der systemischen Infektion, die dann den Blutkreislauf erreicht hat, nicht mehr zurecht. Durch die Überproduktion pro-inflammatorischer Cytokine eskalieren die Mechanismen mit denen ansonsten die Infektionen lokal bekämpft werden, es kommt zu einem massiven Austritt von Flüssigkeit aus dem Blutstrom und einer Sauerstoffunterversorgung im Gewebe.

Die strenge Regulation einer Immunantwort ist daher mindestens ebenso wichtig wie ihre schnelle Induktion. Aktuelle Publikationen konnten die Gabe von rekombinantem G-CSF mit einer erhöhten Überlebensquote von Sepsis-Patienten und einer niedrigeren Infektionsrate nach größeren Eingriffen korrelieren (Crawford et al., 1991, Grigull et al., 2002, Cheng et al., 2004). G-CSF induziert die Reifung und Mobilisierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark. Diese positiven, anti-inflammatorischen Effekte einer G-CSF Therapie können wiederum nur mit der anti-inflammatorischen Rolle der PMN erklärt werden.

Die neutrophilen Granulocyten bilden daher innterhalb der Leukocyten und auch innerhalb des Immunsystems einen wichtigen, und in ihren anti-inflammatorischen Eigenschaften auch einzigartigen Teil der Immunregulation.

# 6. Zusammenfassung

Nachdem die Rolle der PMN im Immunsystem lange Zeit nur in der Phagocytose von Mikroorganismen gesehen wurde, sind in den letzten Jahren diverse Publikationen zur Cytokinproduktion von Neutrophilen erschienen. Trotz ähnlicher Versuche variieren diese Ergebnisse jedoch so stark, dass die Reinheit der benutzten Zellen in Frage gestellt werden kann. Altstaedt et al. entwickelten daher eine Methode, mit der PMN hochrein und nicht voraktiviert isoliert werden können.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulocyten des peripheren Blutes und auch deren *in vitro* differenzierte Vorläuferzellen die pro-inflammatorischen Cytokine IL-1β und IL-6 nicht produzieren. Die differentielle Produktion von IL-8 und von zwei Isoformen von IL-1RA konnte jedoch gezeigt werden. Während die Synthese von IL-8 und der intrazellulären Variante von IL-1RA nach Stimulation nur in geringem Maße zunimmt, wird die sezernierte Isoform sIL-1RA durch Inkubation mit LPS und auch mit GM-CSF stark induziert. Im Gegensatz zu sIL-1RA sind icIL-1RA 16kDa und IL-8 auch in den unstimulierten Zellen zu finden.
Es konnte gezeigt werden, dass icIL-1RA 16kDa im Cytoplasma, und sIL-1RA sowie IL-8 vermutlich im Golgi-Apparat lokalisiert sind. Außerdem konnte präformiertes IL-8 in den Zellen detektiert werden, das nach Ligation von CD66b auf der Zelloberfläche ausgeschüttet wird.

Als erste Zellen am Ort einer Infektion bestimmen die Neutrophilen mit ihrem anti-inflammatorischen Cytokinspektrum zunächst das Milieu im Umkreis und rekrutieren mit Hilfe von IL-8 weitere Neutrophile. Durch Freisetzung des präformierten IL-8 während der Extravasation könnte eine Spur für die nachfolgenden Zellen gelegt werden. Als anti-inflammatorische Zellen sind die Neutrophilen essentiell für die Kontrolle und auch für die Abschaltung von inflammatorischen Reaktionen. Postuliert wird darüber hinaus eine „stille“ Infektion, bei der die Neutrophilen in der Abwesenheit von pro-inflammatorischen Cytokinen als erste Zellen am Ort einer Infektion die Erreger durch Phagocytose eliminieren.

# 7. Literatur


1. Abbas, A. K., A. H. Lichtman, und J. S. Pober. 1996
   Immunologie.
   *Verlag Hans Huber*, Göttingen

2. Altstaedt, J., H. Kirchner, und L. Rink. 1996.
   Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8.
   *Immunology* 89:563-568.

3. Altstaedt, J. 1998
   Immunfunktionen reiner neutrophiler Granulocyten.
   Dissertation Med. Fakultät der Med. Universität zu Lübeck

4. Arend, W. P. 1993.
   Interleukin-1 receptor antagonist.
   *Adv.Immunol.* 54:167-227.

5. Arend, W. P., M. Malyak, C. J. Guthridge, und C. Gabay. 1998.
   Interleukin-1 receptor antagonist: Role in biology.
   *Ann. Rev. Immunol.* 16:27-55.

6. Arend, W.P. 2002
   The balance between IL-1 and IL-1RA in disease.
   *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:323-340.

7. Arnold, R., F. Werner, B. Humbert, H. Werchau, und W. Konig. 1994.
   Effect of respiratory syncytial virus-antibody complexes on cytokine (IL-8, IL-6, TNF-alpha) release and respiratory burst in human granulocytes.
   *Immunology* 82:184-191.

8. Banda, N. K., C. Guthridge, D. Sheppard, K. S. Cairns, M. Muggli, D. Bech-Otschir, W. Dubiel, und W. P. Arend. 2005.
Intracellular IL-1 receptor antagonist type 1 inhibits IL-1-induced cytokine production in keratinocytes through binding to the third component of the COP9 signalosome.
*J.Immunol.* 174:3608-3616.

9. Bazzoni, F., M. A. Cassatella, F. Rossi, M. Ceska, B. Dewald, und M. Baggiolini. 1991.
Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8.
*J.Exp.Med.* 173:771-774.

10. Beuscher, H. U., C. Gunther, und M. Rollinghoff. 1990.
IL-1 beta is secreted by activated murine macrophages as biologically inactive precursor.
*J.Immunol.* 144:2179-2183.

11. Bigler, C. F., D. A. Norris, W. L. Weston, und W. P. Arend. 1992.
Interleukin-1 receptor antagonist production by human keratinocytes.
*J.Invest. Dermatol.* 98:38-44.

12. Blum, S., F. Hug, G. M. Hansch, und C. Wagner. 2005.
Fibronectin on activated T lymphocytes is bound to gangliosides and is present in detergent insoluble microdomains.
*Immunol.Cell Biol.* 83:167-174.

13. Borregaard, N. und J. B. Cowland. 1997.
Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte.
*Blood* 89:3503-3521.

14. Bourke, E., A. Cassetti, A. Villa, E. Fadlon, F. Colotta, und A. Mantovani. 2003.
IL-1 beta scavenging by the type II IL-1 decoy receptor in human neutrophils.
*J.Immunol.* 170:5999-6005.

15. Brandt, E. R., A. W. Linnane, und R. J. Devenish. 1994.
Expression of IFN A genes in subpopulations of peripheral blood cells.
*Br.J.Haematol.* 86:717-725.

16. Casimir, C. M., und C. G. Teahan. 1994.
The Respiratory Burst of Neutrophils and Its Deficiency.
The Handbook of Immunopharmacology: Immunopharmacology of Neutrophils. 1. Aufl.
*Academic Press Limited*, London.

17. Cassatella, M. A., F. Bazzoni, M. Ceska, I. Ferro, M. Baggiolini, und G. Berton. 1992.
IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway.
*J.Immunol.* 148:3216-3220.

18. Cassatella, M. A. 1995.
The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils.
*Immunol.Today* 16:21-26.

19. Cassatella, M. A. 1998.
The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10.
*Int.J.Clin.Lab. Res.* 28:148-161.

20. Chaudhary, L. R. und L. V. Avioli. 1996.
Regulation of interleukin-8 gene expression by interleukin-1beta, osteotropic hormones, and protein kinase inhibitors in normal human bone marrow stromal cells.
*J.Biol.Chem.* 271:16591-16596.

21. Chen, C. Y. und A. B. Shyu. 1995.
AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation.
*Trends Biochem.Sci.* 20:465-470.

22. Cheng, A. C., D. P. Stephens, N. M. Anstey, und B. J. Currie. 2004.
Adjunctive granulocyte colony-stimulating factor for treatment of septic shock due to melioidosis.
*Clin. Infect. Dis.* 38:32-37.

23. Cherayil, B. J., S. Chaitovitz, C. Wong, und S. Pillai. 1990.
Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose.
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:7324-7328.

24. Cicco, N. A., A. Lindemann, J. Content, P. Vandenbussche, M. Lubbert, J. Gauss, R. Mertelsmann, und F. Herrmann. 1990.
Inducible production of interleukin-6 by human polymorphonuclear neutrophils: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha.
*Blood* 75:2049-2052.

25. Crawford, J., H. Ozer, R. Stoller, D. Johnson, G. Lyman, I. Tabbara, M. Kris, J. Grous, V. Picozzi, und G. Rausch. 1991.
Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small-cell lung cancer.
*N.Engl.J.Med.* 325:164-170.

26. Dubravec, D. B., D. R. Spriggs, J. A. Mannick, und M. L. Rodrick. 1990.
Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha.
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:6758-6761.

27. Etzioni, A. und R. Alon. 2004.
Leukocyte adhesion deficiency III: a group of integrin activation defects in hematopoietic lineage cells.
*Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* 4:485-490.

28. Faurschou, M. und N. Borregaard. 2003.
Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.
*Microbes.Infect.* 5:1317-1327.

29. Feuk-Lagerstedt, E., E. T. Jordan, H. Leffler, C. Dahlgren, and A. Karlsson. 1999.
Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils.
*J.Immunol.* 163:5592-5598.

30. Fujishima, S., A. R. Hoffman, T. Vu, K. J. Kim, H. Zheng, D. Daniel, Y. Kim, E. F. Wallace, J. W. Larrick, und T. A. Raffin. 1993.
Regulation of Neutrophil Interleukin-8 Gene-Expression and Protein Secretion by Lps, Tnf-Alpha, and Il-1-Beta.
*Cell. Physiol.* 154:478-485.

31. Garat, C. und W. P. Arend. 2003a.
Intracellular IL-1 Ra type 1 inhibits IL-1-induced IL-6 and IL-8 production in Caco-2 intestinal epithelial cells through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappa B pathways.
*Cytokine* 23:31-40.

32. Garat, C. und W. P. Arend. 2003b.
Intracellular IL-1Ra type 1 inhibits IL-1-induced IL-6 and IL-8 production in Caco-2 intestinal epithelial cells through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways.
*Cytokine* 23:31-40.

33. Gordon, M. Y.. 1994.
Origin and Development of Neutrophils.
The Handbook of Immunopharmacology: Immunopharmacology of Neutrophils. 1. Aufl.
*Academic Press Limited*, London.

34. Gosselin, E. J., K. Wardwell, W. F. Rigby, und P. M. Guyre. 1993.
Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3.
*J.Immunol.* 151:1482-1490.

35. Granowitz, E. V., E. Vannier, D. D. Poutsiaka, und C. A. Dinarello. 1992a.
Effect of interleukin-1 (IL-1) blockade on cytokine synthesis: II. IL-1 receptor antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine synthesis by human monocytes.
*Blood* 79:2364-2369.

36. Granowitz, E. V., B. D. Clark, E. Vannier, M. V. Callahan, und C. A. Dinarello. 1992b.
Effect of interleukin-1 (IL-1) blockade on cytokine synthesis: I. IL-1 receptor antagonist inhibits IL-1-induced cytokine synthesis and blocks the binding of IL-1 to its type II receptor on human monocytes.
*Blood* 79:2356-2363.

37. Greenfeder, S. A., P. Nunes, L. Kwee, M. Labow, R. A. Chizzonite, und G. Ju. 1995a.
Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex.
*J.Biol.Chem.* 270:13757-13765.

38. Greenfeder, S. A., T. Varnell, G. Powers, K. Lombard-Gillooly, D. Shuster, K. W. McIntyre, D. E. Ryan, W. Levin, V. Madison, und G. Ju. 1995b.
Insertion of a structural domain of interleukin (IL)-1 beta confers agonist activity to the IL-1 receptor antagonist. Implications for IL-1 bioactivity.
*J.Biol.Chem.* 270:22460-22466.

39. Grigull, L., A. Schrauder, A. Schmitt-Thomssen, K. Sykora, und K. Welte. 2002.
Efficacy and safety of G-CSF mobilized granulocyte transfusions in four neutropenic children with sepsis and invasive fungal infection.
*Infection* 30:267-271.

40. Haskill, S., G. Martin, L. Van Le, J. Morris, A. Peace, C. F. Bigler, G. J. Jaffe, C. Hammerberg, S. A. Sporn, S. Fong, und . 1991.
cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium.
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:3681-3685.

41. Hattar, K., L. Fink, K. Fietzner, B. Himmel, F. Grimminger, W. Seeger, und U. Sibelius. 2001.
Cell density regulates neutrophil IL-8 synthesis: Role of IL-1 receptor antagonist and soluble TNF receptors.
*J. Immunol.* 166:6287-6293.

42. Hellewell, P. G. und T. J. Williams. 1994
The Neutrophil.
The Handbook of Immunopharmacology: Immunopharmacology of Neutrophils. 1. Aufl.
*Academic Press Limited*, London.

43. Holtkamp, G. M., A. F. De Vos, A. Kijlstra, und R. Peek. 1999.
Expression of multiple forms of IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) by human retinal pigment epithelial cells: identification of a new IL-1ra exon.
*Eur. Immunol.* 29:215-224.

44. Holtmann, H., R. Winzen, P. Holland, S. Eickemeier, E. Hoffmann, D. Wallach, N. L. Malinin, J. A. Cooper, K. Resch, und M. Kracht. 1999.
Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways.
*Mol. Cell. Biol.* 19:6742-6753.

45. Hord, J. D., J. C. Gay, J. A. Whitlock, R. L. Janco, J. R. Edwards, J. P. Greer, und J. N. Lukens. 1995.
Long-term granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and immunosuppression in the treatment of acquired severe aplastic anemia.
*J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 17:140-144.

46. Huestis, D. W. und L. Glasser. 1994.
The neutrophil in transfusion medicine.
*Transfusion* 34:630-646.

47. Janeway, C., P. Travers, M. Walport und M Shlomchik. 2002.
Immunologie, 5. Auflage.
*Spektrum Akademischer Verlag*, Berlin.

48. Kirchner, H., A. Kruse, P. Neustock und L. Rink. 1993
Cytokine und Interferone, 1. Aufl.
*Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.

49. Kjeldsen, L., H. Sengelov, und N. Borregaard. 1999.
Subcellular fractionation of human neutrophils on Percoll density gradients.
*Immunol. Meth.* 232:131-143.

50. Krakauer, T. und J. J. Oppenheim. 1998.
Interleukin 1 and its receptors.
Encyclopedia of Immunology, 2. Auflage.
*Academic Press*, Oxford,

51. Kuijpers, T. W., C. E. van der Schoot, M. Hoogerwerf, und D. Roos. 1993.
Cross-linking of the carcinoembryonic antigen-like glycoproteins CD66 and CD67 induces neutrophil aggregation.
*J.Immunol.* 151:4934-4940.

52. Kuijpers, T. W., R. A. Van Lier, D. Hamann, M. de Boer, L. Y. Thung, R. S. Weening, A. J. Verhoeven, und D. Roos. 1997.
Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins.
*J.Clin.Invest* 100:1725-1733.

53. Le, C., V, J. B. Cowland, J. Calafat, und N. Borregaard. 1996.
Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells.
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:6454-6457.

54. Levine, S. J., T. Wu, und J. H. Shelhamer. 1997.
Extracellular release of the type I intracellular IL-1 receptor antagonist from human airway epithelial cells: differential effects of IL-4, IL-13, IFN-gamma, and corticosteroids.
*J.Immunol.* 158:5949-5957.

55. Lloyd, A. R. und J. J. Oppenheim. 1992.
Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response.
*Immunol.Today* 13:169-172.

56. Malyak, M., M. F. Smith, A. A. Abel, und W. P. Arend. 1994.
Peripheral-Blood Neutrophil Production of Interleukin-1 Receptor Antagonist und Interleukin-1-Beta.
*Clin. Immunol.* 14:20-30.

57. Malyak, M., M. F. Smith, A. A. Abel, K. R. Hance, und W. P. Arend. 1998a.
The differential production of three forms of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils and monocytes.
*J. Immunol.* 161:2004-2010.

58. Malyak, M., J. M. Guthridge, K. R. Hance, S. K. Dower, J. H. Freed, und W. P. Arend. 1998b.
Characterization of a low molecular weight isoform of IL-1 receptor antagonist.
*J.Immunol.* 161:1997-2003.

59. Mukaida, N. und K. Matsushima. 1998.
Interleukin 8 and its receptor.
Encyclopedia of Immunology 2. Auflage.
*Academic Press*, Oxford.

60. Marucha, P. T., R. A. Zeff, und D. L. Kreutzer. 1990.
Cytokine regulation of IL-1 beta gene expression in the human polymorphonuclear leukocyte.
*J.Immunol.* 145:2932-2937.

61. Matzer, S. P., T. Baumann, N. W. Lukacs, M. Rollinghoff, und H. U. Beuscher. 2001.
Constitutive expression of macrophage-inflammatory protein 2 (MIP-2) mRNA in bone marrow gives rise to peripheral neutrophils with preformed MIP-2 protein.
*J. Immunol.* 167:4635-4643.

62. Muzio, M., N. Polentarutti, M. Sironi, G. Poli, L. Degioia, M. Introna, A. Mantovani, und F. Colotta. 1995.
Cloning and Characterization of A New Isoform of the Interleukin-1 Receptor Antagonist.
*J. Exp. Med.* 182:623-628.

63. Nair, K. S. und S. M. Zingde. 2001.
Adhesion of neutrophils to fibronectin: role of the cd66 antigens.
*Cell Immunol.* 208:96-106.

64. Ochieng, J., P. Warfield, B. Green-Jarvis, und I. Fentie. 1999.
Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin.
*J.Cell Biochem.* 75:505-514.

65. Padrines, M., M. Wolf, A. Walz, und M. Baggiolini. 1994.
Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3.
*FEBS Lett.* 352:231-235.

66. Peter, H.-H. und W. J. Pichler. 1996.
Klinische Immunologie
*Urban & Schwarzenberg*, München.

67. Phillips, M. L., B. R. Schwartz, A. Etzioni, R. Bayer, H. D. Ochs, J. C. Paulson, und J. M. Harlan. 1995.
Neutrophil adhesion in leukocyte adhesion deficiency syndrome type 2.
*J.Clin.Invest* 96:2898-2906.

68. Roitt, I. M., J. Brostoff und D. K. Male 1995.
Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 3. Auflage.
*Georg Thieme Verlag*, Stuttgart.

69. Shaw, G. und R. Kamen. 1986.
A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation.
*Cell* 46:659-667.

70. Shirafuji, N., S. Matsuda, H. Ogura, K. Tani, H. Kodo, K. Ozawa, S. Nagata, S. Asano, und F. Takaku. 1990.
Granulocyte colony-stimulating factor stimulates human mature neutrophilic granulocytes to produce interferon-alpha.
*Blood* 75:17-19.

71. Skubitz, K. M., T. P. Ducker, und S. A. Goueli. 1992.
CD66 monoclonal antibodies recognize a phosphotyrosine-containing protein bearing a carcinoembryonic antigen cross-reacting antigen on the surface of human neutrophils.
*J.Immunol.* 148:852-860.

72. Skubitz, K. M., K. D. Campbell, K. Ahmed, und A. P. Skubitz. 1995.
CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils.
*J.Immunol.* 155:5382-5390.

73. Skubitz, K. M., K. D. Campbell, und A. P. Skubitz. 1996.
CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils.
*J.Leukoc.Biol.* 60:106-117.

74. Stibenz, D. und C. Buhrer. 1994.
Down-regulation of L-selectin surface expression by various leukocyte isolation procedures.
*Scand.J.Immunol.* 39:59-63.

75. Stoeckle, M. Y. 1991.
Post-transcriptional regulation of gro alpha, beta, gamma, and IL-8 mRNAs by IL-1 beta.
*Nucleic Acids Res.* 19:917-920.

76. Strieter, R. M., J. A. Belperio, und M. P. Keane. 2002.
Cytokines in innate host defense in the lung.
*Clin. Invest.* 109:699-705.

77. Tiku, K., M. L. Tiku, und J. L. Skosey. 1986.
Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils.
*J.Immunol.* 136:3677-3685.

78. von der Ohe, M., J. Altstaedt, U. Gross, und L. Rink. 2001.
Human neutrophils produce macrophage inhibitory protein-1 beta but not type 1 interferons in response to viral stimulation.
*Interferon Cytokine Res.* 21:241-247.

79. Watson, J. M., A. K. Lofquist, C. A. Rinehart, J. C. Olsen, S. S. Makarov, D. G. Kaufman, und J. S. Haskill. 1995.
The intracellular IL-1 receptor antagonist alters IL-1-inducible gene expression without blocking exogenous signaling by IL-1 beta.
*J.Immunol.* 155:4467-4475.

# Eigene Publikationen

*Originalarbeiten*

Schröder A.K., von der Ohe M., Fleischer D., Rink L., Uciechowski P.:
Differential synthesis of two Interleukin-1 receptor antagonist variants and Interleukin-8 by peripheral blood neutrophils.
Cytokine 32/5 (2005): 246-253

Schröder A.K., von der Ohe M., Kolling U., Altstaedt J., Uciechowski P, Dalhoff K., Heussen N., Rink L.:
PMN selectively produce anti-inflammatory IL-1ra and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. (eingereicht)

Schröder A.K., Uciechowski P., Rink L.:
Crosslinking of CD66b on peripheral blood neutrophils mediates the release of IL-8 from intracellular storage. (eingereicht)

Metz C.H.D., Schröder A.K., Plümäkers B., Rink L.:
TH1-type cytokine release is enhanced by zinc supplementation due to increasing numbers of NK-cells. (Mech. Ageing Dev., überarbeitet eingereicht.)

*Übersichtsartikel*

Schröder A.K., Rink L.:
Neutrophil immunity of the elderly.
Mech. Ageing Dev. 124 (2003): 419-425

*Abstracts*

Arlt D., Schröder A., Wagner B., Westphal M, Höppner W.:
Expression of GDNF-family receptors in human tumorous cell lines.
Cancer Detect Prev. Vol. 24/Supplement 1. 2000.

Schröder A.K., Rink L.:
Human neutrophils store IL-8 inside the cell to release it upon activation.
Immunobiology Vol. 204/1-2. 2001.

Schröder A.K., von der Ohe M., Kolling U., Altstaedt J., Uciechowski P., Dalhoff K., Rink L.:
Isolated production of IL-1ra in the absence of IL-1, IL-6 and TNF-α by human neutrophils – an anti-inflammatory role for PMN in the immune response?
Immunobiology Vol. 209/4-6. 2004.

Schröder A.K., von der Ohe M., Rink L., Uciechowski P.:
Differential synthesis of two Interleukin-1 receptor antagonist variants and Interleukin-8 by peripheral blood neutrophils.
Immunobiology Vol. 210/6-8. 2005

# Lebenslauf

Anja Kristina Schröder
geb. am 10.10.1976 in Hamburg, ledig

| | |
|---|---|
| 08/1983 – 07/1987 | Grundschule Karlshöhe, Hamburg |
| 08/1987 – 07/1996 | Gymnasium Grootmoor, Hamburg |
| 08/1993 – 07/1994 | Austauschjahr Ventura Highschool, USA |
| 10/1996 – 02/2002 | Studium der Biologie, Universität Hamburg |
| 05/2001 – 02/2002 | Diplomarbeit am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. H. Kirchner) |
| 02/2002 | Diplom-Biologin |
| 03/2002 – 08/2005 | Dissertation am Institut für Immunologie der RWTH Aachen (Direktor: Prof. Dr. L. Rink) |
| 09/2002 – 05/2005 | Promotionsstipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes |
| seit 09/2005 | wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg/Hessen GmbH, Frankfurt, Abteilung für Stammzellforschung |

# Danksagung

An erster Stelle danke ich selbstverständlich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Lothar Rink, für die Themenstellung und eine exzellente Betreuung sowie für seine Unterstützung und Förderung.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Professor Dr. Klaus Wolf für seine Bereitschaft, als Zweitgutachter zur Verfügung zu stehen.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie möchte ich für eine schöne Zeit mit sehr viel Spaß und neuen Freundschaften danken. Ich bedanke mich bei allen für Anleitung, konstruktive Diskussionen und technische Assistenz, insbesondere bei Herrn Dr. Peter Uciechowski und Frau Daniela Fleischer.

Bei den Versuchen mit den $CD34^+$ Zellen danke ich dem Leiter des Arbeitsbereiches Zellbiologie/Institut für Biomedizinische Technologien, Herrn Professor Dr. Martin Zenke, für die Nutzungsmöglichkeit des MACS-Gerätes und die Überlassung von hyper-IL-6 sowie Herrn Dr. Xin-Sheng Ju für die Einführung in die Methodik.

Für seine Unterstützung jeglicher Art und den fachlichen Gedankenaustausch danke ich meinem Lebenspartner, Herrn Klaus-Helge Ibs.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt und ermutigt haben, meinen Weg zu gehen.