

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. W. Solbach

**Interaktionen zwischen vitalen und apoptotischen neutrophilen
Granulozyten und Modulation der Aktivität neutrophiler
Granulozyten durch Methylprednisolon**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Lars Hellberg

aus Lübeck

Lübeck, 2012

1. Berichtstatter: Prof. Dr. T. Laskay

2. Berichtstatter: Prof. Dr. N. Tautz

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.09.2012

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Neutrophile Granulozyten.....	1
1.1.1	Neutrophile Granula.....	2
1.1.2	Reaktive Sauerstoffspezies.....	3
1.1.3	Zytokinsekretion.....	4
1.1.4	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i> (NETs).....	5
1.1.5	Aktivierung neutrophiler Granulozyten.....	5
1.1.5.1	Wichtige Signalwege neutrophiler Granulozyten.....	5
1.1.5.1.1	Der MAP-Kinase-Signalweg.....	5
1.1.5.1.2	Der PI3-Kinase-Akt-Signalweg.....	6
1.1.5.2	Aktivierung von Neutrophilen durch Toll-Like-Rezeptoren.....	7
1.1.5.3	Aktivierung von Neutrophilen durch Zytokine.....	8
1.1.5.4	Aktivierung von Neutrophilen durch fMLP.....	9
1.1.5.5	Aktivierung von Neutrophilen durch Immunkomplexe.....	10
1.1.6	Apoptose.....	10
1.1.7	Phagozytose.....	11
1.1.7.1	Phagozytose von Mikroorganismen.....	11
1.1.7.2	Phagozytose apoptotischer Zellen.....	12
1.2	Verlauf einer akuten Entzündung.....	13
1.3	Autoimmunität.....	14
1.3.1	Die Rolle neutrophiler Granulozyten im bullösen Pemphigoid (BP).....	15
1.3.2	Glucocorticoide in der Therapie von Autoimmunerkrankungen.....	16
1.4	Zielsetzung.....	17
2	MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1	Puffer und Medien.....	18
2.2	Tiere.....	20
2.3	Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.4	Antikörper.....	22
2.5	Inhibitoren.....	23
2.6	Verbrauchsmittel.....	23
2.7	Kits.....	24
2.8	Proteine und Antikörper für Immunkomplexe.....	24
2.9	Geräte.....	24
2.10	Software.....	25
2.11	Zellkulturbedingungen.....	25
2.12	Isolation humaner neutrophiler Granulozyten aus Vollblut.....	25

2.12.1	Zellzahl- und Reinheitsbestimmung.....	27
2.13	Durchflusszytometrie	27
2.13.1	Detektion reaktiver Sauerstoffspezies mit Dihydrorhodamin 123.....	28
2.13.2	Markierung von Membranantigenen mithilfe von fluoreszenz-markierten Antikörpern.....	28
2.13.3	Detektion der Apoptose- und Nekroserate mit Annexin-V und Propidiumiodid	28
2.14	Apoptose-Induktion	29
2.14.1	Induktion der Apoptose mittels UV-Bestrahlung.....	29
2.14.2	Spontane Apoptose	29
2.14.3	Anreicherung apoptotischer Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS).....	29
2.15	Phagozytose von <i>Beads</i>	30
2.16	Phagozytose apoptotischer Zellen.....	30
2.16.1	Membranfärbung mit PKH-Farbstoffen	30
2.16.2	Phagozytose humaner apoptotischer neutrophiler Granulozyten durch vitale Neutrophile <i>in vitro</i>	31
2.16.3	Analyse der Phagozytose apoptotischer Neutrophiler in Vollblut.....	31
2.16.4	Phagozytose apoptotischer Neutrophiler durch Zellen im Maus <i>Air-Pouch</i>	32
2.17	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>.....	33
2.18	Gewinnung von Zelllysaten mit Trichloressigsäure	34
2.19	Western Blot.....	34
2.20	Statistische Analyse.....	35
3	ERGEBNISSE.....	36
3.1	Modulation der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile durch Serumfaktoren und pro- entzündliche Stimuli	36
3.1.1	Hitzelabile Serumfaktoren aus frischem humanem Serum werden für die Phagozytose apoptotischer Zellen benötigt	36
3.1.2	Die Phagozytose apoptotischer Zellen durch vitale Neutrophile ist EDTA-sensitiv.....	37
3.1.3	Komplement-Faktoren sind wichtig für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile... 38	38
3.1.4	Die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile ist Rac1-abhängig	39
3.1.5	Einfluss von Toll-Like-Rezeptor-Liganden auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile	41
3.1.5.1	Einfluss von Toll-Like-Rezeptor-Liganden auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch isolierte Neutrophile.....	41
3.1.5.2	Einfluss von Toll-Like-Rezeptor-Liganden auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile im Vollblut	41
3.1.6	Einfluss von Zytokinen auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile.....	43
3.1.6.1	Einfluss von Zytokinen auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch isolierte Neutrophile	43
3.1.6.2	Einfluss von Zytokinen auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile im Vollblut.....	43
3.1.7	<i>In vivo</i> Phagozytose apoptotischer neutrophiler Granulozyten durch Neutrophile im Mausmodell .. 44	44
3.1.7.1	Die Phagozytose apoptotischer Zellen ist <i>in vivo</i> bereits nach 10 Minuten nachweisbar.....	46
3.1.7.2	LPS verstärkt <i>in vivo</i> die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile	47

3.2	Wirkung von apoptotischen Zellen auf die Signaltransduktion vitaler neutrophiler Granulozyten	49
3.2.1	Generierung hochreiner apoptotischer Zellen.....	49
3.2.1.1	Aufgereinigte apoptotische Zellen zeigen keine fMLP-induzierte Signaltransduktion	50
3.2.1.2	Aufgereinigte apoptotische Zellen produzieren keine reaktiven Sauerstoffspezies und zeigen keine Phagozytoseaktivität	51
3.2.2	Co-Inkubation von vitalen und apoptotischen Zellen induziert die Aktivierung von Erk1/2 MAP-Kinase	52
3.2.3	Die durch apoptotische Zellen induzierte Sekretion von IL-8 ist abhängig vom Komplementfaktor C5a und dem Erk1/2 Signalweg	53
3.2.4	MAP-Kinasen werden nicht für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile benötigt.	54
3.2.5	Die Anwesenheit apoptotischer Zellen verlängert die Lebensdauer vitaler Neutrophiler	55
3.2.6	Auswirkungen apoptotischer Zellen auf die fMLP-induzierte Signaltransduktion in Neutrophilen ..	57
3.3	Modulation der Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten durch Methylprednisolon	58
3.3.1	Methylprednisolon inhibiert die spontane Apoptose neutrophiler Granulozyten	58
3.3.2	Methylprednisolon inhibiert die IL-8 Sekretion neutrophiler Granulozyten	59
3.3.3	Methylprednisolon hemmt die fMLP-induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies neutrophiler Granulozyten	60
3.3.4	Die fMLP- induzierte Signaltransduktion wird durch Methylprednisolon inhibiert	61
3.3.5	Methylprednisolon hemmt den Gewebeschaden in einem <i>ex vivo</i> Modell des bullösen Pemphigoid.....	62
3.3.6	Methylprednisolon inhibiert die Immunkomplex-induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch Neutrophile.....	63
3.3.7	Methylprednisolon inhibiert die Immunkomplex-induzierte Degranulation neutrophiler Granulozyten	64
3.3.8	Immunkomplex-induzierte Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 MAPK sowie Akt wird durch Methylprednisolon inhibiert.....	65
3.3.8.1	Hinweise auf die Rolle von MAP-Kinase-Phosphatase-1 bei der Methylprednisolon induzierten Inhibition von MAP-Kinasen.....	66
3.3.9	Einfluss der pharmakologischen Inhibition von Erk1/2, p38 und Akt auf die ROS-Produktion und Degranulierung neutrophiler Granulozyten.....	68
3.3.10	Inhibition von Erk1/2, p38 oder Akt verhindert Gewebeschaden in dem <i>Ex-Vivo</i> -Gefrierschnitt-Modell des bullösen Pemphigoid.....	69
4	DISKUSSION.....	70
4.1	Komplementfaktoren sind entscheidend für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch vitale Neutrophile	70
4.2	Pro-entzündliche Stimuli verstärken die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile.....	73
4.3	Die Phagozytose apoptotischer Zellen ist <i>in vivo</i> ein relevanter Prozess.....	75
4.4	Gegensätzliche Regulierung von Erk1/2 sowie Akt und p38 durch apoptotische Zellen.....	77
4.5	Neutrophile Granulozyten sind ein Ziel von Methylprednisolon bei der Behandlung des bullösen Pemphigoid	79
4.6	Ausblick	83
5	ZUSAMMENFASSUNG	84

6	<i>SUMMARY</i>	86
7	LITERATURVERZEICHNIS	87
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	99

1 Einleitung

Der menschliche Körper ist in seiner Umwelt einer großen Anzahl von Mikroorganismen ausgesetzt. Um Krankheiten zu vermeiden, werden verschiedene Mechanismen eingesetzt. Die ersten Abwehrmechanismen eines Organismus gegen Krankheitserreger bilden physikalische Barrieren, wie beispielsweise Epithelien (Haut, Schleimhäute), die einen mechanischen Schutz bieten. Überwindet ein Krankheitserreger diese Barrieren und gelangt in das Gewebe, sind die ersten Zellen, die mit ihm in Kontakt treten die Zellen des angeborenen Immunsystems wie dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen, die Krankheitserreger über verschiedene Mechanismen erkennen und aufnehmen. Zur Erkennung der Mikroorganismen dienen Toll-Like-Rezeptoren (TLR), Scavenger-Rezeptoren und eine Reihe anderer Mustererkennungsrezeptoren. Oponisierte Erreger werden durch Komplementrezeptoren und Fc- γ -Rezeptoren erkannt. Phagozytierte Erreger werden dann im Inneren der Phagozyten unschädlich gemacht. Neben diesen zellulären Mechanismen zählt auch das Komplementsystem zum angeborenen Immunsystem. Es besteht aus Serumfaktoren, die über verschiedene Wege an Krankheitserreger binden und deren Zellmembran zerstören oder opsonisieren können (Murphy, 2011).

1.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (auch Neutrophile, Abb.1) machen 55-65 % der Leukozyten im peripheren Blut eines Erwachsenen aus. Sie entstehen im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen. Wegen ihres charakteristischen segmentierten Zellkernes werden sie auch als polymorphnukleäre Leukozyten (PMN) bezeichnet. Neutrophile sind die ersten Zellen, die an einem Entzündungsort aus dem Blut einwandern, um z.B. eingedrungene Krankheitserreger zu bekämpfen (Murphy, 2011).

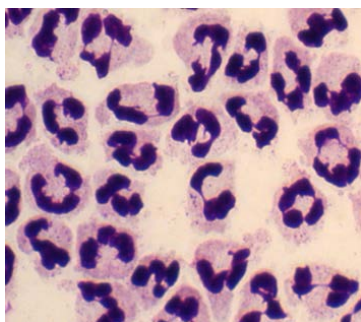


Abb. 1: Aus Vollblut isolierte neutrophile Granulozyten nach Diff-Quick Färbung. Gut zu erkennen sind die für Neutrophile charakteristischen segmentierten Zellkerne.

1.1.1 Neutrophile Granula

Neutrophile Granulozyten enthalten eine Vielzahl von Granula. In diesen sind viele verschiedene Proteine enthalten (Tabelle 1), die schon während der Reifung der Neutrophilen synthetisiert und in den Granula gespeichert werden (Faurischou und Borregaard, 2003). Proteine, die sich in den Granula befinden sind Adhäsionsmoleküle wie z.B. CD66b oder CD11b (Calafat et al., 1993), Rezeptoren, wie z.B. CD16 (Detmers et al., 1995), antibakterielle Proteine wie z.B. Defensine (Ganz et al., 1985) oder Proteasen wie z.B. neutrophile Elastase (Egesten et al., 1994). Werden Neutrophile stimuliert, werden je nach Stärke des Stimulus verschiedene Granula an der Zellmembran entleert. Durch den Transport verschiedener Rezeptoren an die Zelloberfläche kann so z.B. die Bereitschaft der Neutrophilen auf Stimuli in entzündetem Gewebe zu reagieren erhöht werden. Außerdem führt die Freisetzung antimikrobieller Substanzen zur Bekämpfung von Mikroorganismen. Darüber hinaus fusionieren Granula auch innerhalb der Neutrophilen mit Phagosomen, in denen sich phagozytierte Mikroorganismen befinden, um aufgenommene Erreger abzutöten.

Tabelle 1: Inhalt neutrophiler Granula (Borregaard et al., 2007)

Gruppe	Beispiele
Adhäsionsmoleküle	CD11b, CD18, CD66a, CD66b
Rezeptoren	CD14, CD16, C1q-Rezeptor, CXCR-1 und 2, Fc- γ -Rezeptoren, fMLP-Rezeptor, IFN- γ -Rezeptor 1 und 2, IL-(1, 6, 10)-Rezeptor, TNF-Rezeptor, Toll-Like-Rezeptor-1, 2, 4, 6, 8
Antibakterielle Proteine	Gp91phox/p22phox, Defensine, Laktoferrin, Lysozym, Myeloperoxidase, Pentraxin 3
Proteasen	Arginase 1, Cystatin C, Cystatin F, Cathepsin G, Elastase, Gelatinase, Kollagenase, Proteinase 3
Andere	alkalische Phosphatase, β -Glucuronidase

1.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Ein weiterer Mechanismus, mit dem Neutrophile mikrobielle Erreger abtöten können, ist die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, Abb. 2). So bildet die neutrophile NADPH Oxidase Superoxidanionenradikale ($O_2^{\bullet-}$). Diese werden spontan oder von der Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgesetzt. H_2O_2 zerfällt spontan oder kann durch die Fenton Reaktion umgesetzt werden, bei der unter Katalyse durch Fe^{2+} Hydroxyl-Radikale (OH^{\bullet}) entstehen. Außerdem kann die Myeloperoxidase H_2O_2 zu hochreaktiven hypohalogenen Säuren wie Hypochloriger Säure (OCl^-) umwandeln (Murphy, 2011). Die NADPH Oxidase ist damit ein Schlüsselmolekül für die ROS Produktion neutrophiler Granulozyten. Dieses Enzym besteht aus mehreren Untereinheiten. In der äußeren Zellmembran und der Membran von Phagolysosomen befinden sich die Untereinheiten gp91phox und p22phox. Zur Aktivierung der NADPH Oxidase ist die Komplektierung mit einer Reihe von zytosolischen Untereinheiten nötig. Dazu zählen p47phox, p67phox und p40phox (Sheppard et al., 2005). Die wichtigste regulatorische Untereinheit ist p47phox (El-Benna et al., 2009). Ihre Phosphorylierung ist für die Zusammensetzung der NADPH-Oxidase und die Freisetzung von ROS erforderlich. In Neutrophilen sind die wichtigsten Kinasen, die p47phox phosphorylieren können die MAP-Kinasen Erk1/2 und p38 (El Benna et al., 1996) sowie Akt (Proteinkinase B) und Proteinkinase C σ (Chen et al., 2003). Durch Vorstimulation der Neutrophilen, z.B. durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), wird die Zusammensetzung des NADPH-Oxidase Komplexes an der Zellmembran oder an intrazellulären Membranen induziert. Kommt ein zweiter Stimulus hinzu, kann sofort eine starke Produktion von ROS erfolgen (DeLeo et al., 1998).

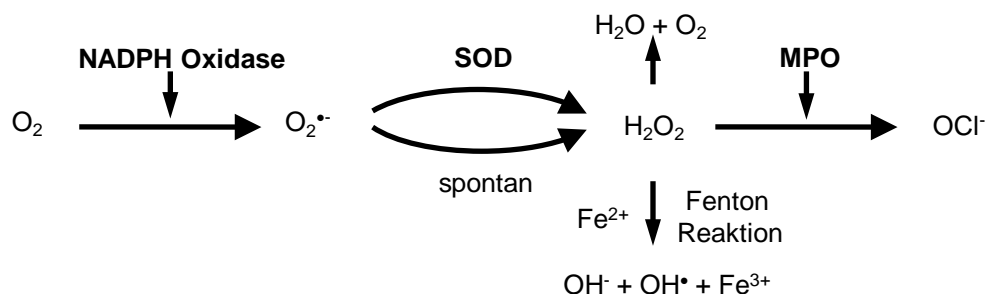


Abb. 2: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Neutrophilen. Die NADPH Oxidase generiert aus Sauerstoffmolekülen Superoxidanionenradikale ($O_2^{\bullet-}$). Diese werden spontan oder durch die Superoxid-Dismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgesetzt. Das Wasserstoffperoxid zerfällt spontan, wird über die Fenton Reaktion umgesetzt, oder dient der Myeloperoxidase (MPO) als Substrat zur Generierung von hypohalogenen Säuren wie Hypochloriger Säure (OCl^-). Modifiziert mit freundlicher Erlaubnis (Kirchner et al., 2012).

1.1.3 Zytokinsekretion

Neutrophile Granulozyten können ein breites Spektrum an Zytokinen sekretieren (Tabelle 2). Dazu gehören eine große Bandbreite an Chemokinen, die z.B. chemotaktisch auf Monozyten wirken, aber auch pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin(IL)-1 β und TNF oder anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 (Cassatella, 1999; Mantovani et al., 2011). Darüber hinaus können Neutrophile aber auch Wachstumsfaktoren wie z.B. G-CSF und ein breites Spektrum an Zytokinen aus der TNF-Familie sekretieren, darunter z.B. auch BAFF, das stimulierend auf B-Zellen wirkt (Scapini et al., 2008). Ein Chemokin, das in großen Mengen durch Neutrophile produziert wird, ist IL-8 (CXCL8). Dieses Chemokin liegt innerhalb der Zelle, aber außerhalb der klassischen neutrophilen Granula vor. Neuere Studien gehen davon aus, dass Vorstufen des IL-8 innerhalb des endoplasmatischen Retikulums zurückgehalten werden (Pellme et al., 2006). Nach der Stimulation von Neutrophilen kann das bereits vorsynthetisierte IL-8 relativ schnell ausgeschüttet werden. Es wirkt chemotaktisch auf Neutrophile und stellt somit einen positiven Rückkopplungsmechanismus zur Rekrutierung einer großen Anzahl Neutrophiler zum Ort einer Entzündung dar (Cassatella, 1999).

Tabelle 2: Auswahl durch Neutrophile sekretierter Zytokine (Cassatella, 1999; Mantovani et al., 2011).

Gruppe	Zytokine
Chemokine	CCL2, CCL3, CCL4, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11
Pro-inflammatorische Zytokine	IL-1 α , IL-1 β , IL-7, IL-12, IL-17, IL-18, IFN- α , IFN- γ , MIF
Anti-inflammatorische Zytokine	IL1-RA, IL-10, TGF β
Wachstumsfaktoren	G-CSF, HGF, M-CSF, GM-CSF, IL-3, SCF, VEGF
Zytokine der TNF-Familie	APRIL, BAFF, CD30L, CD97L, TNF, TRAIL

1.1.4 *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs)

Erst vor wenigen Jahren wurde beschrieben, dass Neutrophile neben Apoptose und Nekrose eine weitere Art des Zelltodes sterben können. Dieser Vorgang wird als NETose bezeichnet und ist von der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies abhängig. Während der NETose desintegriert die Zellkernwand und die Granulamembranen der Neutrophilen und die nukleäre DNA mischt sich mit den Proteinen des Zytoplasmas und der neutrophilen Granula. Anschließend wird die DNA, die nun die bakteriziden Substanzen aus den Granula enthält, aus den Zellen freigesetzt (Fuchs et al., 2007). So bilden sich klebrige netzartige Strukturen, die so genannten *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), in denen z.B. Bakterien gefangen und abgetötet werden können (Brinkmann et al., 2004). Die genaue Regulierung der NETose ist noch nicht genau verstanden.

1.1.5 Aktivierung neutrophiler Granulozyten

1.1.5.1 Wichtige Signalwege neutrophiler Granulozyten

1.1.5.1.1 Der MAP-Kinase-Signalweg

MAP (*Mitogen Activated Protein*)-Kinasen sind wichtige Signalmoleküle innerhalb der Zelldifferenzierung und des Zellzyklus, haben allerdings auch außerhalb dieses Bereiches wichtige Aufgaben. So werden MAP-Kinasen über Wachstumsfaktoren, Zytokine, G-Proteingekoppelte Rezeptoren oder Stress-Signale, wie z.B. UV-Strahlung, aktiviert. MAP-Kinasen werden über eine Kinasen-Kaskade reguliert, die durch eine Vielzahl von Phosphorylierungen eine strikte Regulierung der Kinasen ermöglicht (Krauss, 2003). So werden die MAP-Kinasen von MAP-Kinase-Kinasen phosphoryliert, die wiederum von MAP-Kinase-Kinase-Kinasen phosphoryliert werden (Abb. 3). Neben den Kinasen gibt es auch Phosphatase, wie z.B. MAP-Kinase-Phosphatase(MKP)-1, die MAP-Kinasen dephosphorylieren (Boutros et al., 2008). Die fünf bekannten Gruppen von MAP-Kinasen sind Erk (*Extracellular-signal regulated kinase*)1/2, p38, JNK(*C-Jun-N-terminal Kinase*)1,2,3 und Erk5. In Neutrophilen sind besonders Erk1/2 und p38 von großer Bedeutung. Sie werden durch verschiedene Rezeptoren, wie z.B. den fMLP-Rezeptor oder Rezeptoren für Komplementfaktoren und andere Signalwege, wie z.B. den Toll-Like-Rezeptor-Signalweg aktiviert. MAP-Kinasen spielen bei Neutrophilen unter Anderem bei der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies über die Phosphorylierung der p47-phox Untereinheit der NADPH Oxidase (El Benna et al., 1996)

oder der Degranulierung von Neutrophilen eine wichtige Rolle (Mocsai et al., 2000). Außerdem sind Erk1/2 und p38 Überlebens-Signalwege in Neutrophilen, die anti-apoptotische Proteine stabilisieren (Klein et al., 2000).

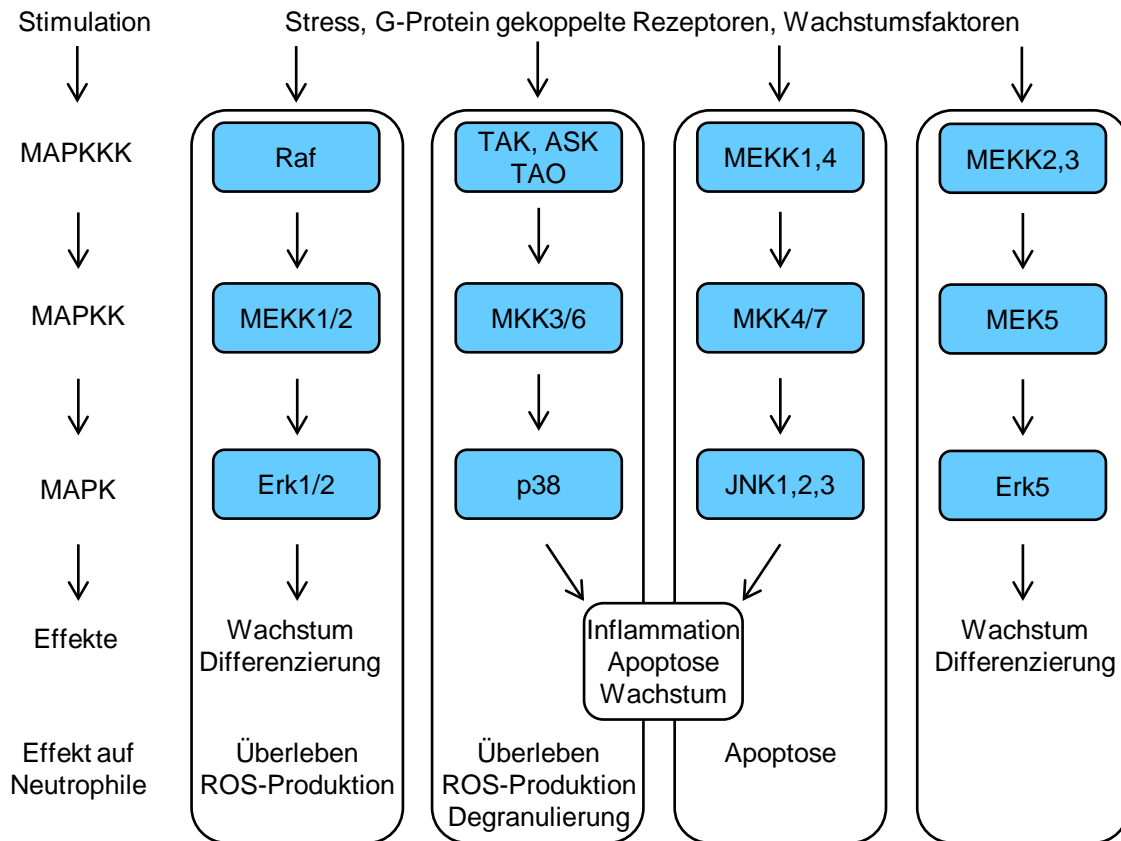


Abb. 3: MAP-Kinase(MAPK)-Signaltransduktion. Pfeile: Aktivierung durch Phosphorylierung.

1.1.5.1.2 Der PI3-Kinase-Akt-Signalweg

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) sind membranständige Proteine. Es gibt Klasse I, II und III PI3K, von denen die Klasse I am besten verstanden und in Neutrophilen von großer Bedeutung ist. Ihre Mitglieder bestehen je aus einer katalytischen p110 Untereinheit und einer regulatorischen Untereinheit wie p55, p85 oder p101. Wird die PI3K, z.B. durch Rezeptor-Tyrosinkinasen, aktiviert kommt es zur Phosphorylierung des Membranlipids PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) zu PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat). PIP3 kann nun die Kinase PDK-1 aktivieren, die wiederum Akt (Proteinkinase B) phosphoryliert und damit aktiviert (Krauss, 2003). In Neutrophilen hat Akt einige Substrate, z.B. die p47phox Untereinheit der NADPH Oxidase (Chen et al., 2003) und kann außerdem die Lebensdauer von Neutrophilen verlängern (Abb. 4). Darüber hinaus ist der PI3K/Akt

Signalweg auch für andere Zellfunktionen von Neutrophilen, wie z.B. Migration verantwortlich (Klein et al., 2000; Yagi et al., 2009).

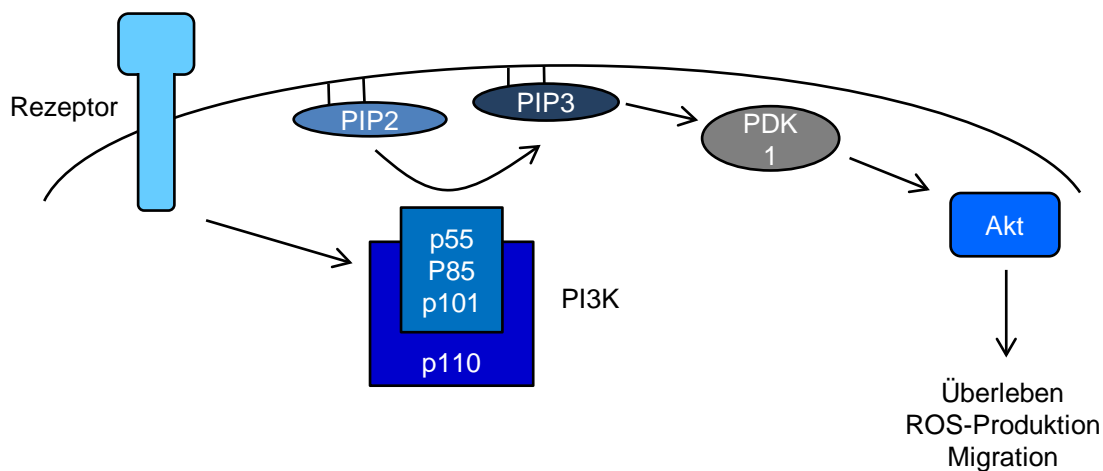


Abb. 4: Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)/Akt Signaltransduktion in neutrophilen Granulozyten. Pfeile: Aktivierung durch Phosphorylierung. PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat, PIP3: Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat.

1.1.5.2 Aktivierung von Neutrophilen durch Toll-Like-Rezeptoren

Toll-Like-Rezeptoren (TLR) sind eine wichtige Gruppe von Mustererkennungsrezeptoren, durch die Neutrophile stimuliert werden können (Tabelle 3). Toll-Like-Rezeptoren bilden z.T. Dimere und erkennen eine große Bandbreite an mikrobiellen Strukturen wie z.B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) gram-positiver Bakterien (TLR 4) oder Flagellin (TLR 5). Außerdem gibt es intrazelluläre TLR, die Nukleinsäuren wie für Bakterien typische unmethylierte CpG-Sequenzen (TLR 9) oder bakterielle oder virale RNA (TLR 3, 7, 9) erkennen. TLR besitzen eine größere extrazelluläre Domäne, die durch leucinreiche Wiederholungssequenzen gekennzeichnet ist und eine kleinere intrazelluläre Domäne, die eine TIR (Toll/IL-1-Rezeptor)-Domäne enthält. Innerhalb der Zelle wird nach Aktivierung von TLR über das Adapterprotein MyD88 der Transkriptionsfaktor Nf- κ B aktiviert. Aktivierung von TLR führt generell zu einer phänotypischen Aktivierung von Neutrophilen, die sich z.B. durch eine erhöhte Lebensspanne äußert. Außerdem wird die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-8, induziert (Akira und Takeda, 2004; Murphy, 2011). Neutrophile exprimieren alle in Tabelle 3 genannten TLR außer TLR 3 (Hayashi et al., 2003). Durch Aktivierung von TLR werden Neutrophile z.B. für die Produktion von ROS

vorstimuliert, darüber hinaus kommt es zur Zytokinfreisetzung und Verlängerung der Lebensdauer von Neutrophilen, auch über die Aktivierung von MAP-Kinasen (Lotz et al., 2004; Vivarelli et al., 2004; Wilde et al., 2007). Außerdem wird die Phagozytosekapazität Neutrophiler durch TLR-Liganden verstärkt (Esmann et al., 2010; Hayashi et al., 2003; Wang et al., 2009).

Tabelle 3: Durch Toll-Like-Rezeptoren (TLR) erkannte mikrobielle Strukturen

Toll-Like-Rezeptor	Erkannte Struktur
TLR 1/2, TLR 2/6	Lipoarabinomannan, Lipoproteine, Lipoteichonsäure
TLR 3	Doppelstrang-RNA
TLR 4	LPS
TLR 5	Flagellin
TLR 7	Einzelstrang-RNA
TLR 8	Einzelstrang-RNA
TLR 9	unmethylierte CpG DNA

1.1.5.3 Aktivierung von Neutrophilen durch Zytokine

Neutrophile besitzen eine Reihe von Rezeptoren, um verschiedene Zytokine zu detektieren. Einige wichtige Beispiele für Zytokine, die auf Neutrophile wirken, werden im Folgenden erläutert:

Chemokine

Chemokine sind eine Gruppe von Zytokinen, die sich durch eine gemeinsame, durch Disulfidbrücken gekennzeichnete, Struktur auszeichnen. Einige Chemokine wirken chemotaktisch auf Neutrophile. Sie werden über die GTPase-gekoppelten Chemokinrezeptoren erkannt. Die wichtigsten auf Neutrophile chemotaktisch wirkenden Chemokine sind IL-8 (CXCL8), das an den Chemokinrezeptor CXCR-1 bindet und GRO- α (CXCL1), das CXCR-2 aktiviert (Detmers et al., 1991). IL-8 verlängert außerdem die Lebensspanne neutrophiler Granulozyten (Leuenroth et al., 1998).

IL-2, IL-6

IL-2 und IL-6 werden über Rezeptoren erkannt, die über Januskinasen (JAK) und STAT-Transkriptionsfaktoren wirken. IL-2 und IL-6 können die Lebensdauer von Neutrophilen verlängern (Biffi et al., 1995; Lesur et al., 2000). IL-2 vermindert außerdem die Fc γ R-vermittelte Phagozytose IgG-opsonisierter Partikel durch Neutrophile (Moxey-Mims et al., 1991).

Interferon- γ

Interferon(IFN)- γ ist ein Typ II Interferon und bindet ein Dimer aus IFN- γ -Rezeptor 1 und 2. Der IFN- γ -Rezeptor ist eine Tyrosinkinase, die JAK-STAT-Signaltransduktion aktiviert. IFN- γ kann die Überlebensdauer von Neutrophilen verlängern (Colotta et al., 1992). Zusammen mit LPS kann die Stimulation mit IFN- γ die Freisetzung großer Mengen von Chemokinen wie IP-10 (CXCL10) induzieren (Cassatella et al., 1997).

GM-CSF

GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) ist ein Faktor, der für die Reifung neutrophiler Granulozyten im Knochenmark erforderlich ist (Hamilton, 2008). GM-CSF verlängert außerdem die Lebensspanne reifer Neutrophiler (Colotta et al., 1992) und stimuliert deren Phagozytoseaktivität (Weisbart et al., 1988). Der GM-CSF-Rezeptor ist eine Tyrosinkinase und aktiviert JAK-STAT-Signaltransduktion, die MAP-Kinase-Signalwege und PI3K-Signaltransduktion (Hamilton, 2008). Außerdem kann GM-CSF auch den Transkriptionsfaktor Nf- κ B aktivieren (Ebner et al., 2003).

TNF

TNF (Tumornekrosefaktor) ist ein klassisches pro-inflammatorisches Zytokin. Der TNF-Rezeptor kann über die Aktivierung von Caspasen Apoptose induzieren, aber auch die Apoptose von Neutrophilen über die Aktivierung von Nf- κ B inhibieren (Cowburn et al., 2004). TNF verstärkt außerdem das Phagozytosevermögen neutrophiler Granulozyten (Moxey-Mims et al., 1991).

1.1.5.4 Aktivierung von Neutrophilen durch fMLP

N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) ist ein synthetisches Tripeptid, das den fMLP-Rezeptor auf Neutrophilen bindet. Der fMLP-Rezeptor ist ein transmembraner G-

Protein-gekoppelter Rezeptor. Er erkennt formylierte bakterielle Proteine, deren Translation stets mit formyl-Methionin beginnt. Wird der fMLP-Rezeptor aktiviert, werden als wichtigste Signalwege der Erk1/2- und p38 MAP-Kinase-Signalweg, sowie der PI3K-Akt-Signalweg angeschaltet (Nick et al., 1997; Tilton et al., 1997). Über die so aktivierten Kinasen werden verschiedene Signalmoleküle oder funktionelle Moleküle wie die regulatorische p47phox-Untereinheit der neutrophilen NADPH Oxidase phosphoryliert, was zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führt (Dewald und Baggiolini, 1985). Außerdem stimuliert fMLP die Ausschüttung neutrophiler Granula (Niessen et al., 1991).

1.1.5.5 Aktivierung von Neutrophilen durch Immunkomplexe

Neutrophile besitzen verschiedene aktivierende Fc- γ -Rezeptoren (Fc γ R), die IgG-Antikörper erkennen. Der hochaffine Fc γ RI ist dabei stets mit IgG aus dem Blut abgesättigt. Die geringer affinen Fc γ RIIA und Fc γ RIIB und Fc γ RIIIA binden monomere Antikörper mit einer 100-1000fach geringeren Affinität. Das gewährleistet, dass nur Immunkomplexe, die z.B. aus Bakterien und IgG-Antikörpern bestehen, diese Rezeptoren aktivieren können (Nimmerjahn und Ravetch, 2008). Außerdem besitzen Neutrophile als einzige Zellen Fc γ RIIIB, der über einen GPI-Anker in der Zellmembran verankert ist (Chuang et al., 2000; Nimmerjahn und Ravetch, 2008). Die Ligandierung von Fc γ R führt über die Kinasen Src und Syk unter anderem zur Aktivierung der MAP-Kinase- und PI3K-Akt-Signalwege und induziert z.B. die Phagozytose von Bakterien durch Neutrophile (Nimmerjahn und Ravetch, 2008). Während durch Fc γ R die Erkennung von Immunkomplexen aus Antikörpern und körperfremden Antigenen ermöglicht wird, wird über sie auch die Aktivierung neutrophiler Granulozyten in Autoimmunerkrankungen vermittelt. Hier binden Autoantikörper körpereigene Antigene und führen so zur Erkennung körpereigener Strukturen durch das Immunsystem (Murphy, 2011).

1.1.6 Apoptose

Neutrophile Granulozyten sind antimikrobiell sehr potente, aber kurzlebige Zellen. Ihre Lebensdauer im Blut ist nur sehr kurz und liegt im Bereich von wenigen Stunden (Dancey et al., 1976) bis wenigen Tagen (Pillay et al., 2010). Unter normalen Zellkulturbedingungen gehen unstimulierte Neutrophile bereits nach 12-18 Stunden in die Apoptose (Colotta et al., 1992). Morphologisch zeichnen sich apoptotische Neutrophile durch einen kondensierten Zellkern aus (Abb. 5). Werden Neutrophile jedoch stimuliert, z.B. durch bakterielles LPS oder

Zytokine wie GM-CSF, die in entzündetem Gewebe vorhanden sind, kann sich ihre Lebensdauer vervielfachen (Colotta et al., 1992). Die Apoptose von Neutrophilen ist ein strikt regulierter Prozess. In entzündetem Gewebe ist es wichtig, dass apoptotische Neutrophile durch Makrophagen und evtl. vitale Neutrophile phagozytiert werden. Kommt es zur Störung der Beseitigung apoptotischer Zellen, gehen die apoptotischen Neutrophilen in die sekundäre Nekrose, bei der die Integrität der Zellwand verloren geht und es zur Freisetzung der hochreaktiven Granulaproteine kommt, die dann das Gewebe schädigen. Die Aufnahme apoptotischer Zellen ist ein anti-inflammatorischer Vorgang. So werden Effektorfunktionen von Neutrophilen und Makrophagen, wie z.B. die Freisetzung von ROS, durch apoptotische Neutrophile inhibiert (Esmann et al., 2010; Fadok et al., 1998a).

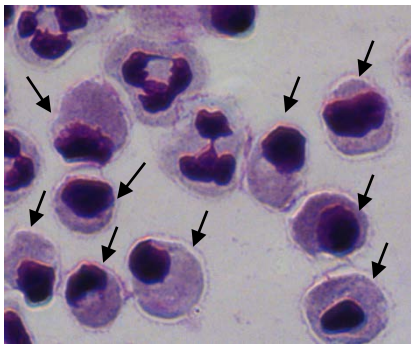


Abb. 5: Apoptotische neutrophile Granulozyten.
Diff-Quick gefärbte apoptotische neutrophile Granulozyten (Pfeile) mit kondensiertem Nukleus.

1.1.7 Phagozytose

Neutrophile sind professionelle Phagozyten des angeborenen Immunsystems. Ihre klassische Rolle ist die Phagozytose und Abtötung von Mikroorganismen (Murphy, 2011). Neue Daten zeigen allerdings, dass Neutrophile auch apoptotische Zellen phagozytieren können (Esmann et al., 2010). Dies ist eine Aufgabe, die zuvor nur Makrophagen und zu einem kleineren Teil dendritischen Zellen zugeschrieben worden war.

1.1.7.1 Phagozytose von Mikroorganismen

Neutrophile sind darauf spezialisiert, eindringende Mikroorganismen zu phagozytieren (Abb. 6a), sind aber auch in der Lage andere Partikel, wie z.B. *Latex-Beads*, aufzunehmen (Abb. 6b). Die Aufnahme von Mikroorganismen durch Neutrophile wird hauptsächlich über die Aktivierung von Fc γ R oder Komplementrezeptoren vermittelt (Lee et al., 2003). Dies führt zur Aktivierung von Kinasen der Src Familie und Syk (Nimmerjahn und Ravetch, 2008). Werden Bakterien durch den Komplementfaktor C3b opsonisiert, werden die Erreger über

Komplementrezeptoren erkannt. Durch diese Rezeptoren werden Vav1 und Vav2 aktiviert. Nach der Aktivierung von Komplement-oder Fc γ -Rezeptoren werden die kleinen GTPasen Rac1 und Rac2 für die Initiierung der Aktinpolymerisierung benötigt, die für die Aufnahme von Mikroorganismen erforderlich ist (Hall et al., 2006).

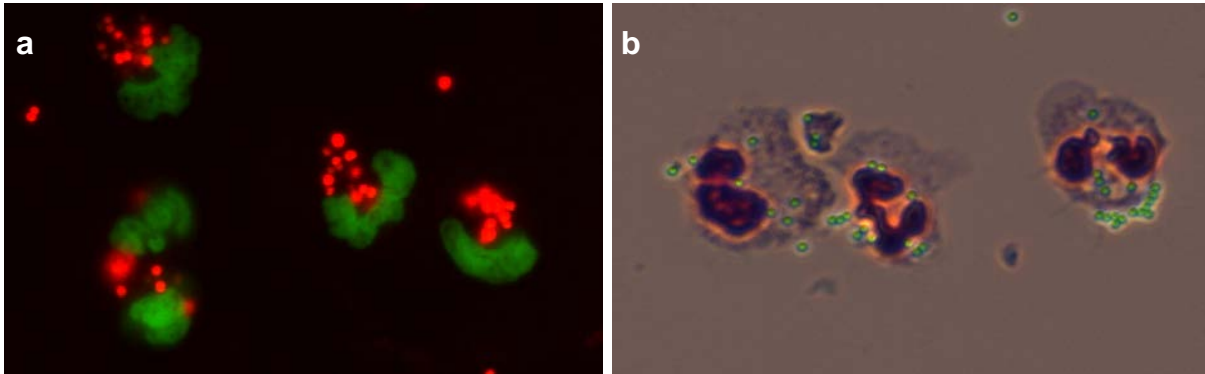


Abb. 6: Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten. **a:** Neutrophile Granulozyten nach der Phagozytose rot fluoreszierender Bakterien der Spezies *Staphylococcus aureus*. Grün: Zellkerne. **b:** Diff-Quick gefärbte neutrophile Granulozyten nach der Phagozytose von grün fluoreszierenden Latex-Beads (M. Behnen, mit freundlicher Erlaubnis).

1.1.7.2 Phagozytose apoptotischer Zellen

Kürzlich wurde durch unsere Arbeitsgruppe und andere berichtet (Esmann et al., 2010; Galati et al., 2000; Rydell-Tormanen et al., 2006), dass neutrophile Granulozyten neben Mikroorganismen auch apoptotische Zellen phagozytieren können (Abb. 7). Der Kontakt mit apoptotischen Zellen inhibiert hierbei die fMLP-induzierte ROS-Produktion und die Sekretion von IP-10 und TNF durch Neutrophile. Allerdings induziert die Anwesenheit apoptotischer Zellen auch die Sekretion von IL-8 durch Neutrophile (Esmann et al., 2010). Die Phagozytose apoptotischer Zellen ist strikt abhängig von hitzelabilen Serumfaktoren (Esmann et al., 2010). Hier verhalten sich die Neutrophilen anders als Makrophagen, die auch in Abwesenheit von Serumfaktoren apoptotische Zellen aufnehmen können. Die genauen Mechanismen, die der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile zu Grunde liegen, sind noch nicht ausreichend verstanden.



Abb.7: Phagozytose apoptotischer Neutrophiler durch vitale neutrophile Granulozyten. Pfeil: Ein grün fluoreszierender vitaler Neutrophiler hat eine apoptotische Zelle aufgenommen. Die apoptotischen Zellen (farblos) sind mit einem pH-sensitiven Farbstoff gefärbt, der im angesäuerten Milieu rot fluoresziert. (M. Behnen, mit freundlicher Erlaubnis).

1.2 Verlauf einer akuten Entzündung

Befinden sich entzündliche Stimuli, wie z.B. nekrotische Zellen oder mikrobielle Erreger in einem Gewebe, werden diese in der Regel durch Muster-Erkennungsrezeptoren wie z.B. TLR der residenten Makrophagen und dendritischen Zellen erkannt. Diese Zellen produzieren daraufhin Lipidmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene und proentzündliche Zytokine wie TNF und IL-1 β . Durch diese Substanzen kommt es zur Weitung der Blutgefäße und Aktivierung des Endothels (Abb. 8a). So werden z.B. IL-8 und P-Selektin aus Weibel-Pallade-Körperchen an der Oberfläche der Endothelzellen freigesetzt. Dies erleichtert die Einwanderung von Neutrophilen an dieser Stelle, die nun an das aktivierte Endothel binden können. Sie durchdringen das Endothel und die darunter liegende Perizyten-Schicht und wandern in das entzündete Gewebe ein (Nourshargh et al., 2010). Hierbei folgen sie einem Gradienten aus Chemokinen wie z.B. IL-8, die ebenfalls am Ort der Entzündung sekretiert werden. Im entzündeten Gewebe bekämpfen die Neutrophilen die infiltrierenden Mikroorganismen und gehen später zu einem Großteil in Apoptose (Abb. 8b,c). Zu diesem Zeitpunkt sind auch Monozyten aus der Blutbahn eingewandert und im Gewebe zu Makrophagen differenziert, die ebenfalls an der Bekämpfung von Erregern beteiligt sind (Murphy, 2011). Diese Makrophagen können aber auch große Mengen apoptotischer Neutrophiler phagozytieren und sind so wichtig für die Auflösung der Entzündung (Abb. 8c). Die Phagozytose apoptotischer Zellen führt außerdem zur Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β (Voll et al., 1997). Darüber hinaus sorgt die Produktion von Lipidmediatoren wie Resolvin D1 und Resolvin E1 dafür, dass keine Zellen mehr in das entzündete Gewebe rekrutiert werden, die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Makrophagen verstärkt wird und die Entzündung abklingen kann (Arita et al., 2005; Sun et al., 2007). Schließlich verlassen auch die Makrophagen über das Lymphsystem das Gewebe. Viele Infektionen werden so über eine lokale Antwort des angeborenen Immunsystems bekämpft, ohne der Hilfe des erworbenen Immunsystems zu bedürfen (Murphy, 2011; Serhan und Savill, 2005).

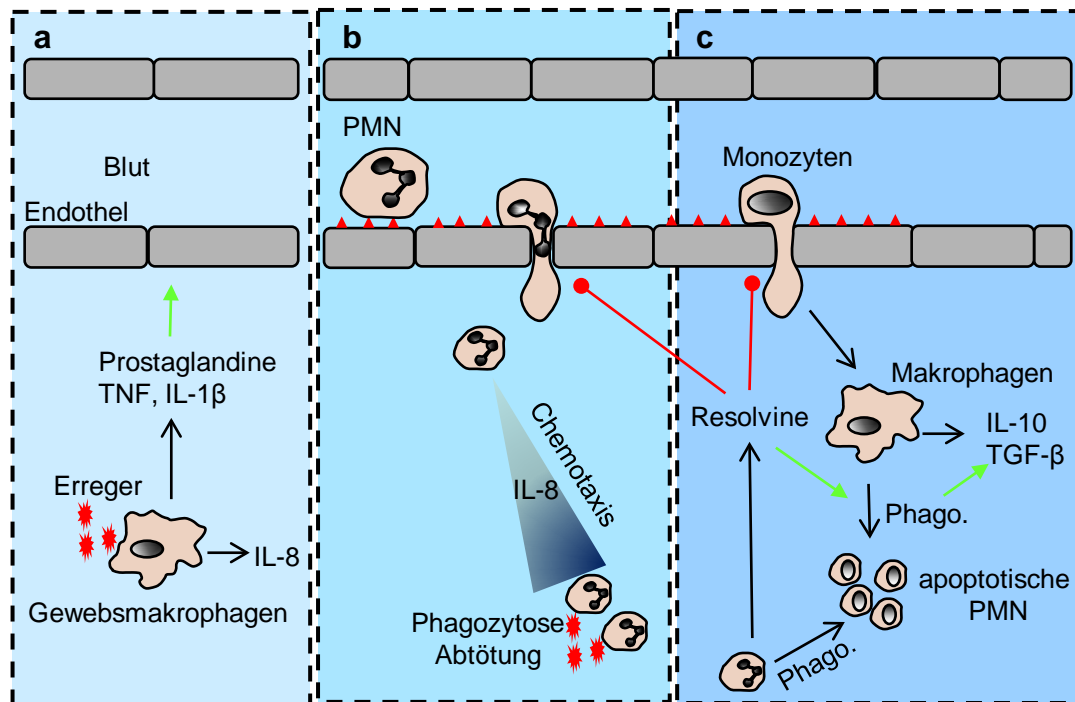


Abb. 8: Verlauf einer akuten Entzündung. **a:** Gewebemakrophagen oder dendritische Zellen erkennen Mikroorganismen und sekretieren Prostaglandine, IL-1 β und TNF. **b:** Das Endothel wird stimuliert und ermöglicht die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten (PMN). Die PMN wandern in das entzündete Gewebe ein und folgen einem chemotaktischen Gradienten aus Chemokinen. Am Ort der Infektion bekämpfen die PMN Mikroorganismen. **c:** Im Laufe der Entzündung wandern Monozyten in das Gewebe ein, die zu Makrophagen differenzieren. Die PMN gehen in Apoptose und werden von vitalen PMN oder Makrophagen phagozytiert. Daraufhin werden IL-10 und TGF- β freigesetzt. Es werden außerdem Resolvine produziert, die die Einwanderung weiterer PMN inhibieren. Die Entzündung löst sich auf. PMN: neutrophile Granulozyten, Phago.: Phagozytose, rote Dreiecke: aktiviertes Endothel, rote Pfeile: Inhibition, grüne Pfeile: Aktivierung.

1.3 Autoimmunität

Während das angeborene Immunsystem seine Ziele unspezifisch und nur über bestimmte Muster erkennt und sich durch eine sofortige Reaktion auszeichnet, reagiert das erworbene Immunsystem spezifisch und mit einer gewissen Verzögerung. Durch Antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen werden im Gewebe aufgenommene und prozessierte Antigene auf MHC (*Major Histocompatibility Complex*) II-Molekülen in den Lymphknoten präsentiert. Hier interagieren die Antigen-präsentierende Zellen mit T-Zellen, die über den T-Zell-Rezeptor MHC II-gebundene Antigen-Fragmente erkennen. T-Zellen aktivieren wiederum antigen-spezifische B-Zellen, die über den B-Zell-Rezeptor Antigene detektieren, internalisieren und ebenfalls auf MHC II-Molekülen präsentieren. Schlussendlich differenzieren die antigenspezifischen B-Zellen zu Plasmazellen, welche hochspezifische

Antikörper sekretieren, die Krankheitserreger binden oder z.B. Toxine neutralisieren. Während des Reifungsprozesses der im Thymus gebildeten T-Zellen und der im Knochenmark gebildeten B-Zellen werden spezifisch Zellen selektiert, die nicht mit körpereigenen Antigenen reagieren. Kommt es zu einer Bildung von Zellen, die trotz dieser negativer Selektion körpereigene Strukturen erkennen, kann es zu Autoimmunerkrankungen kommen (Murphy, 2011). In den letzten Jahrzehnten zeigt sich ein verstärktes Auftreten von Autoimmunerkrankungen (Bach, 2002). Bei diesen Krankheiten werden zumeist Antikörper gegen körpereigene Antigene gebildet. Diese Antikörper binden körpereigene Strukturen und bilden so genannte Autoimmunkomplexe. Diese wiederum aktivieren dann auch die Zellen des angeborenen Immunsystems, die nun übermäßig aktiv werden und das Gewebe zerstören. Ein Beispiel für eine Antikörper-abhängige Autoimmunerkrankung der Haut ist das bullöse Pemphigoid.

1.3.1 Die Rolle neutrophiler Granulozyten im bullösen Pemphigoid (BP)

Das bullöse Pemphigoid ist eine blasenbildende Erkrankung der Haut. Bei dieser Autoimmunkrankheit entstehen Autoantikörper gegen Kollagen XVIII. Dieses Molekül bildet große Ankerstrukturen, die in der Haut die Dermis mit der Epidermis verbinden. Die Bindung der Autoantikörper induziert eine Fc γ -Rezeptor-vermittelte Entzündung, durch die es zur partiellen Ablösung der Dermis von der Epidermis und damit zur Bildung von subdermalen Blasen kommt. Obwohl in der Haut von Patienten eosinophile Granulozyten die dominierende Spezies sind (Sitaru et al., 2004), sind auch neutrophile Granulozyten anwesend (Borrego et al., 1996; Dubertret et al., 1980; Kaneko et al., 1992). Außerdem konnte *ex vivo* (Chiriac et al., 2007; Shimanovich et al., 2004) und *in vivo* im Mausmodell (Liu et al., 1997) gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten für die Entstehung des Gewebeschadens verantwortlich sind. Als Standardtherapie werden Glucocorticoide wie Methylprednisolon eingesetzt, die meist direkt auf der Haut (topisch) appliziert werden (Joly et al., 2009; Roujeau et al., 2009). Obwohl BP als Krankheit relativ gut verstanden ist, zeigen an BP erkrankte Personen eine signifikant erhöhte Mortalität (Langan et al., 2008). Die Entwicklung neuer Strategien für die Behandlung von BP ist deshalb wichtig.

1.3.2 Glucocorticoide in der Therapie von Autoimmunerkrankungen

Glucocorticoide (GC) sind Standardtherapeutika bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie BP. Sie wirken stark anti-inflammatorisch, können jedoch bei längerer systemischer Anwendung starke Nebenwirkungen wie die Entstehung von Stammfettsucht oder Diabetes haben. Auch die lokale Therapie mit GC birgt die Gefahr von Nebenwirkungen wie Akne, die starke Erweiterung von Blutgefäßen oder die Entstehung von Pergamenthaut (Lüllmann et al., 2010). Häufig eingesetzte GC sind z.B. Cortisol, Dexamethason oder Methylprednisolon. Sie binden den zytoplasmatischen GC-Rezeptor, der im aktivierten Zustand Dimere bildet und dann im Zellkern die Transkription verschiedener Effektorgene induzieren oder inhibieren kann. So werden z.B. Gene für pro-inflammatorische Zytokine wie TNF und IL-1 β in ihrer Expression vermindert. Die Expression von IL-4 und anti-inflammatorischen Proteinen wie dem IL-1-Rezeptor-Antagonisten oder MAP-Kinase-Phosphatase-1, welche die MAP-Kinase-Signaltransduktion inhibiert, wird induziert. Im Kontext von Autoimmunität wird besonders der Einfluss von GC auf die Sekretion von Zytokinen diskutiert, die die T-Zell-Differenzierung steuern (Flammer und Rogatsky, 2011). Außerdem wird das Vermögen von GC Apoptose z.B. in T-Zellen zu induzieren angeführt (Deckers et al., 1993; Wyllie, 1980). Während diese genomische Wirkung von GC innerhalb von Stunden oder Tagen eintritt, gibt es auch nicht-genomische Effekte, die schneller wirken. So wurde bereits der Einfluss hoher Dosen von Methylprednisolon auf die fMLP-induzierte Degranulierung von Neutrophilen gezeigt (Liu et al., 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass auch das angeborene Immunsystem, gerade bei lokalen Entzündungen, wichtiges Ziel von GC sein kann. So sind Makrophagen und Neutrophile das Ziel von GC in der Behandlung der experimentellen Kontaktallergie (Tuckermann et al., 2007). Im Kontext von BP ist allerdings noch nicht ausführlich untersucht worden, welche Wirkung GC auf das angeborene Immunsystem, insbesondere auf neutrophile Granulozyten, haben.

1.4 Zielsetzung

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen des Immunsystems, die aus dem Blut an den Ort einer Entzündung rekrutiert werden. Sie besitzen potente antimikrobielle Mechanismen, um dort Erreger effizient abzutöten. Allerdings können Neutrophile auch das Gewebe schädigen, wenn ihre Aktivität nicht strikt kontrolliert wird. Dafür ist es wichtig, dass Neutrophile konstitutiv und reguliert in die Apoptose gehen und dass die apoptotischen Zellen effektiv durch Makrophagen, dendritische Zellen und evtl. auch durch neutrophile Granulozyten selbst beseitigt werden. Die Beseitigung apoptotischer Zellen spielt eine entscheidende Rolle für den Rückgang der Entzündung, da dieser Vorgang eine anti-inflammatorische Antwort induziert. In vielen bakteriellen und autoimmunen Erkrankungen führt eine fehlerhafte Regulation von Apoptose oder Phagozytose der apoptotischen Zellen zu einer überschießenden Entzündung und damit zur Gewebeschädigung. Oft werden Glucocorticoide verabreicht, um entzündliche Vorgänge zu stoppen, die genaue Wirkung dieser Substanzen auf Neutrophile ist aber noch nicht umfassend untersucht. Das bessere Verständnis der Modulation der Aktivität neutrophiler Granulozyten durch apoptotische Zellen und Glucocorticoide könnte neue Therapiestrategien aufzeigen und so bei der Behandlung entzündlicher Erkrankungen helfen. Deshalb wurde die Aktivierung neutrophiler Granulozyten in zwei Szenarien untersucht:

1. Die Wirkung von apoptotischen Zellen auf Neutrophile in einer akuten Entzündung

Neutrophile können apoptotische Zellen in Abhängigkeit von Serumfaktoren aufnehmen. Dabei werden Funktionen neutrophiler Granulozyten gehemmt. Es sollte daher untersucht werden, welche Serumfaktoren für die Phagozytose apoptotischer Zellen benötigt werden, wie entzündliche Stimuli den Phagozytoseprozess modulieren können und welche molekularen Mechanismen für die Phagozytose und die inhibitorische Wirkung der apoptotischen Zellen verantwortlich sind.

2. Die Wirkung von Methylprednisolon auf Neutrophile im Kontext des bullösen Pemphigoid

Im Vergleich zu der Modulation der Aktivität neutrophiler Granulozyten durch apoptotische Zellen sollte die Modulation der Effektorfunktionen dieser Zellen durch Methylprednisolon, einem häufig eingesetzten Glucocorticoid, im Kontext des bullösen Pemphigoid, einer Autoimmunerkrankung der Haut, untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Puffer und Medien

Annexin-Puffer

10 mM HEPES
140 mM NaCl
5 mM CaCl₂
pH 7,4

Binde-Puffer

PBS + 0,5 % BSA + 5 mM CaCl₂, pH 6,5

Elutions-Puffer

PBS + 0,5 % BSA, pH 6,5

FACS-Puffer

PBS + 1 % BSA + 0,01 % NaN₃ + 1 % hitzeinaktiviertes humanes Serum

Kristallviolett-Färbelösung

0,1 % Kristallviolett in 50 % Methanol

MACS-Puffer

PBS + 0,5 % FCS + 2 mM EDTA

4 x Western Blot Ladepuffer

0,16 M Tris-HCl, pH 6.8
30 % Glycerin
4 % SDS
0,7 M β-Mercaptoethanol
Bromphenolblau

10 x TBS

200 mM Tris
1,4 M NaCl
pH 7,6

TBS-T

1 x TBS + 0,1 % Tween 20

Stripping-Puffer

62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7
2 % SDS
100 mM β -Mercaptoethanol

10 x SDS-PAGE Laufpuffer

250 mM Tris
2 M Glycin
1 % SDS

Transfer-Puffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % Methanol

ELISA-Blockierungs-Puffer

PBS + 0,5 % BSA

ELISA-Puffer

ELISA-Blockierungs-Puffer + 0,1 % Tween 20

ELISA-Waschpuffer

PBS + 0,1 % Tween 20

RPMI Kompletmedium

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium + 4 mM L-Glutamin
+ 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 10 mM HEPES + 50 µM
β-Mercaptoethanol

HBSS-Prep

HBSS + 0,5 % FCS + 20 mM HEPES

2.2 Tiere

C57BL/6 Mäuse wurden von der Charles River GmbH, Sulzfeld bezogen. Die Tiere wurden in der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck in einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Die Tierversuche wurden unter der Versuchsnummer V 312-72241.122-19 (51-4/11) durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig Holstein genehmigt.

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
10 x PBS	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
Annexin-V-Fluos	Roche, Mannheim
Broad Range Protein Marker	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Bromphenolblau	Serva, Amstetten, Österreich
BSA, Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
C1q-defizientes humanes Serum	Merck KGaA, Darmstadt
rh C1q	Merck KGaA, Darmstadt
C3 defizientes humanes Serum	Institut für Systemische
C3, human	Entzündungsforschung, UKSH, Lübeck
C5 defizientes Serum	Merck KGaA, Darmstadt
rh C5	Merck KGaA, Darmstadt
CaCl₂	Merck KGaA, Darmstadt
DHR123	Invitrogen, Karlsruhe
Diethylether	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, Steinheim
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe

Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Lyse Lösung	Becton Dickinson, Heidelberg
Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert	Sigma Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum (FCS 2)	PAA, Paschim, Österreich
Fötales Kälberserum GOLD (FCS 3)	PAA, Paschim, Österreich
Flagellin	Enzo Life Sciences, Lörrach
FluoSpheres, yellow-green, 1µm	Invitrogen, Karlsruhe
fMLP	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerin	Sigma Aldrich, Steinheim
GM-CSF	Peptotech, Hamburg
H₂SO₄	Merck KGaA, Darmstadt
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)	PAA, Paschim, Österreich
HCl, 25 %	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES	Sigma Aldrich, Steinheim
HEPES Lösung, 1M	PAA, Paschim, Österreich
Histopaque 1119	Sigma Aldrich, Steinheim
rh IL-10	Immunotools, Friesoythe
rh IL-12	Immunotools, Friesoythe
rh IL-17	Immunotools, Friesoythe
rh IL-1β	Immunotools, Friesoythe
rh IL-2	Peptotech, Hamburg
rh IL-4	Immunotools, Friesoythe
rh IL-6	Immunotools, Friesoythe
rh IL-8	R&D Systems, Wiesbaden
Immersionsöl	Carl Zeiss, Jena
Immobilon Western Blot Substrat	Millipore, Schwalbach/Ts.
Interferon-γ	Peptotech, Hamburg
Isopropanol, 70 %	Carl Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
LPS	Sigma Aldrich, Steinheim
Luminol	Sigma Aldrich, Steinheim
Lymphozytenseparationsmedium 1077	PAA, Paschim, Österreich
Malp-2	InvivoGen, San Diego, CA, USA
M-CSF	Peptotech, Hamburg
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Na₂CO₃	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	J. T. Baker, Griesheim
NaHCO₃	Merck KGaA, Darmstadt
NaN₃	Merck KGaA, Darmstadt
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim
ODN2006	InvivoGen, San Diego, CA, USA
Opteia TMB Substrat	Becton Dickinson, Heidelberg
PAM₃CSK₄	InvivoGen, San Diego, CA, USA
PBS, pH 7,4	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, UKSH, Lübeck
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin

Percoll	Sigma Aldrich, Steinheim
Poly I:C	InvivoGen, San Diego, CA, USA
Ponceau S Lösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma Aldrich, Steinheim
R848	Enzo Life Sciences, Lörrach
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Sigma Aldrich, Steinheim
Rotiphorese Gel 40	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
rh TNF	Peprotech, Hamburg
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Serva, Amstetten, Österreich
Urbason Solubile (Methylprednisolon)	Sanofi Aventis, Frankfurt/Main

2.4 Antikörper

Tabelle 5: Antikörper für Western Blot

Zielmolekül, Konjugat	Klon	Spezies	Hersteller
MKP-1 (human)	M-18	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
IgG (Kaninchen), HRP-gekoppelt	polyklonal	Ziege	NEB, Frankfurt/Main
IgG (Kaninchen)-konformationsspezifisch	L27A9	Maus	NEB, Frankfurt/Main
IgG (Maus), HRP-gekoppelt	polyklonal	Ziege	NEB, Frankfurt/Main
phospho Akt (human)	C31E5E	Kaninchen	NEB, Frankfurt/Main
phospho Erk1/2 MAPK (human)	D13.14.4E	Kaninchen	NEB, Frankfurt/Main
phospho p38 MAPK (human)	3D7	Kaninchen	NEB, Frankfurt/Main
β-Aktin (human)	polyklonal	Kaninchen	NEB, Frankfurt/Main

Tabelle 6: Antikörper für Durchflusszytometrie

Zielmolekül	Klon	Spezies	Hersteller	Konjugat
CD66b (human)	G10F5	Maus	Becton Dickinson, Heidelberg	FITC
CD16/CD32 (murin, Fc-Block)	2.4G2	Ratte	Becton Dickinson, Heidelberg	unkonj.
F4/80 (murin)	BM8	Ratte	eBioscience, Frankfurt/Main	PE
Ly6G (murin)	1A8	Ratte	Becton Dickinson, Heidelberg	PE

2.5 Inhibitoren

Zur Blockierung von Signalmolekülen wurden verschiedene pharmakologische Inhibitoren verwendet (Tabelle 7). Die verwendeten Konzentrationen zeigten nach 3 und 18 Stunden keinen Effekt auf die Apoptose- oder Nekroserate von Neutrophilen, wie durch Annexin-V-Propidiumiodid Färbung ermittelt wurde (siehe Abschnitt 2.13.3). Alle Inhibitoren wurden für die Experimente in RPMI Komplettmedium vorverdünnt.

Tabelle 7: Inhibitor-Konzentrationen

Inhibitor	Hersteller	Ziel	Verwendete Konzentration	Lösungsmittel
Akt Inhibitor VIII	Merck KGaA, Darmstadt	Akt	8 μ M	DMSO
C5aRA (A8^{A71-73})	ISEF, UKSH, Lübeck	C5a-Rezeptor	10 μ M	PBS
JNK Inhibitor II	Merck KGaA, Darmstadt	JNK MPK	20 μ M	DMSO
Ly 294002	Merck KGaA, Darmstadt	PI3 Kinase	10 μ M	DMSO
NSC 95397	Sigma Aldrich, Steinheim	MKP-1	10 μ M	DMSO
Piceatannol	Sigma Aldrich, Steinheim	Syk	50 μ M	DMSO
PP2	Merck KGaA, Darmstadt	Src	10 μ M	DMSO
Rac1 Inhibitor	Merck KGaA, Darmstadt	Rac 1	50 μ M	PBS
SB204580	Merck KGaA, Darmstadt	P38 MAPK	3 μ M, 10 μ M	DMSO
U0126	Merck KGaA, Darmstadt	MEK1 MAPKK	10 μ M	DMSO
Wedelolacton	Merck KGaA, Darmstadt	Nf- κ B	25 μ M	DMSO

2.6 Verbrauchsmittel

Tabelle 8: Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
0,5 ml-Röhrchen	Micronic, Lelystad, Niederlande
0,5 / 1,5 / 2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
5, 10, 25 ml Pipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen
5 ml FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
10, 100, 1000 μl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
10 cm Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen
15 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
26 / 30 G Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
50 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
5-20 ml Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
70 μm Nylon-Netze	Becton Dickinson, Heidelberg
96-Well Maxisorb Platten	Nunc, Wiesbaden
Lithiumheparin-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
LS-MACS-Säulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Nitrozellulose-Membranen	Bio-Rad, München
Objektträger	Menzel, Braunschweig

Serum-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Thick Blotting-Paper	Bio-Rad, München
Transferpipetten, 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 96 Well)	Greiner bio-one, Frickenhausen

2.7 Kits

Tabelle 9: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Annexin-V Microbead Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Diff-Quick Färbekit	Medion Diagnostics, Düringen, Schweiz
IL-8 ELISA Cytoset	Invitrogen, Karlsruhe
PKH-26 Membrane labeling Kit	Sigma Aldrich, Steinheim
PKH-67 Membrane labeling Kit	Sigma Aldrich, Steinheim

2.8 Proteine und Antikörper für Immunkomplexe

Rekombinant exprimiertes murines mCol17a-GST (mCol17a) und durch Immunisierung von Kaninchen generiertes anti-mCol17a-GST-IgG (anti-mCol17a-IgG) wurden von der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck zur Verfügung gestellt. mCol17a ist ein Fragment von Kollagen XVIII, das das Ziel von Autoantikörpern im bullösen Pemphigoid ist.

2.9 Geräte

Tabelle 10: Geräte

Produkt	Hersteller
Accu-Jet Pipettierhilfe	Brand, Wertheim
Analyse-Waage	Sartorius, Göttingen
Axiocam HRc	Carl Zeiss, Jena
Axiostar Plus Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Axiovert 25 Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
CO₂-Inkubator Forma Series II	Thermo Fischer, Schwerte
Cytospin 3 Zentrifuge	Shandon, Frankfurt
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad, München
FACS-Calibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Fusion FX7 Chemolumineszenzreader	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Heizblock Unitek HB-130	Scientific Plastics, KS, USA
Neubauer Improved Zählkammer	Karl Hecht, Sondheim
Megafuge 2.0 R	Heraeus, Langenselbold
MidiMACS Separator	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Multichannel Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Multifuge 3 / SR	Heraeus, Langenselbold

Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Semi-Dry Western Blot Kammer	Bio-Rad, München
StrataLinker UV Crosslinker	Agilent Technologies, Waldbronn
SunRise ELISA Reader	Tecan, Grödig, Österreich
Waage	Sartorius, Göttingen
Werkbank	Biohit, Köln
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.10 Software

Tabelle 11: Software

Programm	Hersteller
.CAPT (Analyse von Western Blots)	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Bio1D (Analyse von Western Blots)	Vilber Lourmat, Eberhardzell
CellQuest Pro (Durchflusszytometrie)	Becton Dickinson, Heidelberg
FlowJo (Durchflusszytometrie)	Treestar, OR, USA
Magellan (ELISA)	Tecan, Grödig, Österreich
Photoshop CS	Adobe, München
Prism GraphPad 4 (Statistik)	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Office 2010	Microsoft, Unterschleißheim

2.11 Zellkulturbedingungen

Wenn nicht anders angegeben, wurden die neutrophilen Granulozyten stets in RPMI Kompletmedium aufgenommen. Die Versuche und Inkubationsschritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, bei 37 °C und 5 % CO₂ sowie 95 % Luftfeuchtigkeit.

2.12 Isolation humaner neutrophiler Granulozyten aus Vollblut

Gesunden Freiwilligen wurde Blut in 9 ml Lithiumheparin-Monovetten entnommen und auf Gradienten aus je 12,5 ml Histopaque 1119 (unten, Dichte 1,119 g/ml) und Lymphozytenseparationsmedium (LSM) 1077 (oben, Dichte 1,077 g/ml) geschichtet. Die Gradienten wurden 30 Minuten bei 200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Plasmaschicht sowie die LSM 1077-Schicht, die hauptsächlich die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) enthalten, wurden verworfen. Die Histopaque 1119-Schicht, in der sich die Granulozyten befinden, wurde gesammelt. Die Erythrozyten wurden im Röhrchen belassen. (Abb. 9a).

Die Zellen aus der Histopaque 1119-Schicht wurden einmal mit PBS gewaschen (850 x g, 10 Minuten) und dann in RPMI Komplettmedium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf einen Percoll-Gradienten gegeben, bestehend aus Schichten (je 2 ml, 65 %: 3 ml) der Dichte 1,105 g/ml (85 %), 1,100 g/ml (80 %), 1,093 g/ml (75 %), 1,087 g/ml (70 %) sowie 1,081 g/ml (65 %). Die Isotonie des Percolls wurde mit 10 x PBS hergestellt und Verdünnungen mit RPMI Komplettmedium angesetzt. Nach Zentrifugation bei 1000 x g für 25 Minuten bei Raumtemperatur wurden die obersten Schichten des Gradienten bis zur 65 %-Percoll-Phase einschließlich verworfen und die ersten drei Granulozyten-Interphasen sowie die 70 %-und 75 %-Percoll-Phasen gesammelt (Abb. 9b).

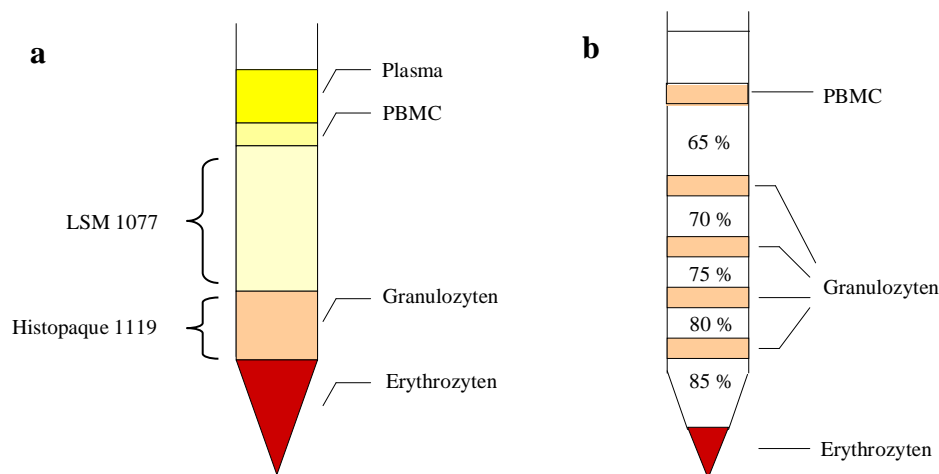


Abb. 9: Gradienten für die Isolation von Neutrophilen Granulozyten. a: Histopaque 1119-LSM 1077 Gradient nach Zentrifugation. Die Granulozyten befinden sich in der Histopaque 1119-Schicht, die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) befinden sich über dem LSM 1077. **b:** Percoll-Gradient nach Zentrifugation. Prozent-Werte geben den Percoll-Anteil der jeweiligen Schicht an. Über der 65% Percoll-Schicht befinden sich restliche PBMC. In den übrigen Interphasen befinden sich Granulozyten.

Die so gewonnenen Zellen wurden noch einmal mit PBS gewaschen und dann in RPMI Komplettmedium aufgenommen. Eine Reinheitsbestimmung ergab einen Anteil von über 99 % Granulozyten. Die isolierten Zellen waren zum größten Teil Neutrophile, der Anteil von eosinophilen Granulozyten betrug spenderabhängig 0,1-15 %. Pro Röhrchen Blut (9 ml) konnten je nach Spender 10 – 25x10⁶ Granulozyten isoliert werden. Eine Ausschlussfärbung mit Trypanblau ergab eine Zellvitalität von über 99 %.

2.12.1 Zellzahl- und Reinheitsbestimmung

Die Zellen wurden mit Kristallviolett-Färbelösung oder 0,4 % Trypanblau verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Zur Bestimmung der Reinheit der Zellpräparation wurden 1×10^5 Zellen mittels einer Cytospin 3 Zentrifuge auf einen Objektträger zentrifugiert (500 rpm, 5 Minuten). Die Zellen wurden dann mit dem Diff-Quick Färbekit fixiert, gefärbt und mikroskopisch analysiert.

2.13 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom separiert. Sie können nun einzeln an einem oder mehreren Lasern vorbeigeführt werden (Abb. 10a). Neben der durch die Laser angeregten Fluoreszenz können auch Vorwärts (FSC)- und Seitwärts (SSC)-Streulicht analysiert werden. Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Größe, das Seitwärtsstreulicht ein Maß für die innere Komplexität von Zellen, also z.B. den Granulagehalt. Allein durch FSC und SSC lassen sich ohne Färbung der Zellen Zellpopulationen, z.B. Neutrophile und Lymphozyten, voneinander unterscheiden (Abb. 10b).

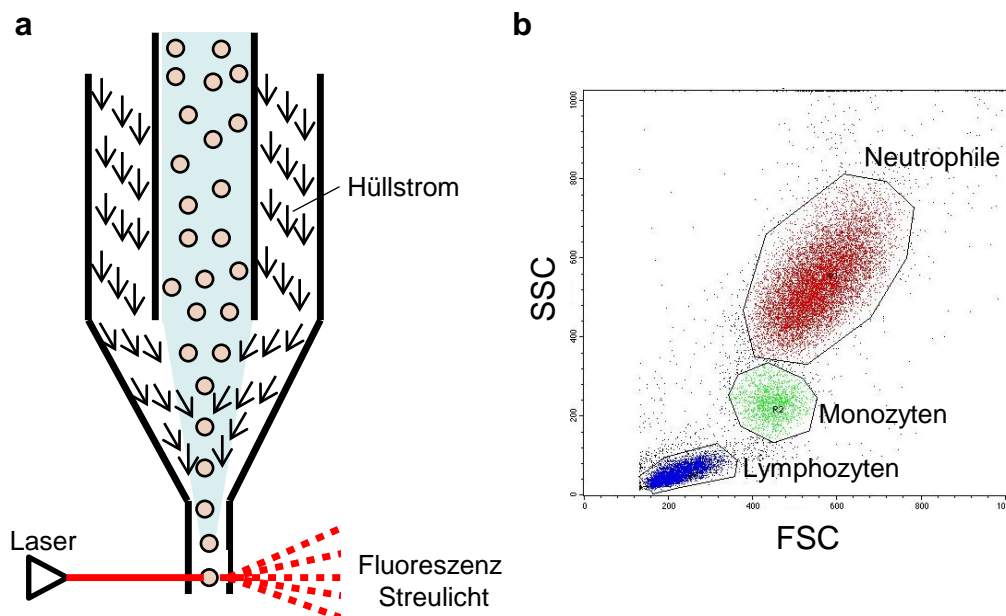


Abb. 10: Durchflusszytometrie. a: Mithilfe eines Hüllstromes werden die Zellen einzeln an einem Laser vorbeigeführt. Emittierte Fluoreszenz und Streulicht werden detektiert. **b:** Unterscheidung von Zellpopulationen im Vollblut (nach der Lyse der Erythrozyten) mithilfe von Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC).

2.13.1 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies mit Dihydrorhodamin 123

Für die Detektion intrazellulärer Sauerstoffspezies wurde der Farbstoff Dihydrorhodamin 123 (DHR123) verwendet. DHR123 ist unpolar und damit membrangängig. Wird der Farbstoff in der Zelle durch ROS oxidiert, entsteht das grün fluoreszierende Rhodamin 123, das mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden kann.

Zur Detektion von ROS wurden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml mit $1 \mu\text{M}$ DHR123 für 5-45 Minuten mit verschiedenen Stimuli inkubiert. Abschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt, um die Reaktion zu stoppen und umgehend durchflusszytometrisch analysiert.

2.13.2 Markierung von Membranantigenen mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern

Zur Markierung von Membranantigenen wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen zunächst mit FACS-Puffer bei $400 \times g$ für 5 Minuten bei 4°C gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in $100 \mu\text{l}$ FACS-Puffer mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern in einer 1:100 Verdünnung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln wurde erneut gewaschen und die Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

2.13.3 Detektion der Apoptose- und Nekroserate mit Annexin-V und Propidiumiodid

Annexin-V bindet calciumabhängig Phosphatidylserin, das bei apoptotischen Zellen nicht mehr aktiv auf die Innenseite der Zellmembran transportiert wird und somit als Apoptosemarker verwendet werden kann, da es bei apoptotischen Zellen vermehrt auf der Außenseite der Zellmembran vorhanden ist. Propidiumiodid interkaliert in die DNA, ist allerdings nicht membrangängig. Somit werden durch Propidiumiodid nur nekrotische Zellen gefärbt, deren Zellmembran zerstört ist.

Für die Detektion der Apoptose und Nekrose wurden Neutrophile (5×10^6 Zellen/ml) in Annexin-Puffer für 20 Minuten mit Annexin-V-Fluos (1:100) bei 4°C inkubiert. Dann wurde Propidiumiodid (1:100) zugegeben und die Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

2.14 Apoptose-Induktion

2.14.1 Induktion der Apoptose mittels UV-Bestrahlung

Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht führt zur Akkumulation von DNA-Schäden und damit zur Induktion von Apoptose. Neutrophile wurden in RPMI Komplettmedium in einer Konzentration von 20×10^6 Zellen/ml in eine 12-Well Platte gegeben (350 μ l je Well) und mit 1000 mJ UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurde 1 ml RPMI Komplettmedium zugegeben und die Zellen für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit waren über 70 % der Neutrophilen apoptotisch, jedoch unter 5 % nekrotisch.

2.14.2 Spontane Apoptose

Neutrophile gehen in Zellkultur innerhalb weniger Stunden in die spontane Apoptose. Zur spontanen Induktion der Apoptose wurden Neutrophile in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in eine 12-Well Platte gegeben (1 ml je Well) und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Anteil apoptotischer Zellen nach dieser Zeit betrug spenderabhängig 50 % - 80 %. Der Anteil nekrotischer Zellen betrug stets unter 10 %.

2.14.3 Anreicherung apoptotischer Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)

Um eine hochreine Population apoptotischer Zellen zu erhalten, wurden über Nacht spontan apoptotisch gewordene Neutrophile mittels MACS angereichert. Dazu wurden die Zellen mit Binde-Puffer für 5 Minuten bei 400 x g und 4 °C gewaschen. Das Zellpellet wurde in 80 μ l Binde-Puffer je 10^7 Zellen aufgenommen und 20 μ l Annexin-V *Beads* je 10^7 Zellen zugegeben. Nach einer Inkubation für 15 Minuten bei 4°C wurden die Zellen erneut mit Binde-Puffer gewaschen und das Pellet in 1 ml Binde-Puffer resuspendiert. Eine LS-MACS-Säule wurde mit 3 ml Binde-Puffer gespült und die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule dreimal mit je 3 ml Binde-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die apoptotischen Zellen mit Elutions-Puffer (Binde-Puffer ohne CaCl_2) aus der Säule gespült. Die so gewonnenen Zellen waren zu über 90 % apoptotisch und unter 10 % nekrotisch.

2.15 Phagozytose von *Beads*

Als Modell für die Phagozytose kleiner Partikel wurden fluoreszierende *Latex-Beads* (Durchmesser 1 μm) verwendet. $0,5 \times 10^6$ Neutrophile wurden in 100 μl RPMI Komplettmedium in der An- oder Abwesenheit von 20 % humanem Serum mit verschiedenen Substanzen vorinkubiert. Anschließend wurden $2,5 \times 10^6$ *Beads* zugegeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Phagozytose wurde durch Inkubation auf Eis gestoppt und extrazelluläre Fluoreszenz durch Zugabe von 8 μl 0,4 % Trypanblau-Lösung gequenchet. Die Zellen wurden danach gewaschen (400 x g, 5 Minuten, 4 °C) und Cytospin-Präparate angefertigt. Die Präparate wurden Diff-Quick gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

2.16 Phagozytose apoptotischer Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* die Aufnahme apoptotischer humaner Neutrophiler durch aus Vollblut isolierte neutrophile Granulozyten oder Neutrophile in Vollblut untersucht. Außerdem wurde *in vivo* die Aufnahme apoptotischer Zellen im Mausmodell analysiert. Für alle Versuche wurden apoptotische Neutrophile durch UV-Bestrahlung generiert.

2.16.1 Membranfärbung mit PKH-Farbstoffen

Um vitale und apoptotische Zellen im Durchflusszytometer unterscheiden und die Phagozytose apoptotischer Zellen analysieren zu können, wurden humane vitale und apoptotische Neutrophile mit den fluoreszierenden Membranfarbstoffen PKH-26 (rot) oder PKH-67 (grün) nach Herstellerangaben gefärbt. Zur Färbung wurden 7 μl PKH-26- oder 3 μl PKH-67-Farbstoff für je 20×10^7 Zellen in 1 ml Färbenvolumen verwendet.

2.16.2 Phagozytose humaner apoptotischer neutrophiler Granulozyten durch vitale Neutrophile *in vitro*

Für *In-Vitro*-Versuche wurden vitale Neutrophile mit PKH-67 und apoptotische Zellen mit PKH-26 gefärbt. 1×10^5 vitale Neutrophile wurden mit verschiedenen Stimuli in $100 \mu\text{l}$ Volumen in Medium mit 30 % autologem humanen Serum für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert (Abb. 11a). Anschließend wurden 4×10^5 apoptotische Neutrophile zugegeben und weitere 90 Minuten bei 37°C inkubiert (Abb. 11b). Dann wurde die Phagozytose durch Inkubation auf Eis gestoppt. Die Zellen wurden am Durchflusszytometer eingelesen und die Phagozytoserate bestimmt (Abb. 11c).

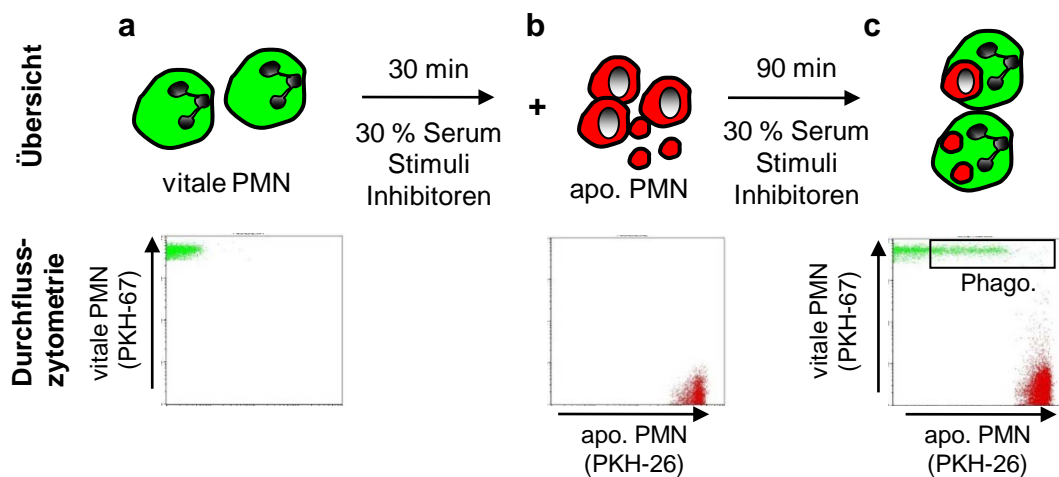


Abb. 11: Phagozytose apoptotischer Neutrophiler (PMN) durch vitale Neutrophile. Der Versuchsablauf und die durchflusszytometrische Analyse der jeweiligen Zellpopulationen sind schematisch dargestellt. **a:** Vitale PMN wurden mittels PKH-67 (grün) gefärbt und 1×10^5 so markierte Zellen für 30 Minuten in der Anwesenheit von autologem Serum mit verschiedenen Stimuli oder Inhibitoren vorinkubiert. **b:** Apoptotische humane Neutrophile wurden mittels PKH-26 (rot) gefärbt und 4×10^5 PKH-26-markierte apoptotische (apo.) PMN zu den vitalen Zellen gegeben. **c:** Nach 90 Minuten haben die grün fluoreszierenden vitalen PMN rot fluoreszierende apoptotische PMN aufgenommen. Dadurch hat sich die Population der vitalen Zellen in der durchflusszytometrischen Darstellung verschoben (Markierung „Phago.“).

2.16.3 Analyse der Phagozytose apoptotischer Neutrophiler in Vollblut

$50 \mu\text{l}$ heparinisiertes Vollblut wurden für 30 Minuten bei 37°C mit verschiedenen Stimuli vorinkubiert (Abb. 12a). Anschließend wurden 1×10^6 PKH-26-gefärbte apoptotische Neutrophile zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert (Abb. 12b). Dann wurden die Erythrozyten mithilfe der FACS-Lyse-Lösung nach Herstellerangaben lysiert und die Zellen

durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurden zunächst die Neutrophilen im FSC-SSC Plot selektiert und dann die Phagozytoserate bestimmt (Abb. 12c).

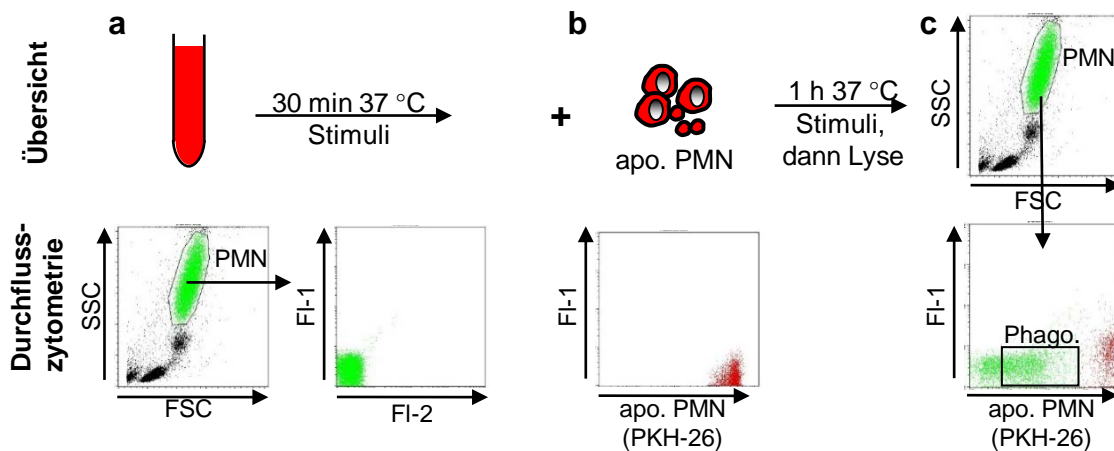


Abb. 12: Phagozytose apoptotischer Neutrophiler (PMN) im Vollblut. Der Versuchsablauf und die durchflusszytometrische Analyse der jeweiligen Zellpopulationen sind schematisch dargestellt. **a:** Vollblut wurde in Anwesenheit verschiedener Stimuli für 30 Minuten vorinkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse der Neutrophilen im Blut ist durch Selektion der PMN-Population (grün) in der Vorwärts (FSC)-Seitwärts (SSC)-Streulicht-Darstellung möglich. **b:** Apoptotische humane Neutrophile wurden mittels PKH-26 (rot) gefärbt und 1×10^6 PKH-26-markierte apoptotische (apo.) PMN zum Vollblut gegeben. Nach einer Stunde wurden die Erythrozyten des Blutes lysiert und die restlichen Zellen durchflusszytometrisch analysiert **c:** Die PMN im Vollblut haben rot fluoreszierende apoptotische PMN aufgenommen (Markierung „Phago.“). FI-1/FI-2: Fluoreszenzkanal 1/2.

2.16.4 Phagozytose apoptotischer Neutrophiler durch Zellen im Maus *Air-Pouch*

Das Maus *Air-Pouch* Modell ermöglicht die Rekrutierung bestimmter Zellpopulationen in ein definiertes Kompartiment, das durch Injektion von Luft im Rücken einer Maus hergestellt wird. Durch die Injektion von proentzündlichen Mediatoren wie bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) oder Chemokine wie das IL-8 Analogon MIP-2 kann eine Entzündungsreaktion ausgelöst werden, in deren Verlauf inflammatorische Zellen wie Neutrophile und später Makrophagen in den *Air-Pouch* einwandern.

Zur Generierung des *Air-Pouches* wurden 8-12 Wochen alte weibliche C57BL/6-Mäuse an Tag 0 mit Diethylether narkotisiert und 5 ml Luft subkutan im Rückenbereich gespritzt. An Tag 3 wurde der *Pouch* durch Injektion von etwa 3 ml Luft wieder aufgefüllt (Abb. 13a). An Tag 6 wurde dann 1 μ g LPS oder 0,5 μ g MIP-2 in 1 ml PBS in den *Air-Pouch* gespritzt (Abb. 13b). Nach 4 Stunden wurden zu den eingewanderten murinen Zellen 4×10^6 apoptotische,

PKH-67 gefärbte humane Neutrophile in den *Air-Pouch* injiziert (Abb. 13c). Nach 10 und 30 Minuten wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und der *Air-Pouch* fünfmal mit 1 ml eiskaltem PBS gespült. Die murinen Neutrophilen wurden nach 10-minütiger Blockierung der Fc-Rezeptoren mit anti-CD16/CD32 Antikörpern bei 4°C mit anti-Ly-6G-PE Antikörpern gegengefärbt und die Phagozytose der apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 13d).

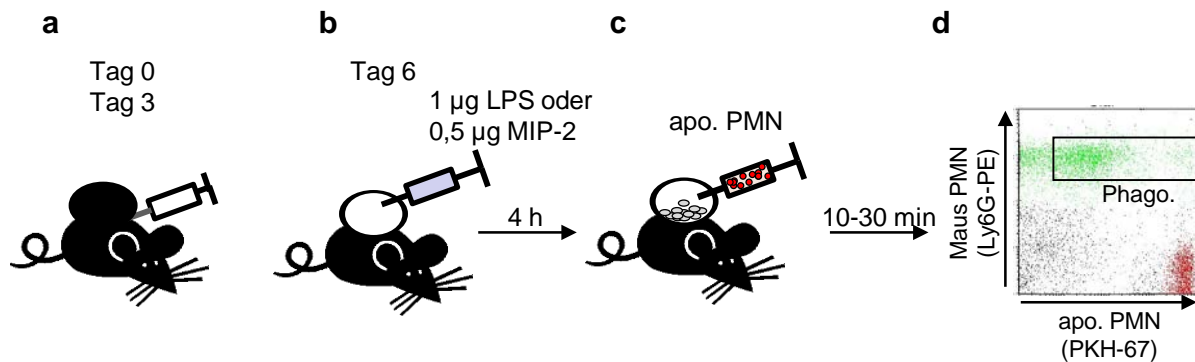


Abb. 13: Phagozytose apoptotischer Neutrophiler (PMN) durch murine Neutrophile im Maus *Air-Pouch*. **a:** An Tag 0 und Tag 3 wurde Luft subkutan im Rückenbereich einer Maus injiziert. **b:** An Tag 6 wurde 1 µg LPS oder 0,5 µg MIP-2 injiziert. **c:** Nach 4 Stunden wurden 4 Millionen apoptotische (apo.), PKH-67 markierte humane PMN injiziert. **d:** Nach 10-30 Minuten wurden die Zellen aus dem *Air-Pouch* gespült, die murinen Neutrophilen mit anti-Ly-6G-PE Antikörpern angefärbt und die Phagozytose (Markierung „Phago.“) durchflusszytometrisch analysiert.

2.17 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Konzentration von IL-8 in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben mit Modifikationen durchgeführt. 96-Well *Maxisorb*-Platten wurden mit 1 µg/ml Fängerantikörper in 100 µl PBS durch Inkubation bei 4 °C über Nacht beschichtet. Nach dem Waschen der Platten mit ELISA-Waschpuffer wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation mit 300 µl ELISA-Blockierungs-Puffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Dann wurde viermal gewaschen und je 100 µl Proteinstandard (1:2 Verdünnungsreihe ab 2 ng/ml in ELISA-Puffer) sowie Proben (1:5 und 1:50 verdünnt in ELISA-Puffer) aufgetragen und 1,5 Stunden schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (4 x) wurden 100 µl biotinylierter Sekundärantikörper (1 µg/ml in ELISA-Puffer) zugegeben und 1,5 Stunden schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden 100 µl Streptavidin-HRP (1:5000 verdünnt in ELISA-Puffer) hinzupipettiert, für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert,

gewaschen (6 x) und die Bindung mit dem Opteia TMB Substrat nach Herstellerangaben nachgewiesen.

2.18 Gewinnung von Zelllysaten mit Trichloressigsäure

Da neutrophile Granula eine Vielzahl an Proteasen enthalten, ist eine Lyse von Neutrophilen mit konventionellen Lysepuffern nur unter Zugabe einer großen Anzahl von Proteaseinhibitoren möglich. Eine einfachere Methode zur Gewinnung von Zelllysaten stellt die Lyse mittels Trichloressigsäure (TCA) dar.

Hierfür wurden 0,5 ml oder 1 ml Neutrophile mit einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml für 5 Minuten bei 850 x g pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde dann in 500 μ l 10 % eiskalter TCA resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 5 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert und das Pellet mit 100 % eiskaltem Aceton gewaschen. Das entstandene Proteinpellet wurde in 100 μ l kochendem 1 x Western Blot Ladepuffer je 10^6 Zellen aufgenommen und 7 Minuten gekocht. Dann wurde erneut zentrifugiert, und der Überstand bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

2.19 Western Blot

Zum Nachweis von Proteinen in den Zelllysaten wurde ein Äquivalent von $0,6 \times 10^6$ Zellen auf einem 10 % Polyacrylamid Gel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (15 min 75 V, 1,5 Stunden, 125 V). Die Proteine wurden mittels *Semi-Dry* Western Blot auf Nitrocellulose Membran transferiert (1,5 Stunden, 145 mA) und unspezifische Bindungen durch Inkubation mit 5 % BSA in T-TBS für eine Stunde blockiert. Dann wurde mit Primärantikörpern (Verdünnung anti-MKP-1: 1:500, sonst 1:1000) über Nacht bei 4 °C in 5 % BSA in T-TBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 15 Minuten mit T-TBS wurde für eine Stunde HRP-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper (1:5000) in 5 % BSA in T-TBS zugegeben und danach erneut gewaschen. Für Lysate aus Versuchen, in denen Antikörper zugegeben worden waren, wurde erst mit konformationsspezifischem Maus-anti-Kaninchen Antikörper, der kein denaturiertes IgG aus den Lysaten bindet, und anschließend mit HRP-konjugiertem anti-Maus Antikörper inkubiert. Die HRP-konjugierten Antikörper wurden mit Immobilon Western Blot Chemolumineszenzsubstrat nachgewiesen.

2.20 Statistische Analyse

Die Darstellung der Daten erfolgte mit Mittelwert und Standardabweichung. Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism 4 durchgeführt. Für den Vergleich von Datensätzen wurde der *one-way* ANOVA Test mit Bonferroni *post*-Test verwendet und p-Werte $< 0,05$ mit * gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Modulation der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile durch Serumfaktoren und pro-entzündliche Stimuli

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Esmann et al., 2010) wurde gezeigt, dass vitale Neutrophile apoptotische neutrophile Granulozyten phagozytieren können. Da hitzelabile Serumfaktoren für diesen Prozess erforderlich sind, wurden alle Versuche in Anwesenheit von 30 % humanem autologen Serum durchgeführt. Allerdings ist noch nicht bekannt, welche Serumfaktoren für den Phagozytoseprozess erforderlich sind, und welche Faktoren modulatorisch auf die Phagozytose wirken können.

3.1.1 Hitzelabile Serumfaktoren aus frischem humanem Serum werden für die Phagozytose apoptotischer Zellen benötigt

Zunächst wurden Versuche durchgeführt, um die Abhängigkeit der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile von frischem humanem Serum zu bestätigen. Außerdem sollte überprüft werden, ob Serumfaktoren in fötalem Kälberserum (FCS) ausreichend für den Phagozytoseprozess sind. Dazu wurde die Phagozytose apoptotischer Zellen in Anwesenheit von 30 % verschiedener Seren verglichen. Verwendet wurden:

- autologes humanes Serum
- autologes humanes Serum, hitzeinaktiviert (30 Minuten 56 °C)
- FCS, hitzeinaktiviert (Sigma Aldrich)
- FCS Standardqualität (PAA, FCS 2)
- FCS Gold (PAA, FCS 3)

Etwa 20 % der vitalen Neutrophilen phagozytierten in Anwesenheit von 30 % frischem autologen Serum apoptotische Zellen. In Anwesenheit von hitzeinaktiviertem autologen Serum befand sich die Phagozytoserate auf Hintergrund-Niveau (Abb. 14). Das bereits inaktivierte fötale Kälberserum, das im RPMI Komplettmedium verwendet wurde, sowie die

beiden getesteten nicht inaktivierten fötalen Kälberseren (FCS 2 und FCS 3) induzierten verglichen mit der Mediumkontrolle keine Phagozytose.

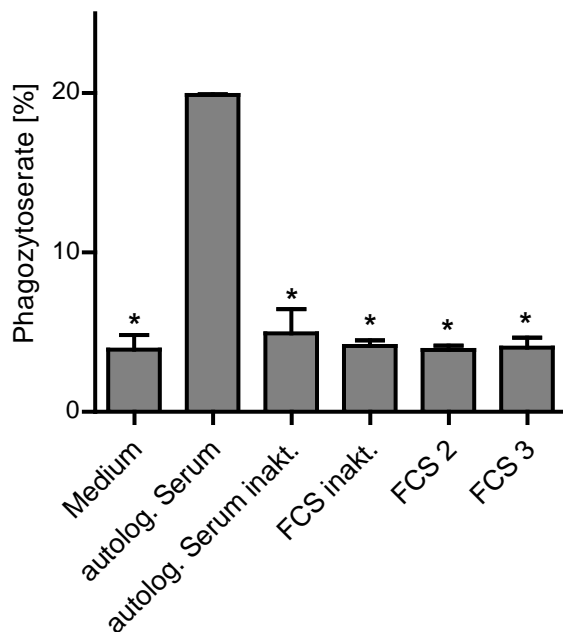


Abb. 14: Faktoren aus frischem humanem Serum sind für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile erforderlich. 1×10^5 Neutrophile wurden in Anwesenheit von 30 % verschiedener Seren mit 4×10^5 apoptotischen Neutrophilen für 90 Minuten inkubiert. Die Phagozytoserate wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind Werte aus 3 Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung. *: $p < 0,05$ verglichen mit autologem Serum. FCS: fötales Kälberserum.

3.1.2 Die Phagozytose apoptotischer Zellen durch vitale Neutrophile ist EDTA-sensitiv

Zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} sind für die Interaktion vieler Faktoren notwendig. Um herauszufinden, ob Kationen-abhängige Faktoren für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile benötigt werden, wurden Phagozytoseversuche in Gegenwart verschiedener EDTA-Konzentrationen, das zweiwertige Kationen chelatiert, durchgeführt.

Wie unter Abschnitt 2.16.2 beschrieben wurden *in vitro* Phagozytoseversuche mit Neutrophilen durchgeführt. Hierbei waren 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,75 mM oder 2,5 mM EDTA in den Phagozytoseansätzen vorhanden. Es zeigte sich eine dosisabhängige Inhibierung der Phagozytose apoptotischer Zellen durch vitale Neutrophile in der Anwesenheit von EDTA (Abb. 15).

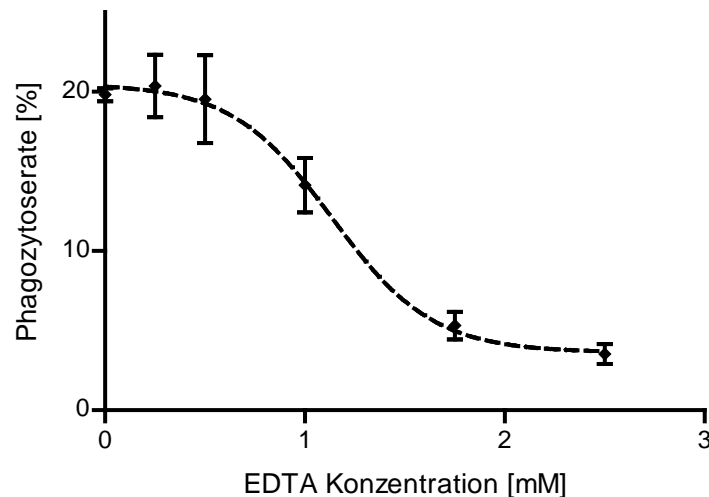


Abb. 15: Die Phagozytose apoptotischer Zellen durch vitale Neutrophile ist EDTA-sensitiv. 1×10^5 Neutrophile wurden in Anwesenheit von 30 % autologem Serum und verschiedenen Konzentrationen von EDTA mit 4×10^5 apoptotischen Neutrophilen für 90 Minuten inkubiert. Die Phagozytoserate wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind Werte aus 3 Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung mit sigmoidaler nicht linearer Kurvenapproximation.

3.1.3 Komplement-Faktoren sind wichtig für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile

Komplement-Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Phagozytose apoptotischer Neutrophiler durch Makrophagen (Takizawa et al., 1996). Auch weist die Tatsache, dass die für die Phagozytose benötigten Faktoren hitzelabil sind, auf eine Rolle des Komplementsystems hin. Um den Einfluss verschiedener Komplementfaktoren auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile zu untersuchen, wurden Seren verwendet, die defizient für einzelne Komplementfaktoren waren.

Es wurden *in vitro* Phagozytoseversuche wie unter 2.16.2 beschrieben in Anwesenheit von 30 % C1q-, C3-, oder C5-defizientem Serum durchgeführt. Um zu überprüfen, ob eine vorhandene Verminderung der Phagozytose auf die jeweils depletierten Serumfaktoren zurückzuführen ist, wurde außerdem der jeweilige Faktor in einem weiteren Ansatz in physiologischer Serumkonzentration (C1q: 70 $\mu\text{g/ml}$, C3: 70 $\mu\text{g/ml}$, C5: 500 $\mu\text{g/ml}$) resubstituiert.

Bei allen drei Komplement-defizienten Seren zeigte sich eine stark verminderte Phagozytoserate gegenüber dem autologen Serum, die nur leicht über dem Hintergrund-

Niveau lag. Resubstitution von C1q oder C5 in die jeweiligen Ansätze verstärkte die Phagozytose wieder, allerdings lag diese immer noch unter dem Niveau von frischem Serum. Dagegen führte die Resubstitution von C3 in den C3-defizienten Phagozytoseansatz zu einer starken Erhöhung der Phagozytoserate, die auf dem Niveau von frischem Serum lag (Abb. 16).

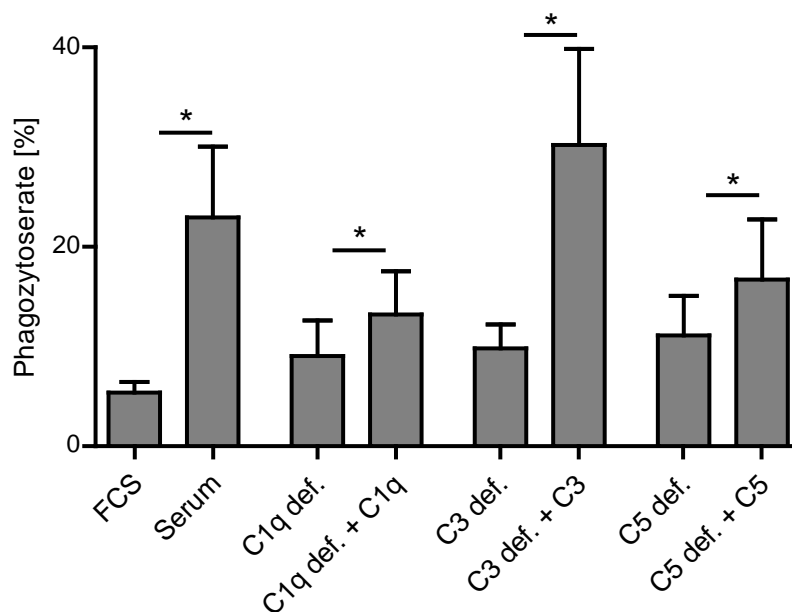


Abb. 16: Komplementfaktoren werden für die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Neutrophile benötigt. 1×10^5 Neutrophile wurden in Anwesenheit von 30 % autologem Serum oder Seren, die defizient für C1q (C1q def.), C3 (C3 def.) oder C5 (C5 def.) waren, mit 4×10^5 apoptotischen Neutrophilen für 90 Minuten inkubiert. In Kontrollansätzen wurden die depletierten Faktoren resubstituiert. Die Phagozytoserate wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind Daten aus 5 Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung. *: $p < 0,05$.

3.1.4 Die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile ist Rac1-abhängig

Die kleinen GTPasen Rac1 und Rac2 sind wichtige Schlüsselmoleküle bei der Aktinpolymerisation während der Phagozytose. Rac1 und Rac2 werden hauptsächlich über den Fc- γ -Rezeptor, der Antikörper detektiert oder über Komplementrezeptoren aktiviert. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Komplementfaktoren wichtig für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile sind, sollte nun mithilfe eines Inhibitors für Rac1 überprüft werden, ob Rac-Proteine am Phagozytoseprozess beteiligt sind. Außerdem wurden

Inhibitoren für Src und Syk, Kinasen, die nach Aktivierung des Fc- γ -Rezeptors aktiviert werden, verwendet.

Dafür wurden Phagozytoseversuche wie unter 2.16.2 beschrieben durchgeführt. Vitale, PKH-26 markierte Neutrophile wurden für 30 Minuten mit 50 μ M Rac1-Inhibitor, 10 μ M PP2, einem Src-Inhibitor, 50 μ M Piceatannol, einem Syk-Inhibitor oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle in Gegenwart von 30 % autologem Serum vorbehandelt. Anschließend wurden apoptotische Zellen zugegeben und die Phagozytose nach 90 Minuten durchflusszytometrisch analysiert. Die relative Fluoreszenzintensität der Neutrophilen, die apoptotisches Material aufgenommen hatten, wurde außerdem als Maß für die Menge des aufgenommenen apoptotischen Materials untersucht.

Keiner der Inhibitoren hatte einen signifikanten Einfluss auf die Phagozytoserate (Abb. 17a). Es war jedoch zu erkennen, dass die Menge des aufgenommenen apoptotischen Materials durch Vorinkubation mit dem Rac1-Inhibitor signifikant verringert wurde (Abb. 17b). Die Inhibierung von Src und Syk zeigte auch hier keinen Effekt.

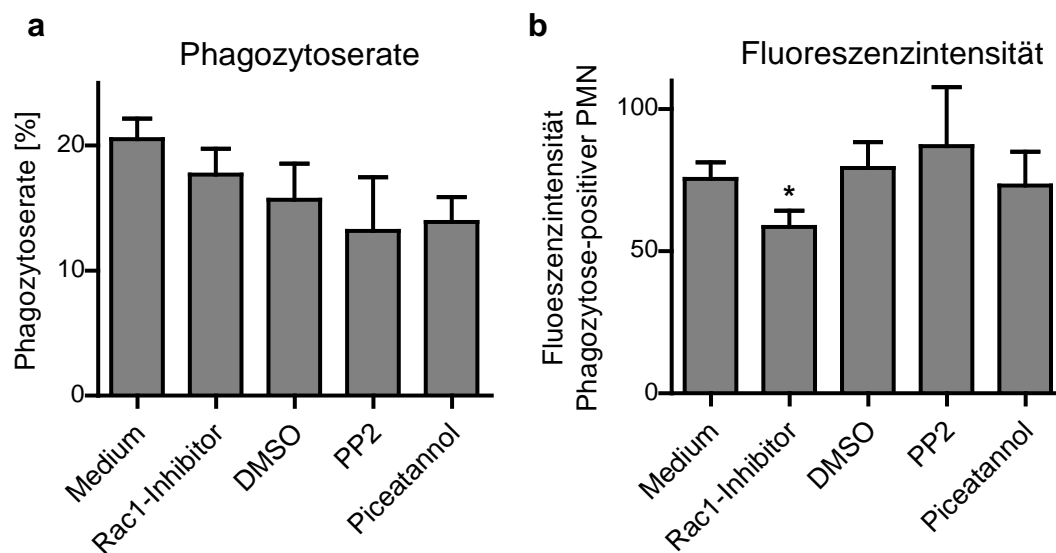


Abb. 17: Rac1 ist an der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile beteiligt. 1×10^5 PKH-67 gefärbte vitale Neutrophile wurden für 30 Minuten mit 50 μ M Rac1-Inhibitor, 10 μ M PP2, 50 μ M Piceatannol oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle in Anwesenheit von 30 % autologem Serum vorbehandelt. Anschließend wurden 4×10^5 PKH-26 gefärbte apoptotische Zellen zugegeben und nach 90 Minuten die Phagozytoserate durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 4 Experimenten. **a:** Phagozytoserate. **b:** Fluoreszenzintensität der Zellen, die apoptotisches Material aufgenommen haben. *: $p < 0,05$.

3.1.5 Einfluss von Toll-Like-Rezeptor-Liganden auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile

Am Ort einer Entzündung, die durch mikrobielle Erreger ausgelöst worden ist, sind nicht nur Faktoren des Komplementsystems aktiv. Auch werden die Zellen des Immunsystems durch Bestandteile der Erreger aktiviert. Viele bakterielle oder virale Faktoren werden durch TLR erkannt. Diese Faktoren können Neutrophile aktivieren und Effektorfunktionen wie die Freisetzung von ROS verstärken. Auch die Aufnahme von Bakterien durch Neutrophile kann durch Stimulation über TLR gesteigert werden. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob auch die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch TLR-Liganden beeinflusst werden kann.

3.1.5.1 Einfluss von Toll-Like-Rezeptor-Liganden auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch isolierte Neutrophile

Zunächst wurden *in vitro* Phagozytoseversuche mit isolierten Neutrophilen wie unter 2.16.2 beschrieben durchgeführt. Die vitalen Zellen wurden für 30 Minuten mit LPS (100 ng/ml, TLR 4), Flagellin (2 µg/ml, TLR 5), R848 (1 µg/ml, TLR 7/8), MALP-2 (20 ng/ml, TLR 2/6), PAM₃CSK₄ (40 µg/ml, TLR 1/2), Poly I:C (100 µg/ml, TLR 3) oder ODN2006 bzw. Kontrolle (5 µM, TLR 9) behandelt. Anschließend wurde die Phagozytoseaktivität der Neutrophilen analysiert. Es zeigte sich, dass die TLR-Liganden Pam₃CSK₄, Malp2, LPS, Imiquimod, R848 und ODN2006 die Phagozytoserate signifikant erhöhten. Flagellin und Poly I:C hatten keinen Effekt (Abb. 18a).

3.1.5.2 Einfluss von Toll-Like-Rezeptor-Liganden auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile im Vollblut

Anschließend wurden die gleichen Liganden in dem unter 2.16.3 beschriebenen Vollblut-Phagozytosemodell eingesetzt, um Wechselwirkungen mit anderen Immunzellen mit einzubeziehen. Während die Phagozytoserate bei unstimulierten isolierten Neutrophilen etwa 20 % betrug, lag der Anteil der vitalen Neutrophilen, die apoptotisches Material aufgenommen hatte, im Vollblut bei etwa 40 %. Wie bei isolierten Neutrophilen erhöhten auch im Vollblut Pam₃CSK₄, LPS und R848 die Phagozytoserate (Abb. 18b). Flagellin zeigte auch hier keinen Effekt, darüber hinaus waren auch Imiquimod und ODN2006 ohne Einfluss auf die Phagozytoserate. Das bei isolierten Neutrophilen unwirksame Poly I:C

hingegen erhöhte im Vollblut-Modell signifikant die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile.

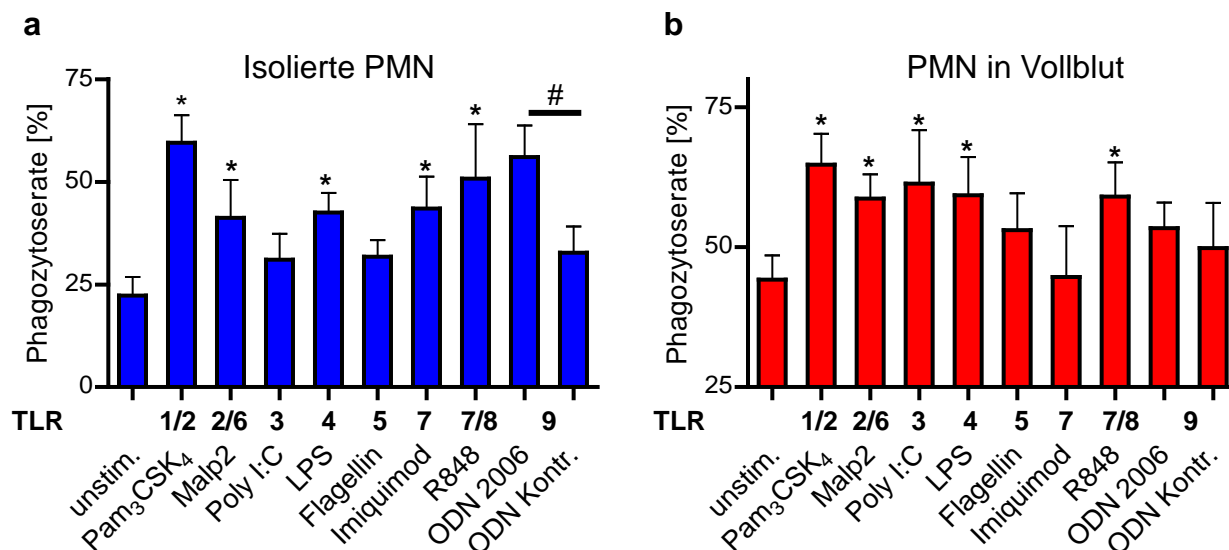


Abb. 18: Toll-Like-Rezeptor (TLR)-Liganden stimulieren die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile. **a:** 1×10^5 PKH-67 markierte Neutrophile wurden in Anwesenheit von 30 % autologem Serum für 30 Minuten mit TLR-Liganden behandelt und anschließend mit 4×10^5 PKH-26 markierten apoptotischen Neutrophilen für 90 Minuten inkubiert. Die Phagozytoserate wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. **b:** 50 μ l Vollblut wurden für 30 Minuten mit TLR-Liganden behandelt. Anschließend wurden 10^6 PKH-26 markierte apoptotische Neutrophile zugegeben und für 60 Minuten inkubiert. Nach der Lyse der Erythrozyten wurde die Phagozytose durch die Neutrophilen-Population durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind Werte aus 4 Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung. *: $p < 0,05$ verglichen mit dem unstimulierten Ansatz, #: $p < 0,05$.

3.1.6 Einfluss von Zytokinen auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile

Am Ort einer Entzündung werden sowohl durch Gewebezellen, als auch durch einwandernde Zellen des Immunsystems große Mengen an Zytokinen sekretiert, die chemotaktisch auf andere Zellen wirken oder diese aktivieren. Deshalb sollte der Effekt verschiedener Zytokine auf das Phagozytosevermögen von Neutrophilen untersucht werden.

3.1.6.1 Einfluss von Zytokinen auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch isolierte Neutrophile

Um den Effekt verschiedener Zytokine auf das Phagozytosevermögen von Neutrophilen zu untersuchen, wurden zunächst Phagozytoseversuche mit isolierten Neutrophilen durchgeführt. Die isolierten Neutrophilen wurden mit je 200 ng/ml IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, 40 ng/ml GM-CSF, 40 ng/ml M-CSF oder 100 ng/ml TNF behandelt. Dann wurden die apoptotischen Zellen zugegeben und nach 90 Minuten die Phagozytoserate bestimmt.

Lediglich die Behandlung mit TNF oder GM-CSF erhöhte die Phagozytose-Aktivität der vitalen Neutrophilen. Die Phagozytoserate verdreifachte sich von 20 % auf etwa 60 %. IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17 und M-CSF hatten keinen Einfluss auf die Phagozytoserate (Abb. 19a).

3.1.6.2 Einfluss von Zytokinen auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile im Vollblut

Um Interaktionen mit anderen Zellen mit einzubeziehen, wurden nun Experimente mit Vollblut durchgeführt. Auch hier lag die Phagozytoserate im Vollblut deutlich über der Phagozytoserate bei isolierten Neutrophilen. Hier erhöhte lediglich TNF die Phagozytose-Aktivität der Neutrophilen im Vollblut signifikant. GM-CSF erhöhte tendenziell, wenn auch nicht signifikant, die Phagozytoserate (Abb. 19b). Auch im Vollblut zeigten IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17 und M-CSF keine Wirkung auf die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Neutrophile (Abb. 19b).

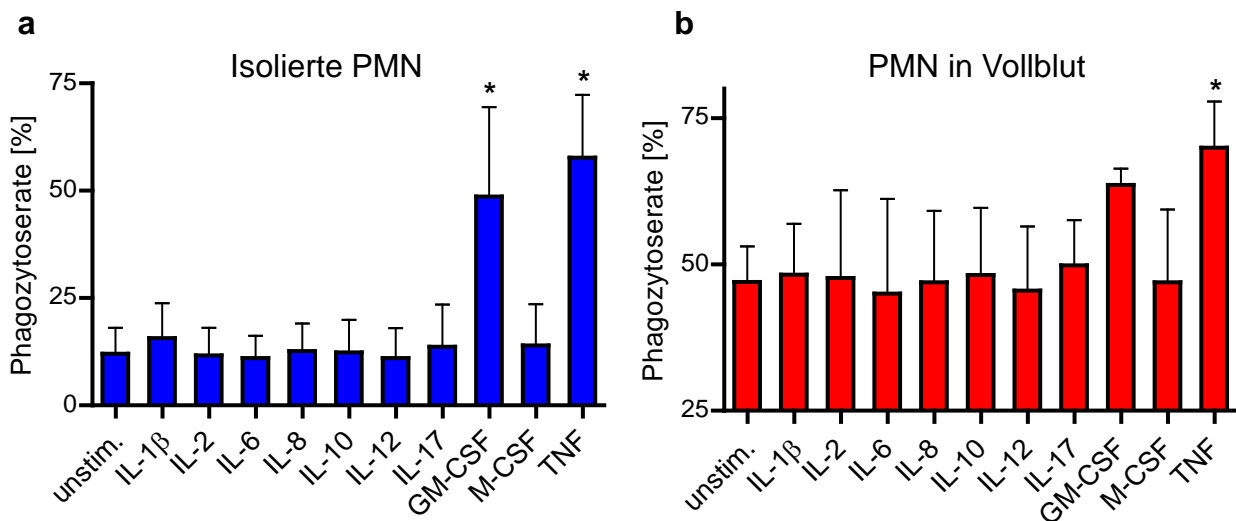


Abb. 19: TNF und GM-CSF stimulieren die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile. **a:** 1×10^5 Neutrophile wurden in Anwesenheit von 30 % autologem Serum für 30 Minuten mit verschiedenen Zytokinen behandelt und anschließend mit 4×10^5 apoptotischen Neutrophilen für 90 Minuten inkubiert. Die Phagozytoserate wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. **b:** 50 μ l Vollblut wurden für 30 Minuten mit verschiedenen Zytokinen behandelt. Anschließend wurden 10^6 apoptotische Neutrophile zugegeben und für 60 Minuten inkubiert. Nach der Lyse der Erythrozyten wurde die Phagozytose durch die Neutrophilen-Population durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind Werte aus 3 Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung. *: $p < 0,05$ verglichen mit dem unbehandelten Ansatz.

3.1.7 *In vivo* Phagozytose apoptotischer neutrophiler Granulozyten durch Neutrophile im Mausmodell

Alle bisher durchgeführten Versuche zur Phagozytose apoptotischer Zellen durch vitale Neutrophile wurden *in vitro* durchgeführt. Um die Relevanz dieses Prozesses *in vivo* zu belegen, sollte ein Mausmodell zur Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile etabliert werden. Hierfür wurde das subkutane *Air-Pouch*-Modell gewählt, bei dem im Rückenbereich der Maus durch Injektion von Luft ein nahezu zellfreies Kompartiment geschaffen wird. In diesen *Air-Pouch* können dann verschiedene Substanzen injiziert werden, um Zellen anzulocken.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst entweder 0,5 μ g MIP-2, ein murines Analog zum humanen IL-8, das chemotaktisch auf Neutrophile wirkt, oder 1 μ g LPS, das eine lokale Entzündungsreaktion auslöst und damit indirekt Neutrophile anlockt, oder PBS als Kontrolle in den *Air-Pouch* injiziert. Nach 4 Stunden wurden die eingewanderten Zellen

gewonnen, gezählt und der Anteil von Neutrophilen durch Oberflächenfärbung für Ly-6G durchflusszytometrisch analysiert.

4 Stunden nach der Injektion von PBS waren weniger als 300.000 Zellen im *Air-Pouch* vorhanden (Abb. 20a). Unter 10 % dieser Zellen waren Neutrophile (Abb. 20b). Nach der Injektion von MIP-2 waren nach 4 Stunden etwa 1×10^6 Zellen im *Air-Pouch* vorhanden, von denen über 50 % Neutrophile waren (Abb. 20b). Wurde LPS in den *Air-Pouch* injiziert, betrug die Zellzahl nach 4 Stunden $1-2 \times 10^6$. Über 75 % dieser Zellen waren Neutrophile. In allen Versuchen handelte es sich bei den nicht als Neutrophile identifizierten Zellen zum größten Teil um Makrophagen. Da die Injektion von LPS am stärksten die Einwanderung von Zellen in den *Air-Pouch* induzierte und diese Zellen auch den größten Anteil an Neutrophilen hatten, wurde in den meisten folgenden Versuchen $1 \mu\text{g}$ LPS zur Attraktion von Neutrophilen verwendet.

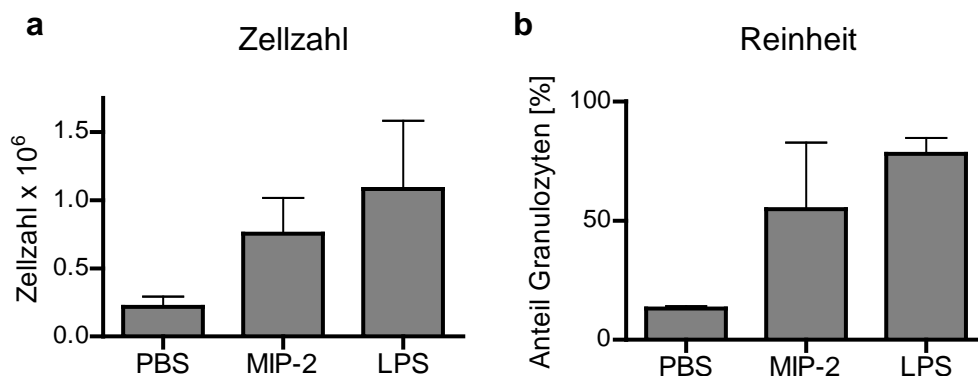


Abb. 20: Anzahl und Neutrophilen-Anteil der in den *Air-Pouch* eingewanderten Zellen. PBS, $0,5 \mu\text{g}$ MIP-2 oder $1 \mu\text{g}$ LPS wurden an Tag 6 in den *Air-Pouch* einer C57BL/6 Maus injiziert und die eingewanderten Zellen nach 4 Stunden analysiert. **a:** Zellzahl im *Air-Pouch* nach 4 Stunden. **b:** Anteil der Neutrophilen (Ly6G⁺) im *Air-Pouch* nach 4 Stunden nach durchflusszytometrischer Analyse. Gezeigt sind Daten aus 3 Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung.

3.1.7.1 Die Phagozytose apoptotischer Zellen ist *in vivo* bereits nach 10 Minuten nachweisbar

Als nächstes wurde in den *Air-Pouch* an Tag 6 zunächst 1 μg LPS injiziert, um Neutrophile anzulocken. Dann wurden 4×10^6 durch UV-Behandlung generierte apoptotische humane Neutrophile injiziert, die mit PKH-67 gefärbt worden waren. Nach 10 und 30 Minuten wurden die Zellen aus dem *Air-Pouch* gespült, gezählt, die Neutrophilen mit anti-Ly-6G Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Während nach 10 Minuten noch etwa 5×10^6 Zellen aus dem *Air-Pouch* gespült werden konnten, waren nach 30 Minuten nur noch etwa 1×10^6 Zellen vorhanden, was auf eine Beseitigung der apoptotischen Zellen hinweist (Abb. 21).

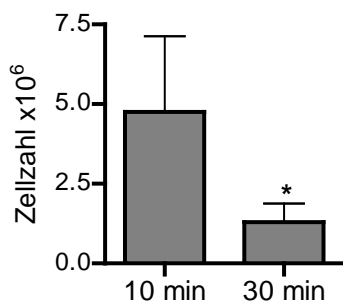


Abb. 21: Beseitigung apoptotischer Zellen im Maus *Air-Pouch*. 4×10^6 PKH-67 markierte apoptotische Neutrophile wurden an Tag 6 in den Maus *Air-Pouch* injiziert. Zuvor waren Neutrophile durch Injektion von 1 μg LPS für 4 Stunden angelockt worden. Nach 10 oder 30 Minuten wurden alle Zellen aus dem *Air-Pouch* gespült und gezählt. $n=3$, $^*p<0,05$.

Die durchflusszytometrische Analyse der Phagozytoserate ergab, dass nach 10 Minuten schon über die Hälfte der murinen Neutrophilen apoptotisches Material aufgenommen hatten (Abb. 22a). Nach 30 Minuten hatten fast alle Neutrophile apoptotisches Material phagozytiert. Nach 10 Minuten waren in den Diff-Quick gefärbten Präparaten und fluoreszenzmikroskopisch in vielen Zellen größere Einschlüsse zu erkennen (Abb. 22b,c). In den Präparaten für die Fluoreszenzmikroskopie war nach 30 Minuten zu erkennen, dass diese Einschlüsse in den meisten Fällen kleiner und zahlreicher in den Zellen vorhanden waren. In den Diff-Quick gefärbten Präparaten waren die Einschlüsse zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar.

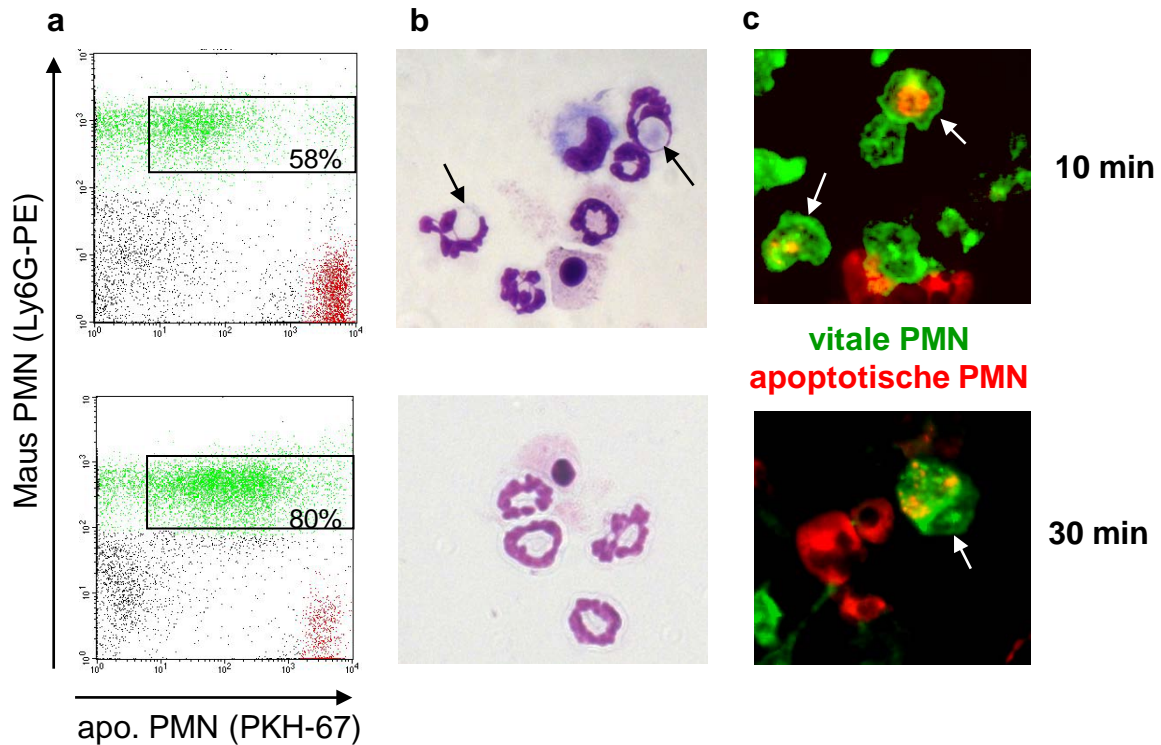


Abb. 22: Phagozytose im Maus Air-Pouch. 1 μg LPS wurde an Tag 6 in einen Maus Air-Pouch injiziert. Nach 4 Stunden wurden 4×10^6 PKH-67 gefärbte, apoptotische (apo.) humane Neutrophile (PMN) injiziert. Nach 10 oder 30 Minuten wurden die Zellen aus dem Air-Pouch gespült. Die murinen Neutrophilen wurden mit anti-Ly-6G Antikörper gefärbt. Die Zellen wurden **a:** durchflusszytometrisch, **b:** nach Diff-Quick Färbung mikroskopisch oder **c:** fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Pfeile: vitale Neutrophile mit internalisiertem apoptotischen Material.

3.1.7.2 LPS verstärkt *in vivo* die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen *in vivo* stattfindet, sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit bakterieller Stimuli auch hier die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile erhöhen kann. Hierfür wurden wie zuvor beschrieben mithilfe von 0,5 μg MIP-2 oder 1 μg LPS Neutrophile in einen Tag-6 Air-Pouch rekrutiert. Nach 4 Stunden wurden 4×10^6 PKH-67 gefärbte apoptotische humane Neutrophile in den Air-Pouch injiziert. Nach 20 Minuten wurden die Zellen aus dem Air-Pouch gespült. Murine neutrophile Granulozyten wurden mit anti-Ly-6G Antikörpern, die Makrophagen mit anti-F4/80 Antikörpern angefärbt. Anschließend wurde die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile und Makrophagen durchflusszytometrisch analysiert.

Durch LPS in den *Air-Pouch* rekrutierte murine Neutrophilen hatten zu über 90 % apoptotisches Material aufgenommen (Abb. 23a). Wurde die Einwanderung der Neutrophilen hingegen nicht-entzündlich durch MIP-2 induziert, lag die Phagozytoserate signifikant niedriger bei durchschnittlich 50 % (Abb. 23a). Die eingewanderten Makrophagen zeigten unabhängig davon, ob die Rekrutierung der Zellen durch LPS oder MIP-2 induziert worden war, eine relativ hohe Phagozytoserate von etwa 80 % (Abb. 23b).

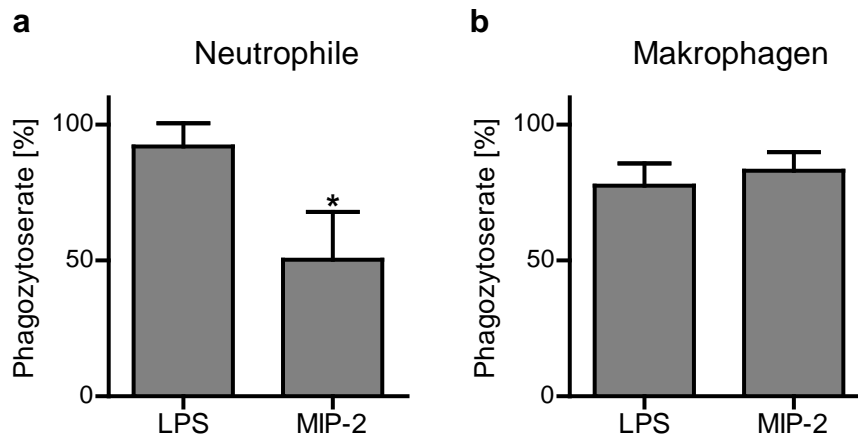


Abb. 23: LPS stimuliert *in vivo* die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile. 0,5 μ g MIP-2 oder 1 μ g LPS wurden an Tag 6 in einen Maus *Air-Pouch* injiziert. Nach 4 Stunden wurden 4×10^6 PKH-67 gefärbte, apoptotische humane Neutrophile injiziert. Nach 20 Minuten wurden die Zellen aus dem *Air-Pouch* gespült. Die murinen Neutrophilen wurden mit anti-Ly-6G oder die murinen Makrophagen mit anti-F4/80 Antikörpern gefärbt. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert und die Phagozytoserate bestimmt. **a:** Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile. **b:** Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen. * $p < 0,05$; $n = 4$.

3.2 Wirkung von apoptotischen Zellen auf die Signaltransduktion vitaler neutrophiler Granulozyten

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von vitalen und apoptotischen neutrophilen Granulozyten weiter analysiert. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ist bereits bekannt, dass apoptotische Zellen anti-inflammatorisch auf Neutrophile wirken (Esmann et al., 2010). So wird z.B. die fMLP-induzierte ROS-Produktion neutrophiler Granulozyten durch Vorinkubation mit apoptotischen Zellen inhibiert. Neben der inhibitorischen Wirkung auf die ROS-Produktion vermindert die Anwesenheit apoptotischer Zellen auch die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF und IP-10 durch Neutrophile. Die Sekretion von IL-8 wird hingegen in Anwesenheit apoptotischer Zellen erhöht (Esmann et al., 2010). Molekulare Mechanismen, die dem aktivierenden oder inhibitorischen Einfluss apoptotischer Zellen zu Grunde liegen, sind allerdings noch nicht ausreichend verstanden.

3.2.1 Generierung hochreiner apoptotischer Zellen

Um zu untersuchen, welche Signalwege durch apoptotische Zellen induziert oder inhibiert werden, war es zunächst notwendig, reine apoptotische Zellen zu generieren, die selbst inaktiv sind, so dass sie keine Hintergrundsignale verursachen. Die in früheren Versuchen verwendeten, durch UV-Bestrahlung gewonnenen apoptotischen Zellen hatten eine relativ hohe Reinheit von über 70 %. Stimuliert man allerdings 1×10^6 vitale Zellen oder 2×10^6 apoptotische Zellen separat mit $1 \mu\text{M}$ fMLP, lässt sich bei apoptotischen Zellen allein z.B. eine klare Phosphorylierung von Erk1/2 nachweisen (Abb. 24), sodass die Signaltransduktion vitaler und apoptotischer Zellen im Falle einer Co-Inkubation nicht zu unterscheiden wäre.

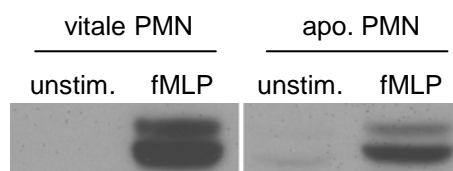


Abb. 24: Apoptotische Neutrophile zeigen fMLP-induzierte Phosphorylierung von Erk1/2. 1×10^6 vitale oder 2×10^6 durch UV-Bestrahlung generierte apoptotische Neutrophile wurden für 5 Minuten mit $1 \mu\text{M}$ fMLP stimuliert oder unstimuliert belassen und die Phosphorylierung von Erk1/2 analysiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 2 durchgeführte Experimente.

Daher wurden für die Signaltransduktionsversuche apoptotische Neutrophile durch Inkubation über Nacht und anschließende Annexin-V MACS-Aufreinigung generiert. Während der Anteil der apoptotischen Zellen nach Inkubation für 16 Stunden bei 50-70 % lag, konnte der Anteil der apoptotischen Zellen durch MACS-Anreicherung auf über 90 % erhöht werden. Der Anteil nekrotischer Zellen lag unter 10 % (Abb. 25).

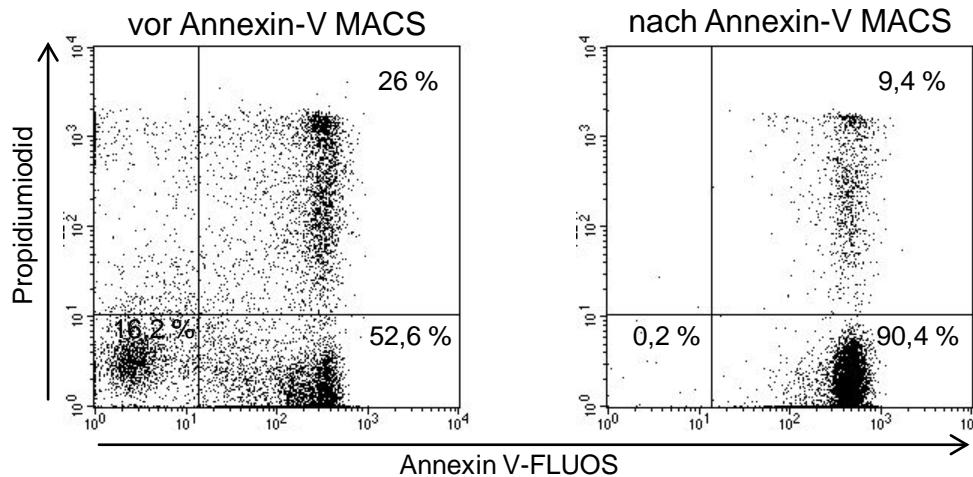


Abb. 25: Anreicherung apoptotischer Neutrophiler mittels magnetischer Zellsortierung (MACS). Neutrophile wurden in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die apoptotischen Zellen mittels Annexin-V MACS angereichert und nach Färbung mit Annexin-V-Fluos und Propidiumiodid durchflusszytometrisch analysiert. **a:** Annexin-Propidiumiodid-Färbung vor der Anreicherung. **b:** Annexin-Propidiumiodid-Färbung nach der Anreicherung. Die Abbildungen sind repräsentativ für mehr als 10 durchgeführte Experimente.

3.2.1.1 Aufgereinigte apoptotische Zellen zeigen keine fMLP-induzierte Signaltransduktion

Als nächstes wurde überprüft, ob die aufgereinigten apoptotischen Zellen auch auf Signaltransduktionsebene inaktiv sind. Dazu wurden 1×10^6 vitale Neutrophile oder 2×10^6 apoptotische Neutrophile für 5 Minuten mit 1 μ M fMLP stimuliert und mit TCA lysiert. Die Phosphorylierung von Erk1/2, p38 und Akt wurde anschließend mittels Western Blot analysiert. Unstimuliert waren alle drei untersuchten Proteine nicht phosphoryliert (Abb. 26). Stimulation mit fMLP induzierte eine starke Phosphorylierung von Erk1/2, p38 und Akt in den vitalen Zellen. In den hochreinen apoptotischen Zellen war hingegen keine Phosphorylierung dieser drei Proteine detektierbar (Abb. 26).

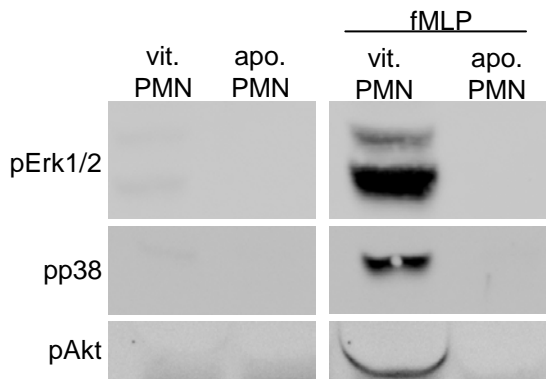


Abb. 26: Aufgereinigte apoptotische Neutrophile zeigen keine fMLP-induzierte Signaltransduktion. 1×10^6 vitale oder 2×10^6 apoptotische Neutrophile wurden für 5 Minuten mit $1 \mu\text{M}$ fMLP stimuliert oder unstimuliert belassen und die Phosphorylierung von Erk1/2, p38 und Akt mittels Western Blot analysiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 5 durchgeführte Experimente.

3.2.1.2 Aufgereinigte apoptotische Zellen produzieren keine reaktiven Sauerstoffspezies und zeigen keine Phagozytoseaktivität

Um zu überprüfen, ob die aufgereinigten apoptotischen Zellen funktional inaktiv sind, wurden sie nun auf ihr Vermögen *Latex-Beads* aufzunehmen und ROS zu produzieren untersucht. Die vitalen Zellen, die nach dem Annexin-V MACS als Negativ-Fraktion gewonnen worden waren und nur noch einen Anteil von 15-20 % apoptotischer Zellen enthielten, wurden mit den hochreinen Annexin-V positiven apoptotischen Zellen verglichen. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingesetzt. Die ROS-Freisetzung wurde nach Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ fMLP für 5 Minuten in Anwesenheit von DHR123 (siehe Abschnitt 2.13.1) durchflusszytometrisch analysiert. Für die Analyse der Phagozytosekapazität wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von 20 % autologem Serum für 30 Minuten mit 100 ng/ml LPS und 100 U/ml IFN- γ stimuliert oder in Medium inkubiert und anschließend die fünffache Menge fluoreszenzmarkierte *Latex-Beads* zugegeben. Nach 30 Minuten wurden Cytospin Präparate angefertigt und mit Diff-Quick gefärbt. Anschließend wurde fluoreszenzmikroskopisch der Anteil von Zellen bestimmt, der *Beads* phagozytiert hatte.

Während die vitalen Zellen nach Stimulation mit fMLP große Mengen an ROS produzierten, befand sich die ROS-Produktion der hochreinen apoptotischen Zellen auf Hintergrund-Niveau (Abb. 27a). Außerdem zeigten die vitalen Zellen bereits unstimuliert im Medium eine Aufnahme von *Latex-Beads* (Abb. 27b). Durch Stimulation mit LPS und IFN- γ wurde die Phagozytoserate verstärkt. Wurden die Versuche in Anwesenheit von autologem Serum durchgeführt, war die Phagozytoserate stark erhöht. Nach zusätzlicher Stimulation mit LPS und IFN- γ hatte fast jede Zelle *Latex-Beads* aufgenommen. Im Gegensatz dazu hatten kaum

Zellen der hochreinen apoptotischen Neutrophilen unstimuliert *Beads* aufgenommen. Auch nach Stimulation mit LPS und IFN- γ und in Gegenwart von autologem Serum war keine Phagozytose detektierbar (Abb. 27b).

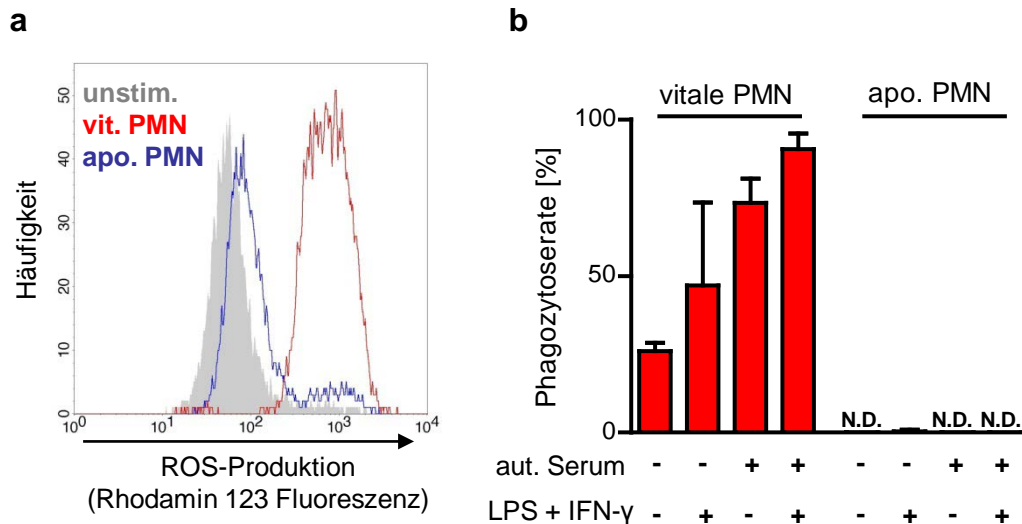


Abb. 27: Aufgereinigte apoptotische Neutrophile sind funktional inaktiv. Über Nacht spontan apoptotisch gewordene Neutrophile (PMN) wurden mittels Annexin-V MACS in lebende und apoptotische Zellen aufgetrennt. **a:** Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS): Beide Fraktionen wurden in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml für 5 Minuten mit $1 \mu\text{M}$ fMLP stimuliert und die Produktion von ROS mittels DHR123 durchflusszytometrisch analysiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 Versuche. **b:** Phagozytose von Latex-*Beads*: Beide Zellpopulationen wurden in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in Medium mit oder ohne 20 % autologem Serum für 30 Minuten mit 100 ng/ml LPS und 100 U/ml Interferon- γ (IFN- γ) vorstimuliert. Dann wurden fluoreszenzmarkierte Latex-*Beads* in fünffacher Konzentration zugegeben und die Phagozytoserate nach 30 Minuten auf Diff-Quick gefärbten Cytospin-Präparaten fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Versuchen. N.D.: nicht detektierbar.

3.2.2 Co-Inkubation von vitalen und apoptotischen Zellen induziert die Aktivierung von Erk1/2 MAP-Kinase

MAP-Kinasen sind an der Phagozytose von Bakterien beteiligt und auch für die Sekretion von Zytokinen wichtig. Es sollte geprüft werden, inwieweit Erk1/2 und p38 durch die Co-Inkubation von vitalen und apoptotischen Zellen aktiviert werden. Hierfür wurden vitale Zellen in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml und apoptotische Zellen in einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml für 60 Minuten in Gegenwart von 30 % autologem Serum vorinkubiert, um Einflüsse von Serum auf die Signaltransduktion zu vermindern.

Anschließend wurden vitale und apoptotische Zellen im Verhältnis 1:2 für 5, 15, 30 und 60 Minuten in Gegenwart von 30 % autologem Serum co-inkubiert und anschließend mit TCA lysiert. Die Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 wurde mittels Western Blot analysiert. Nach 5 Minuten war noch eine schwache, durch die Inkubation mit humanem Serum induzierte, Phosphorylierung von Erk1/2 bei den vitalen Zellen sichtbar. In Gegenwart apoptotischer Zellen war allerdings eine deutliche Aktivierung von Erk1/2 detektierbar. Dieses Signal nahm nach 15 und 30 Minuten ab und war nach 60 Minuten nicht mehr detektierbar. Im Gegensatz dazu war die Phosphorylierung von p38 zu keinem Zeitpunkt nachweisbar (Abb. 28).

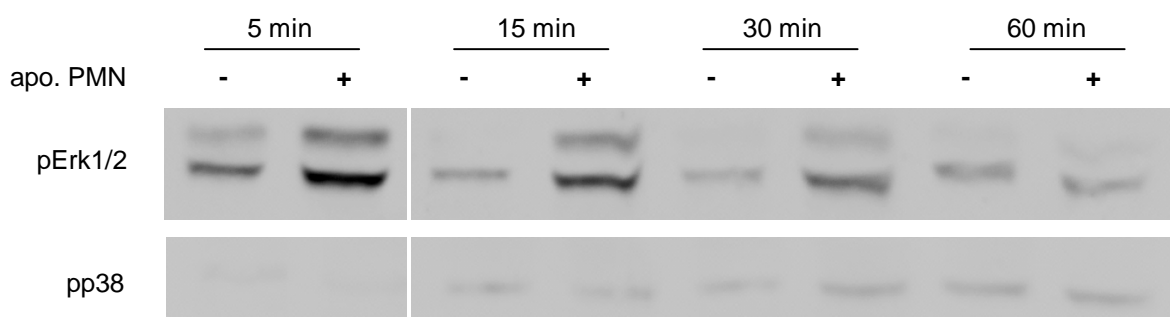


Abb. 28: Co-Inkubation von vitalen und apoptotischen Zellen induziert die Phosphorylierung von Erk1/2. 1×10^6 vitale Neutrophile wurden für 60 Minuten in Gegenwart von 30 % autologem Serum vorinkubiert und anschließend zusammen mit 2×10^6 apoptotischen Neutrophilen für 5, 15, 30 oder 60 Minuten in der Gegenwart von 30 % autologem Serum co-inkubiert. Dann wurden Zelllysate mittels Trichloressigsäure-Fällung gewonnen und die Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 mittels Western Blot analysiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 durchgeführte Versuche.

3.2.3 Die durch apoptotische Zellen induzierte Sekretion von IL-8 ist abhängig vom Komplementfaktor C5a und dem Erk1/2 Signalweg

In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF durch Neutrophile in Anwesenheit apoptotischer Zellen inhibiert wird. Allerdings wird in der Anwesenheit apoptotischer Zellen die Sekretion von Gro-1 α und IL-8 induziert (Esmann et al., 2010). Es ist bekannt, dass MAP-Kinasen, z.B. Erk1/2 an der Zytokinsekretion neutrophiler Granulozyten beteiligt sind (Riedemann et al., 2004). Es sollte daher untersucht werden, welche Signalwege an der Sekretion von IL-8 beteiligt sind. Hierfür wurden vitale Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in Anwesenheit von 30 % autologem Serum vor der Co-Inkubation mit apoptotischen Zellen für 15 Minuten mit verschiedenen Inhibitoren behandelt. Es wurden 25 μ M Wedelolacton, das den Nf- κ B-

Signalweg inhibiert, 10 μM des p38-Inhibitors SB203580 sowie 10 μM des Inhibitors U0126, der den Erk1/2-Signalweg inhibiert, verwendet. Da bekannt ist, dass C5a eine positive Rückkopplung bei der Stimulation von Neutrophilen induzieren kann (Camous et al., 2011), wurden die Zellen in einem anderen Ansatz mit 10 μM eines Antagonisten des C5a-Rezeptors vorbehandelt. Dann wurden apoptotische Zellen im Verhältnis 1:2 zugegeben und nach 5 Stunden die Zellkulturüberstände gewonnen. Die Überstände wurden mittels ELISA auf ihren IL-8 Gehalt untersucht.

Wie bereits zuvor gezeigt werden konnte, induzierten apoptotische Neutrophile eine verstärkte IL-8 Sekretion durch die vitalen Zellen. Diese Verstärkung konnte durch Vorinkubation mit U0126 oder C5aRA, aber nicht durch Wedelolacton oder SB203580 inhibiert werden (Abb. 29).

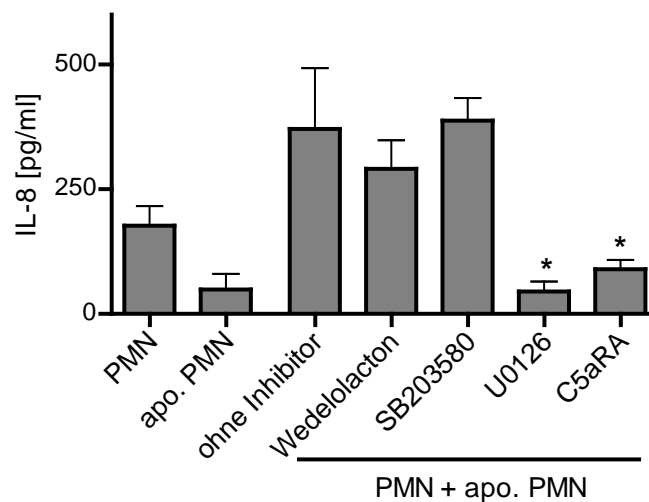


Abb. 29: Abhängigkeit der durch apoptotische Zellen induzierten IL-8 Sekretion Neutrophiler von $\text{Nf-}\kappa\text{B}$, p38, Erk1/2 und C5a. $0,2 \times 10^6$ vitale Neutrophile wurden für 15 Minuten mit 25 μM Wedelolacton, 10 μM SB203580 oder U0126, oder 10 μM eines C5a-Rezeptor-Antagonisten (C5aRA) vorbehandelt. Dann wurden apoptotische Zellen im Verhältnis 1:2 zugegeben und nach 5 Stunden Überstände gewonnen. Die Überstände wurden mittels ELISA auf ihren IL-8 Gehalt analysiert. Abgebildet sind Werte aus 3 Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung. *: $p < 0,05$ verglichen mit der Co-Kultur aus Neutrophilen und apoptotischen Neutrophilen.

3.2.4 MAP-Kinasen werden nicht für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile benötigt

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die detektierte Aktivierung von Erk1/2 für die Phagozytose apoptotischer Zellen notwendig ist. Hierfür wurden 1×10^5 PKH-67-markierte vitale Zellen in Anwesenheit von 30 % autologem Serum für 30 Minuten mit 10 μM U0126,

einem Inhibitor des Erk1/2 Signalweges, 3 μM SB203580, einem p38 Inhibitor, oder 20 μM JNK Inhibitor II vorinkubiert. Anschließend wurden PKH-26-markierte apoptotische Zellen in vierfacher Konzentration zugegeben und nach 90 Minuten die Phagozytoserate durchflusszytometrisch bestimmt.

Wie in vorigen Versuchen betrug die Phagozytose in Anwesenheit von 30 % autologem Serum etwa 20 %. Keiner der drei verwendeten Inhibitoren hatte einen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile (Abb. 30).

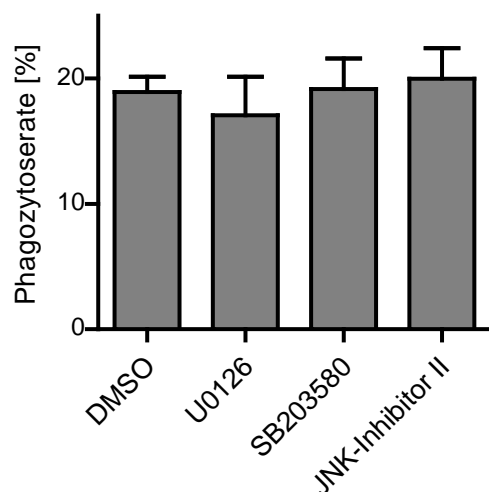


Abb. 30: MAP-Kinasen werden nicht für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile benötigt. 1×10^5 PKH-67-gefärbte vitale Neutrophile wurden für 30 Minuten mit 10 μM U0126, einem Inhibitor des Erk1/2-Signalweges, 3 μM des p38-Inhibitors SB203580 oder 20 μM JNK-Inhibitor II in Anwesenheit von 30 % autologem Serum vorbehandelt. Anschließend wurden 4×10^5 PKH-26-gefärbte apoptotische Zellen zugegeben und nach 90 Minuten die Phagozytoserate durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Experimenten.

3.2.5 Die Anwesenheit apoptotischer Zellen verlängert die Lebensdauer vitaler Neutrophiler

Neutrophile Granulozyten sind kurzlebige Zellen, die im unstimulierten Zustand innerhalb von Stunden in die Apoptose gehen. Werden sie allerdings, z.B. durch pro-inflammatorische Stimuli am Ort einer Entzündung, aktiviert, kann sich ihre Lebensdauer auf mehrere Tage erhöhen (Colotta et al., 1992). Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen eher inaktivierend auf Neutrophile wirkt. Ob die Anwesenheit apoptotischer Zellen die Lebensdauer vitaler Neutrophiler trotzdem erhöht, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Dafür wurden vitale Neutrophile allein oder zusammen mit apoptotischen Zellen im Verhältnis 1:2 oder 1:4 in RPMI Kompletmedium ohne autologes Serum oder mit 10 %, 20 % oder 30 % autologem Serum für 18 oder 42 Stunden co-inkubiert. Die Gesamtzellkonzentration betrug stets 5×10^6 Zellen/ml. Zur Unterscheidung der

apoptotischen und vitalen Zellen wurden die apoptotischen Zellen mit PKH-26 gefärbt. So konnte nach Annexin-V-Fluos Färbung durchflusszytometrisch der Anteil vitaler Zellen analysiert werden, indem die stark rot fluoreszierenden apoptotischen Zellen von der Analyse ausgeschlossen wurden.

Nach 18 Stunden waren ohne Zusatz von humanem Serum nur noch etwa 30 % der untersuchten Zellen vital (Abb. 31). In Anwesenheit von apoptotischen Zellen im Verhältnis 1:2 erhöhte sich der Anteil lebender Zellen signifikant. In dem Ansatz mit 10 % Serum waren nach 18 Stunden noch über die Hälfte der Zellen vital. Durch Co-Inkubation mit apoptotischen Zellen stieg der Anteil lebender Zellen auf über 90 %. In den Ansätzen, die über 10 % Serum enthielten, waren noch fast alle Zellen lebendig (Abb. 31). Nach 42 Stunden waren in den Ansätzen ohne Serum fast alle Zellen apoptotisch oder nekrotisch (Abb. 31). War 10 % autologes Serum im Medium vorhanden, waren noch etwa 50 % der untersuchten Zellen vital. Co-Inkubation mit apoptotischen Zellen steigerte den Anteil lebender Zellen signifikant. Enthielt das Medium 20 % oder 30 % Serum, waren nach 42 Stunden noch über 75 % der untersuchten Zellen lebendig. Auch hier steigerte die Anwesenheit apoptotischer Zellen signifikant den Anteil lebendiger Zellen (Abb. 31).

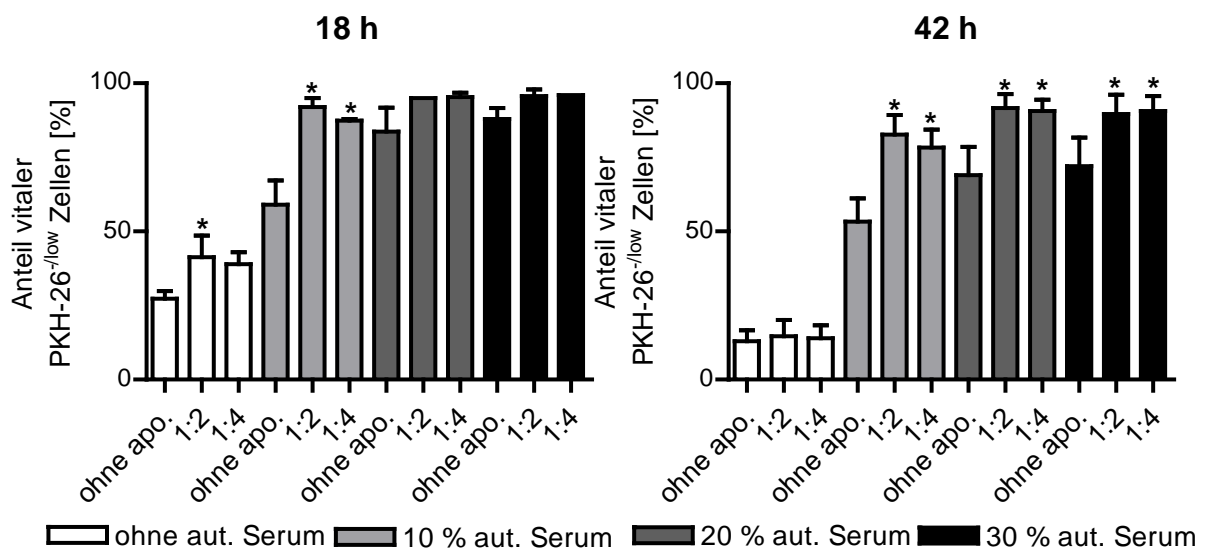


Abb. 31: Modulation der spontanen Apoptose neutrophiler Granulozyten in der Anwesenheit von apoptotischen Neutrophilen. Vitale Neutrophile wurden allein oder zusammen mit PKH-26 gefärbten apoptotischen Neutrophilen im Verhältnis 1:2 oder 1:4 in Anwesenheit von 0 %, 10 %, 20 % oder 30 % autologem Serum inkubiert. Es wurden insgesamt 1×10^5 Zellen je Ansatz in 100 μ l Volumen eingesetzt. Nach 18 und 42 Stunden wurde der Anteil der vitalen Zellen durch Ausschlussfärbung mit Annexin-V-Fluos analysiert. Die stark PKH-26 positiven apoptotischen Neutrophilen wurden von der Analyse ausgeschlossen und nur die PKH-26 negativen oder schwach positiven (low) Zellen analysiert. Es sind Daten aus 3 Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. *: $p < 0,05$ verglichen mit vitalen Neutrophilen allein.

3.2.6 Auswirkungen apoptotischer Zellen auf die fMLP-induzierte Signaltransduktion in Neutrophilen

In Anwesenheit apoptotischer Zellen ist die Freisetzung der pro-entzündlichen Zytokine TNF und IP-10 durch vitale Neutrophile reduziert. Außerdem wird die fMLP induzierte Produktion von ROS inhibiert, wenn Neutrophile mit apoptotischen Zellen co-inkubiert werden (Esmann et al., 2010). Aus diesem Grund sollte mithilfe der generierten hochreinen apoptotischen Neutrophilen überprüft werden, welchen Einfluss die Co-Inkubation von vitalen und apoptotischen Zellen auf die fMLP-induzierte Signaltransduktion hat. Dafür wurden vitale Neutrophile in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml und apoptotische Neutrophile in einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml zunächst für 60 Minuten in Gegenwart von 30 % autologem Serum inkubiert. Anschließend wurden vitale und apoptotische Zellen für 60 Minuten im Verhältnis 1:2 in Gegenwart von 30 % autologem Serum co-inkubiert. Dann wurden die Zellen für 5 Minuten mit $0,5 \mu\text{M}$ fMLP stimuliert und anschließend mit TCA lysiert. Die Phosphorylierung von Erk1/2, p38 und Akt wurde mittels Western Blot analysiert.

Während unstimuliert keine Aktivierung der untersuchten Moleküle nachweisbar war, induzierte Stimulation mit fMLP eine starke Phosphorylierung von Erk1/2, p38 und Akt in vitalen Neutrophilen. Wie bereits zuvor gezeigt, induzierte die Stimulation keine Signaltransduktion in apoptotischen Zellen. Waren die vitalen Zellen mit apoptotischen Zellen co-inkubiert worden, war die Phosphorylierung von Erk1/2 leicht erhöht. Die Phosphorylierung von p38 und Akt wurde hingegen tendenziell vermindert (Abb. 32).

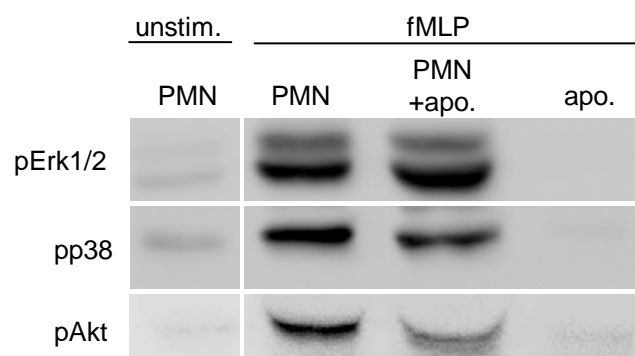


Abb. 32: Apoptotische Zellen vermindern die fMLP-induzierte Phosphorylierung von p38 und Akt in vitalen Zellen. Vitale und apoptotische Zellen wurden getrennt voneinander für 60 Minuten in einer Konzentration von 2×10^6 bzw. 4×10^6 Zellen/ml in Anwesenheit von 30 % autologem Serum vorinkubiert. Anschließend wurden vitale und apoptotische Zellen allein und in einem Verhältnis von 1:2 für 30 Minuten zusammen inkubiert. Dann wurden die Ansätze mit $0,5 \mu\text{M}$ fMLP stimuliert und nach Trichloressigsäure-Fällung die Phosphorylierung von Erk1/2, p38 und Akt mittels Western Blot analysiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 5 durchgeführte Experimente.

3.3 Modulation der Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten durch Methylprednisolon

Glucocorticoide wie Methylprednisolon (MP) werden in der Klinik regelmäßig für die Therapie von Autoimmunerkrankungen, wie z.B. dem bullösen Pemphigoid (BP) angewendet. Allerdings sind die genauen Effekte und Zielzellen dieser Therapie noch nicht vollständig verstanden. So ist z.B. ein Apoptose induzierender Effekt auf Lymphozyten weitgehend akzeptiert (Wyllie, 1980). Der Effekt auf das angeborene Immunsystem ist aber noch nicht ausführlich untersucht. Jedoch ist gerade der Effekt auf die angeborene Immunität bei der topischen Therapie von Hauterkrankungen wichtig, da der Wirkstoff hier direkt auf der betroffenen Haut und nicht systemisch verabreicht wird. Daher wurde in dieser Arbeit die Wirkung von MP auf neutrophile Granulozyten untersucht. In Vorversuchen innerhalb der Arbeitsgruppe hatten sich bei 1 μ M und 1 mM MP Effekte auf Neutrophile gezeigt, daher wurden vorerst diese Konzentrationen verwendet.

3.3.1 Methylprednisolon inhibiert die spontane Apoptose neutrophiler Granulozyten

Zunächst wurde ein möglicher toxischer Effekt von MP auf Neutrophile untersucht. Dafür wurden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml mit 1 μ M und 1 mM MP für 3 oder 18 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen mithilfe einer Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung nach 3 und 18 Stunden durchflusszytometrisch analysiert.

Nach 3 Stunden waren noch durchschnittlich 89 % der unbehandelten Zellen vital. Keine der verwendeten MP Dosen hatte einen Einfluss auf den Anteil lebender Zellen (Abb. 33). Nach Inkubation für 18 Stunden war der größte Teil der unbehandelten Neutrophilen in die spontane Apoptose gegangen, es waren im Durchschnitt nur noch 29 % der Zellen vital. Wurden die Neutrophilen mit 1 μ M MP behandelt, zeigte sich eine tendenzielle Steigerung des Anteils vitaler Zellen auf durchschnittlich 58 %. Die Behandlung mit 1 mM MP erhöhte den Anteil lebender Zellen signifikant auf durchschnittlich 72 % (Abb. 33). Der Anteil nekrotischer Zellen lag in allen Ansätzen bei unter 5 % (ohne Abbildung).

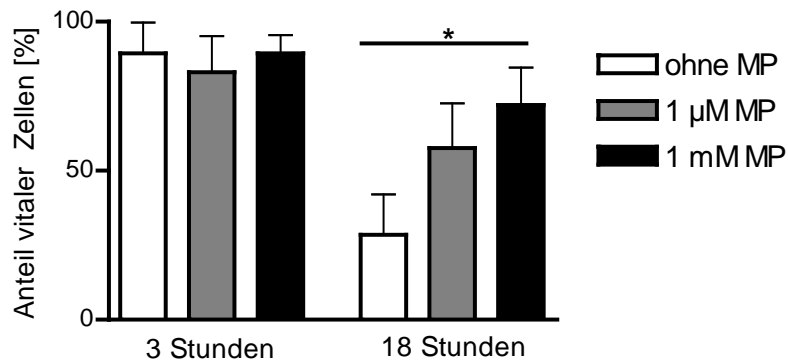


Abb. 33: Methylprednisolon (MP) verlängert die Lebensdauer neutrophiler Granulozyten. Neutrophile wurden für 3 bzw. 18 Stunden mit 1 µM oder 1 mM MP oder in Medium ohne MP inkubiert und der Anteil vitaler Zellen durchflusszytometrisch mithilfe von Annexin-V-Fluos bestimmt. Dargestellt sind Daten aus 3 Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung. *:p<0,05.

3.3.2 Methylprednisolon inhibiert die IL-8 Sekretion neutrophiler Granulozyten

Interleukin-8 ist ein Zytokin, das nach Stimulation von Neutrophilen in großem Umfang sekretiert wird. Dadurch wird *in vivo* die Entzündungsreaktion durch Rekrutierung neuer Neutrophiler aus der Blutbahn verstärkt. Die Sekretion von IL-8 hat damit für pathogene Entzündungsreaktionen direkt Bedeutung, ist darüber hinaus *in vitro* aber auch ein guter Marker für die Aktivierbarkeit neutrophiler Granulozyten. Daher wurde als erster Indikator für die Wirkung von MP auf Neutrophile die IL-8-Sekretion untersucht.

Es wurden humane Neutrophile in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml mit 1 µM oder 1 mM MP für 3 Stunden vorinkubiert und dann für 3 oder 18 Stunden mit LPS stimuliert. Die Überstände wurden mittels ELISA auf ihren IL-8-Gehalt untersucht. Unstimulierte Neutrophile sekretierten sowohl unbehandelt als auch mit MP behandelt kaum IL-8. Nach 3 Stunden setzten mit LPS stimulierte Neutrophile IL-8 frei. 1 µM MP hatte keinen signifikanten Effekt, es inhibierte lediglich tendenziell die IL-8-Freisetzung. Die Vorinkubation mit 1 mM MP senkte die IL-8 Konzentration in den Überständen signifikant (Abb. 34). Nach 18 Stunden waren deutlich höhere IL-8-Konzentrationen in den Überständen detektierbar als nach 3 Stunden. Nach 18 Stunden senkte die Vorinkubation sowohl mit 1 µM als auch mit 1 mM MP die IL-8-Konzentration signifikant (Abb. 34).

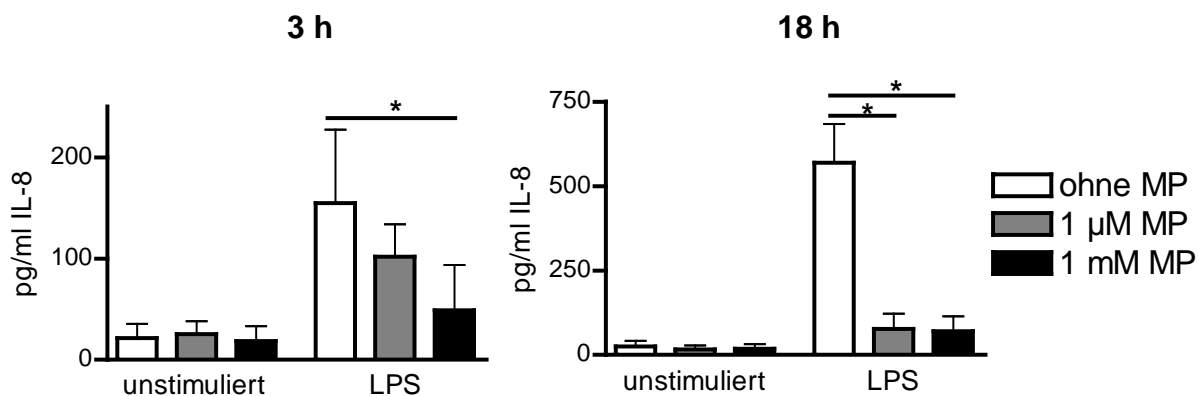


Abb. 34: Methylprednisolon (MP) inhibiert die LPS-induzierte Sekretion von Interleukin 8 (IL-8). Humane neutrophile Granulozyten (5×10^6 Zellen/ml) wurden für 3 Stunden mit Methylprednisolon (MP, $1 \mu\text{M}$: graue Balken, 1mM : schwarze Balken) vorbehandelt und anschließend für 3 Stunden oder 18 Stunden mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung aus 4 Experimenten. *: $p < 0,05$.

3.3.3 Methylprednisolon hemmt die fMLP-induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies neutrophiler Granulozyten

Um den Einfluss von Methylprednisolon auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu untersuchen, wurde das Modell des fMLP-induzierten oxidativen *Burst* gewählt. fMLP ist gut als Modellstimulus geeignet, da es zuverlässig die Produktion von ROS induziert und die zu Grunde liegende Signaltransduktion gut verstanden ist (Chen et al., 2003; Dewas et al., 2000). Da in den bisherigen Versuchen zu frühen Zeitpunkten lediglich 1 mM MP signifikante Effekte zeigte, wurden die folgenden *In-vitro*-Versuche mit dieser Konzentration durchgeführt.

Für die Untersuchung der ROS-Freisetzung wurden Neutrophile für 3 Stunden mit 1 mM MP behandelt und anschließend für 5 Minuten mit 200 nM fMLP in Anwesenheit von DHR123 stimuliert. Durch die Behandlung der Neutrophilen mit MP konnte die fMLP-induzierte Freisetzung von ROS vollständig inhibiert werden (Abb. 35).

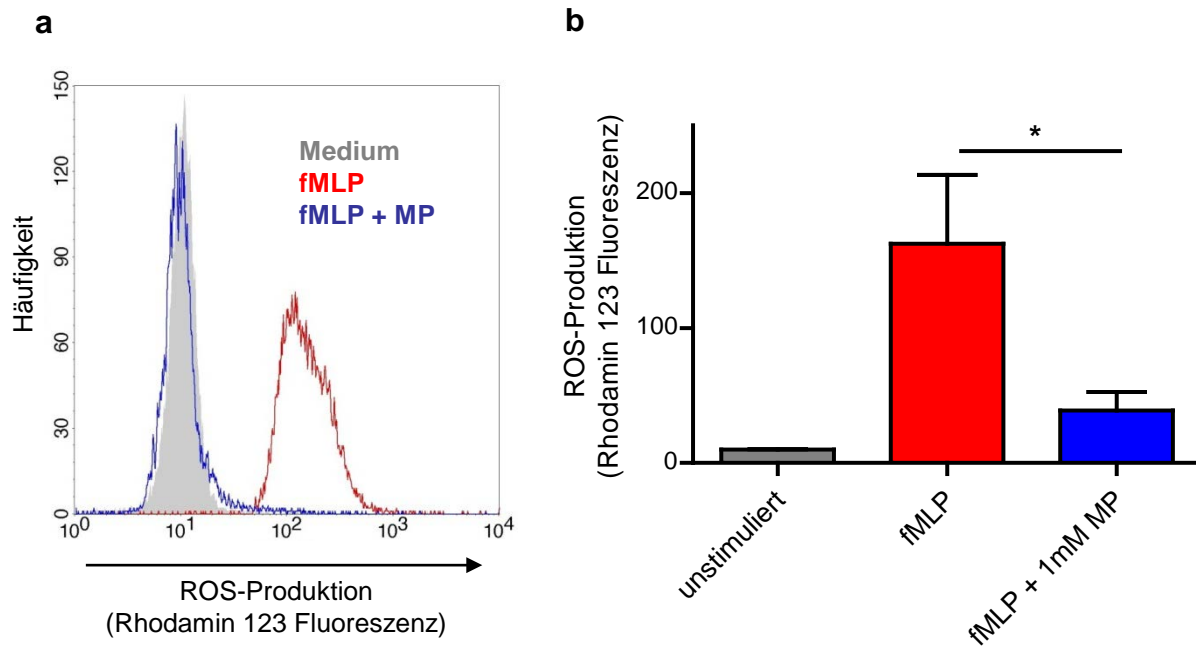


Abb. 35: Methylprednisolon (MP) inhibiert die fMLP-induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Neutrophile wurden mit 1 mM MP für 3 Stunden vorinkubiert und anschließend mit 200 nM fMLP für 5 Minuten in der Anwesenheit von DHR123 stimuliert. **a:** repräsentativer Histogrammplot. **b:** Daten aus 4 Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung. *: $p < 0,05$.

3.3.4 Die fMLP- induzierte Signaltransduktion wird durch Methylprednisolon inhibiert

Da für die fMLP induzierte ROS-Produktion besonders Erk1/2 und p38 sowie Akt wichtig sind (Chen et al., 2003; El Benna et al., 1996), die in ihrer Funktion als Kinasen für die Phosphorylierung der p47phox-Untereinheit der NADPH Oxidase verantwortlich sind, wurde der Einfluss von MP auf das Vorhandensein der aktiven, phosphorylierten Form dieser Moleküle untersucht.

Hierfür wurden Neutrophile in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml für 3 Stunden mit 1 mM MP vorinkubiert und anschließend für 5 Minuten mit 2 nM, 20 nM oder 200 nM fMLP stimuliert. Die Phosphorylierung von Erk1/2, p38 und Akt wurde mittels Western Blot nachgewiesen.

Es war zu erkennen, dass Methylprednisolon dosisabhängig die Phosphorylierung von Akt inhibiert. Bei Stimulation mit 2 nM fMLP war auch eine Inhibierung der Phosphorylierung von Erk1/2 erkennbar. Die Phosphorylierung von p38 wurde in fMLP stimulierten Zellen

hingegen leicht verstärkt (Abb. 36). MP allein induzierte keine Signaltransduktion (ohne Abbildung, Vergleich Abb. 41b).

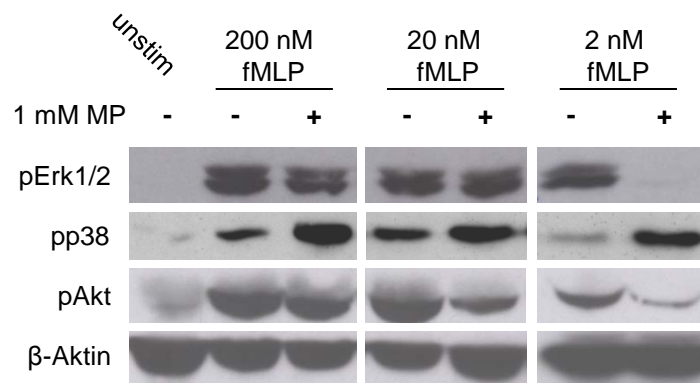


Abb. 36: Methylprednisolon (MP) inhibiert die fMLP-induzierte Signaltransduktion. Neutrophile wurden für 3 Stunden mit 1 mM MP vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 nM, 20 nM oder 200 nM fMLP für 5 Minuten stimuliert. Dann wurden die Zellen lysiert und die Phosphorylierung von Erk1/2, p38 und Akt mittels Western Blot analysiert. Die abgebildeten Blots sind repräsentativ für 2 durchgeführte Experimente.

3.3.5 Methylprednisolon hemmt den Gewebeschaden in einem *ex vivo* Modell des bullösen Pemphigoid

In der Klinik für Dermatologie und Venerologie des UK-SH, Campus Lübeck wurden Experimente durchgeführt, in denen der Effekt von Methylprednisolon auf Autoantikörper induzierte Gewebeschädigung an einem Modell des bullösen Pemphigoid getestet wurde (Dissertation M. Hänsel). Hierbei handelte es sich um ein *ex vivo* Gefrierschnitt-Modell, bei dem Gefrierschnitte humaner Vorhaut mit BP-Patientenserum inkubiert wurden. Anschließend wurden Blut-Leukozyten, die einen hohen Anteil an Neutrophilen enthalten, hinzugegeben. Nach 4 Stunden konnte nach dem Waschen der Schnitte eine dermal-epidermale Separation nachgewiesen werden. Diese Gewebeschädigung wurde signifikant inhibiert, wenn die Zellen zuvor mit 1 mM Methylprednisolon inkubiert worden waren. 1 nM und 1 μ M MP zeigten keinen signifikanten Effekt (Abb. 37).

Da zuvor nachgewiesen worden war, dass für den *ex vivo* Gewebeschaden neutrophile Elastase und reaktive Sauerstoffspezies verantwortlich sind (Chiriatic et al., 2007; Shimanovich et al., 2004), ist davon auszugehen, dass Methylprednisolon in diesem Modell direkt neutrophile Granulozyten beeinflusst.

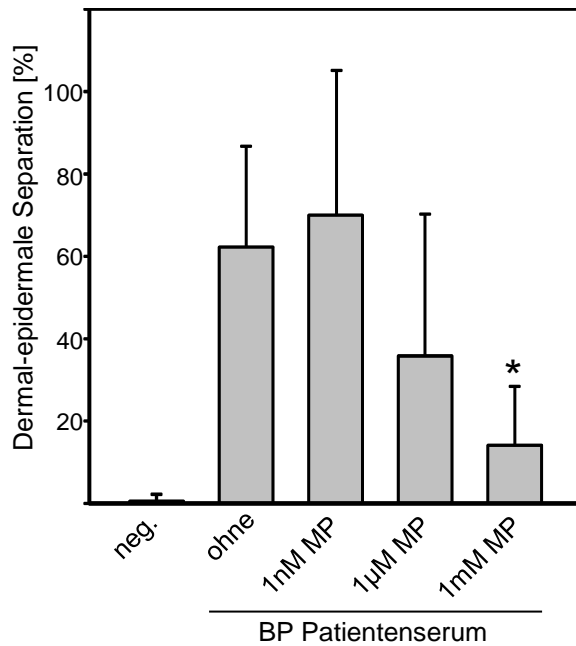


Abb. 37: Inhibierung der dermal-epidermalen Separation *ex vivo* durch Methylprednisolon (MP). Leukozyten (hauptsächlich Neutrophile) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von MP vorinkubiert und für 3 Stunden auf Gefrierschnitte humaner Vorhaut, die mit BP Patientenserum inkubiert worden waren, gegeben. Der Anteil der abgelösten Epidermis wurde blind ausgewertet und ist als Anteil an der Gesamtlänge der dermal-epidermalen Bindung angegeben. Es sind Daten aus 4 Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. *: $p < 0,05$ verglichen mit Zellen ohne MP-Behandlung. (Daten M. Hänsel, mit freundlicher Erlaubnis)

3.3.6 Methylprednisolon inhibiert die Immunkomplex-induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch Neutrophile

Da die dermal-epidermale Spaltbildung im BP-Gefrierschnitt-Modell abhängig von reaktiven Sauerstoffspezies ist, wurde der Effekt von MP auf den Immunkomplex (IC)-induzierten oxidativen *Burst* untersucht. Neutrophile wurden für 3 Stunden mit 1 mM MP vorinkubiert, anschließend für 45 Minuten mit IC (15 µg/ml mCol17a + 0,5 mg/ml anti-mCol17a IgG) stimuliert und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies mithilfe von DHR123 durchflusszytometrisch analysiert.

Die Stimulation der Neutrophilen mit IC induzierte eine starke Produktion von ROS. Durch die Vorbehandlung mit Methylprednisolon konnte die ROS-Produktion signifikant inhibiert werden (Abb. 38).

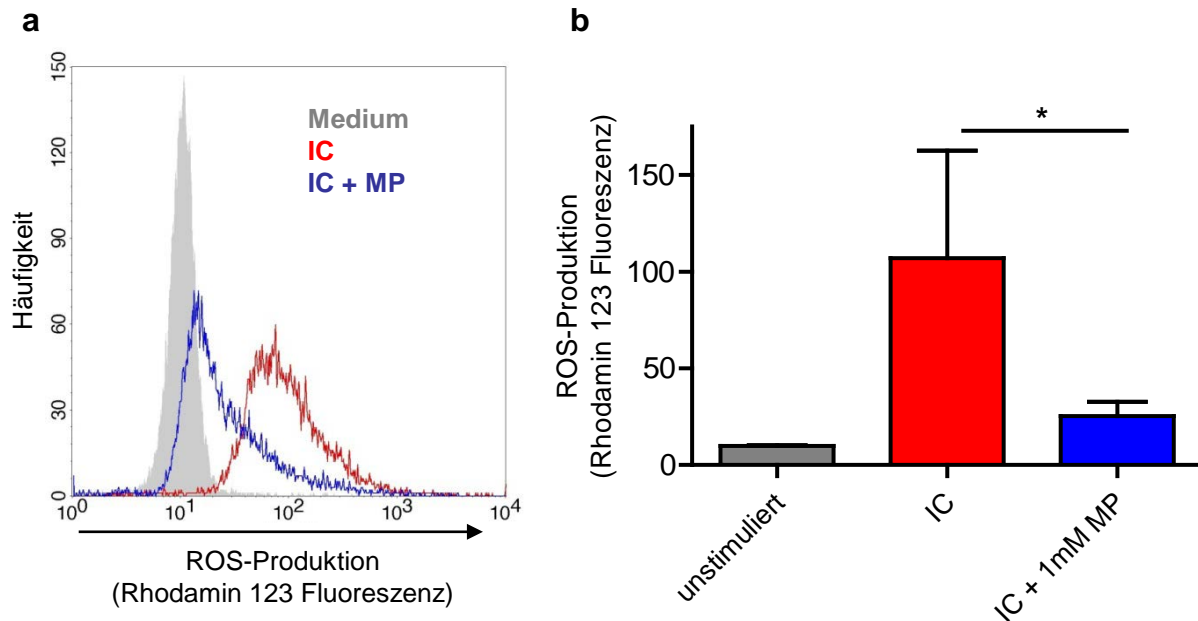


Abb. 38: Methyprednisolon (MP) inhibiert die Immunkomplex(IC)-induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Neutrophile wurden mit 1 mM MP für 3 Stunden vorinkubiert und anschließend mit IC (15 $\mu\text{g/ml}$ mCol17a + 0,5 mg/ml anti-mCol17a IgG) für 45 Minuten in der Anwesenheit von DHR123 stimuliert. **a:** repräsentativer Histogrammplot. **b:** Daten aus 4 Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung. *: $p < 0,05$.

3.3.7 Methyprednisolon inhibiert die Immunkomplex-induzierte Degranulation neutrophiler Granulozyten

Neben ROS sind im BP-Gefrierschnitt-Modell auch Proteasen, wie neutrophile Elastase, die von Neutrophilen freigesetzt werden, an der Gewebeschädigung beteiligt (Shimanovich et al., 2004). Neutrophile Granula enthalten eine Vielzahl an Proteasen, die gewebeschädigend wirken können. Neben diesen Proteasen sind aber auch Oberflächenmoleküle, z.B. CD66b, in den Granula enthalten. Bei der Degranulierung gelangen diese Moleküle an die Oberfläche der Zelle und können damit als Marker für die Degranulierung genutzt werden.

In den Versuchen dieser Arbeit wurde CD66b als Degranulierungsmarker genutzt. Neutrophile Granulozyten (5×10^6 Zellen/ml) wurden für 3 Stunden mit 1 mM MP vorinkubiert und anschließend mit IC (15 $\mu\text{g/ml}$ mCol17a + 0,5 mg/ml anti-mCol17a IgG) für 45 Minuten stimuliert. Dann wurde die Oberflächenexpression von CD66b mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Immunkomplexe induzierten eine starke Erhöhung der Oberflächenexpression von CD66b. Durch die Vorbehandlung mit MP konnte diese Erhöhung signifikant inhibiert werden (Abb. 39).

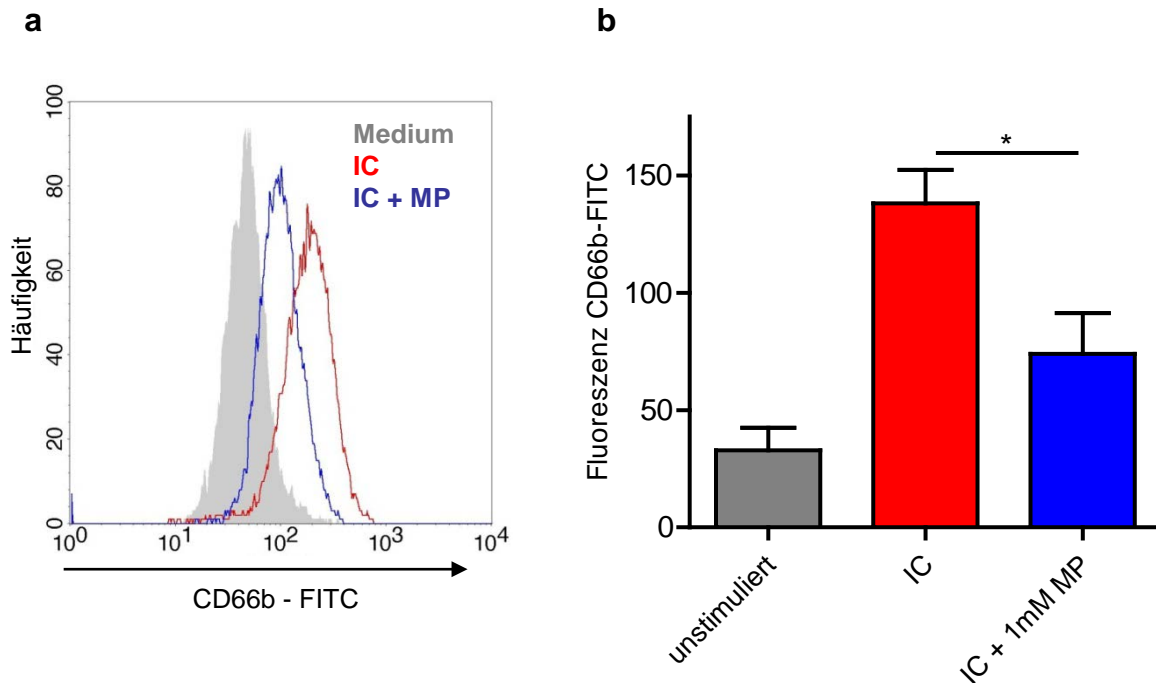


Abb. 39: Methylprednisolon (MP) inhibiert die Immunkomplex(IC)-induzierte Degranulation. Neutrophile wurden mit 1 mM MP für 3 Stunden vorinkubiert und anschließend mit IC (15 µg/ml mCol17a + 0,5 mg/ml anti-mCol17a IgG) für 45 Minuten stimuliert. Dann wurde die CD66b-Expression durchflusszytometrisch analysiert. **a:** repräsentativer Histogrammplot. **b:** Daten aus 5 Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung. *: $p < 0,05$.

3.3.8 Immunkomplex-induzierte Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 MAPK sowie Akt wird durch Methylprednisolon inhibiert

Nachdem bereits festgestellt worden war, dass Methylprednisolon die fMLP-induzierte Phosphorylierung von Erk1/2 und Akt inhibieren kann (Abb. 36), wurden die zuvor betrachteten Moleküle Erk1/2, p38 und Akt auch nach IC-Stimulation auf ihre Aktivierung untersucht. Sowohl MAP-Kinasen als auch Akt werden in der Fc-Rezeptor induzierten Aktivierung von Neutrophilen phosphoryliert (Nimmerjahn und Ravetch, 2008).

Für die Analyse der Wirkung von MP auf die IC-induzierten Signaltransduktion wurden 3×10^6 Neutrophile für 3 Stunden mit 1 mM Methylprednisolon vorinkubiert und anschließend mit IC (15 µg/ml mCol17a + 0,5 mg/ml anti-mCol17a IgG) für 5 Minuten

stimuliert. Die Phosphorylierung von Erk1/2, p38 und Akt wurde mittels Western Blot analysiert.

Wie erwartet war eine Phosphorylierung aller drei Moleküle nach Stimulation mit IC detektierbar. Die Vorinkubation mit Methylprednisolon inhibierte die Phosphorylierung von Erk1/2, p38 und Akt (Abb. 40).

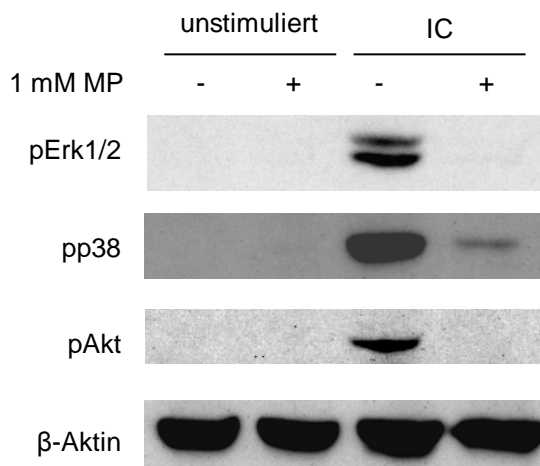


Abb. 40: Methylprednisolon (MP) inhibiert die Immunkomplex(IC)-induzierte Signaltransduktion in Neutrophilen. 3×10^6 Neutrophile wurden für 3 Stunden mit 1 mM MP vorinkubiert und dann für 5 Minuten mit IC (15 μ g/ml mCol17a + 0,5 mg/ml anti-mCol17a IgG) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die Signaltransduktion mittels Western Blot analysiert. Die gezeigten Blots sind repräsentativ für 3 durchgeführte Experimente.

3.3.8.1 Hinweise auf die Rolle von MAP-Kinase-Phosphatase-1 bei der Methylprednisolon induzierten Inhibition von MAP-Kinasen

Ein wichtiger Mechanismus bei der Regulation von MAP-Kinasen ist die Dephosphorylierung dieser Moleküle durch Phosphatasen. Es ist bekannt, dass Glucocorticoide sowohl MAP-Kinase-Phosphatase-1 (MKP-1) stabilisieren, als auch deren Expression induzieren können (Kassel et al., 2001). Um die Expression von MKP-1 in MP behandelten Zellen zu untersuchen, wurden 3×10^6 Neutrophile für 1-4 Stunden mit 1 mM Methylprednisolon inkubiert und anschließend lysiert. Die Expression von MKP-1 wurde mittels Western Blot analysiert. Es zeigte sich, dass in unbehandelten Zellen eine Basisexpression von MKP-1 vorhanden war, die sich im Laufe der Inkubation mit MP erhöhte (Abb. 41a).

Um einen Einfluss von MKP-1 auf die verminderte Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 zu untersuchen, wurden Neutrophile vor der Behandlung mit MP für 15 Minuten mit 10 μ M NSC 95397 (NSC), einem Inhibitor für MKP-1 (Vogt et al., 2008), oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle vorbehandelt und dann für 3 Stunden mit 1 mM Methylprednisolon

inkubiert. Anschließend wurden die Neutrophilen für 5 Minuten mit IC (15 $\mu\text{g/ml}$ mCol17a + 0,5 mg/ml anti-mCol17a IgG) stimuliert. Die Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 wurde mittels Western Blot analysiert.

Die mit NSC vorbehandelten Zellen zeigten bereits unstimuliert eine starke Phosphorylierung von Erk1/2 und p38. Dieser Effekt wurde durch anschließende Inkubation mit Methylprednisolon abgeschwächt (Abb. 41b). In stimulierten Zellen verstärkte die NSC-Vorbehandlung die IC-induzierte Phosphorylierung von Erk1/2, aber nicht p38. Durch Behandlung mit Methylprednisolon konnte, wie bereits in 3.3.8 gezeigt, die IC-induzierte Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 inhibiert werden. Diese Inhibierung konnte durch Vorinkubation mit NSC verhindert werden (Abb. 41b).

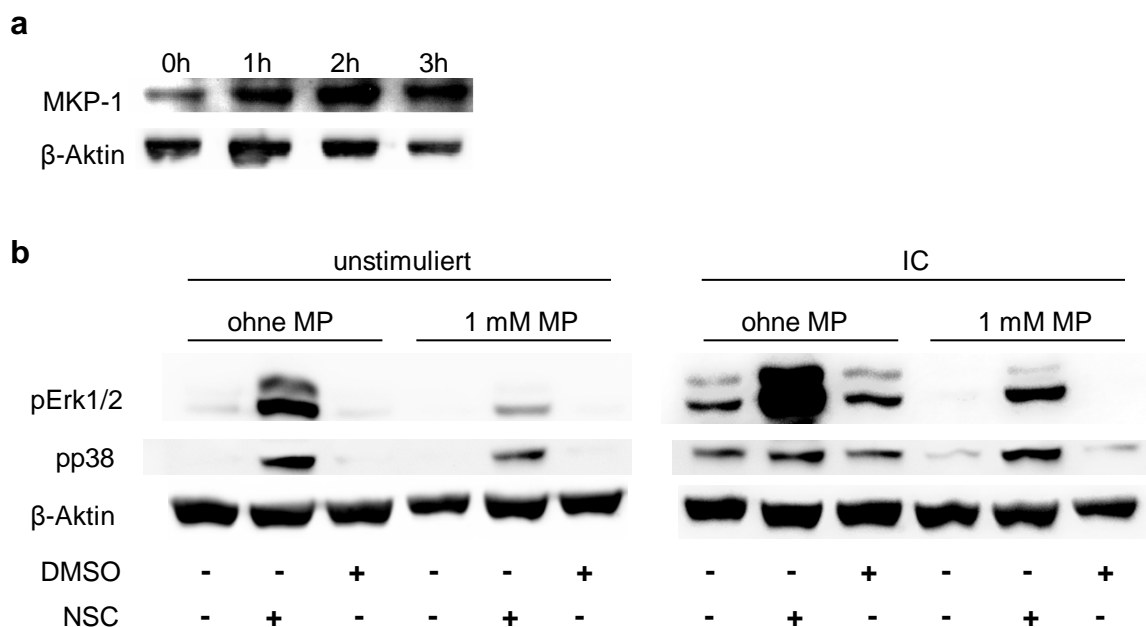


Abb. 41: a: Methylprednisolon (MP) stabilisiert MAP-Kinase-Phosphatase-1 (MKP-1) in Neutrophilen. Humane Neutrophile wurden für 1-3 Stunden mit 1 mM MP inkubiert und lysiert. Die Expression von MKP-1 wurde mittels Western Blot analysiert. **b: Inhibierung von MKP-1 wirkt der MP-induzierten Verminderung der p38 und Erk Phosphorylierung entgegen.** Neutrophile wurden für 15 Minuten mit 10 μM NSC 95397 (NSC) oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle vorinkubiert und anschließend für 3 Stunden mit MP inkubiert. Dann wurden die Zellen mit IC (15 $\mu\text{g/ml}$ mCol17a + 0,5 mg/ml anti-mCol17a IgG) stimuliert. Die Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 wurde mittels Western Blot analysiert. Die abgebildeten Blots sind repräsentativ für 2 durchgeführte Experimente.

3.3.9 Einfluss der pharmakologischen Inhibition von Erk1/2, p38 und Akt auf die ROS-Produktion und Degranulierung neutrophiler Granulozyten

Um zu prüfen, ob die Inhibierung der untersuchten Moleküle ausreichend ist, um die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Degranulierung von Neutrophilen zu vermindern, wurden pharmakologische Inhibitoren verwendet. Neutrophile wurden mit 10 μ M U0126, einem Inhibitor des Erk1/2 Signalweges, 3 μ M SB203580, einem p38 Inhibitor oder 9 μ M Akt Inhibitor VIII bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 3 Stunden vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Immunkomplexen (15 μ g/ml mCol17a + 0,5 mg/ml anti-mCol17a IgG) stimuliert und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und die Degranulierung wie zuvor untersucht.

Die Inhibierung von Erk1/2 und p38 sowie Akt bewirkte eine signifikante Verminderung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Abb. 42a). Die IC-induzierte Degranulierung der Neutrophilen wurde hingegen nur nach Vorinkubation mit p38-Inhibitor signifikant vermindert (Abb. 42b).

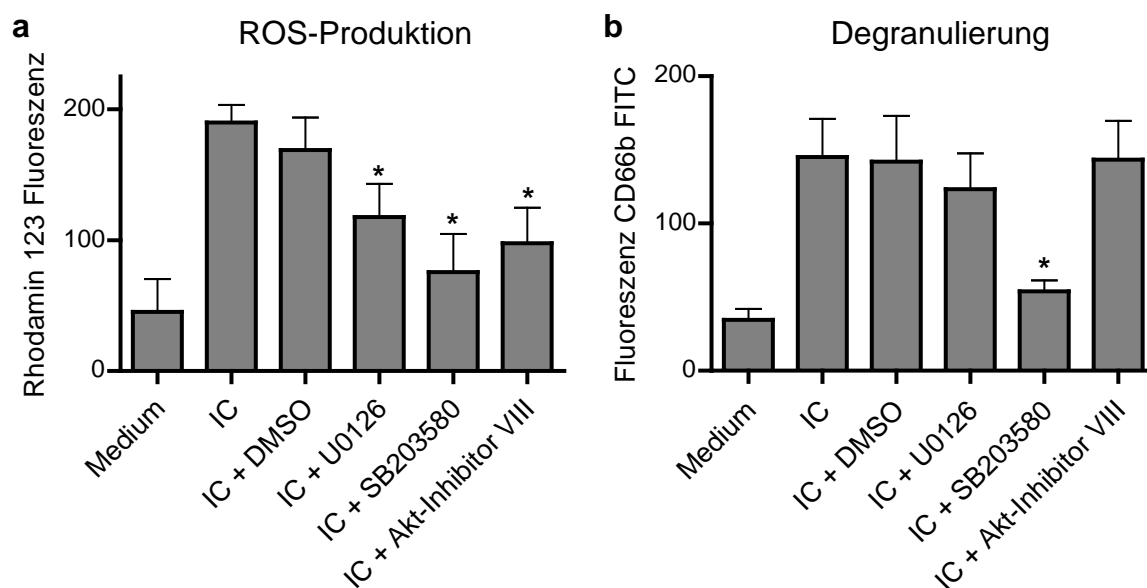


Abb. 42: Inhibition von Immunkomplex(IC)-induzierter ROS-Produktion und Degranulierung durch pharmakologische Inhibitoren. Neutrophile wurden für 3 Stunden mit 10 μ M U0126, 3 μ M SB203580, 9 μ M Akt-Inhibitor VIII oder 0,1 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle vorinkubiert und anschließend mit Immunkomplexen (15 μ g/ml mCol17a + 0,5 mg/ml anti-mCol17a IgG) stimuliert. Dann wurde die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mit DHR123 sowie die Degranulierung mittels CD66b-Oberflächenfärbung durchflusszytometrisch analysiert. **a:** Produktion von ROS. **b:** Degranulierung. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung aus 4 Experimenten. *:p<0,05 verglichen mit der DMSO-Lösungsmittelkontrolle.

3.3.10 Inhibition von Erk1/2, p38 oder Akt verhindert Gewebeschaden in dem *Ex-Vivo*-Gefrierschnitt-Modell des bullösen Pemphigoid

Um zu bestätigen, dass die *in vitro* beobachteten Effekte auch diejenigen sind, die im BP-Gefrierschnitt-Modell beobachtet worden waren, wurden in der Klinik für Dermatologie und Venerologie (Dissertation M. Hänsel) die verwendeten Inhibitoren U0126, SB203580 und der Akt-Inhibitor VIII auf ihre Wirkung in diesem Modell untersucht.

Die durch Patientenserum induzierte dermal-epidermale Separation lag in allen Versuchen bei 50 - 70 %. Von den Inhibitoren verminderte jegliche getestete Konzentration des Erk1/2-Signalweg-Inhibitors U0126 (5-15 μM) die Separation signifikant. Der Akt-Inhibitor VIII inhibierte in einer Konzentration von 6 μM und 9 μM den Gewebeschaden signifikant. SB203580 verminderte in einer Konzentration von 6 μM signifikant die Beschädigung der dermal-epidermalen Bindung (Abb. 43).

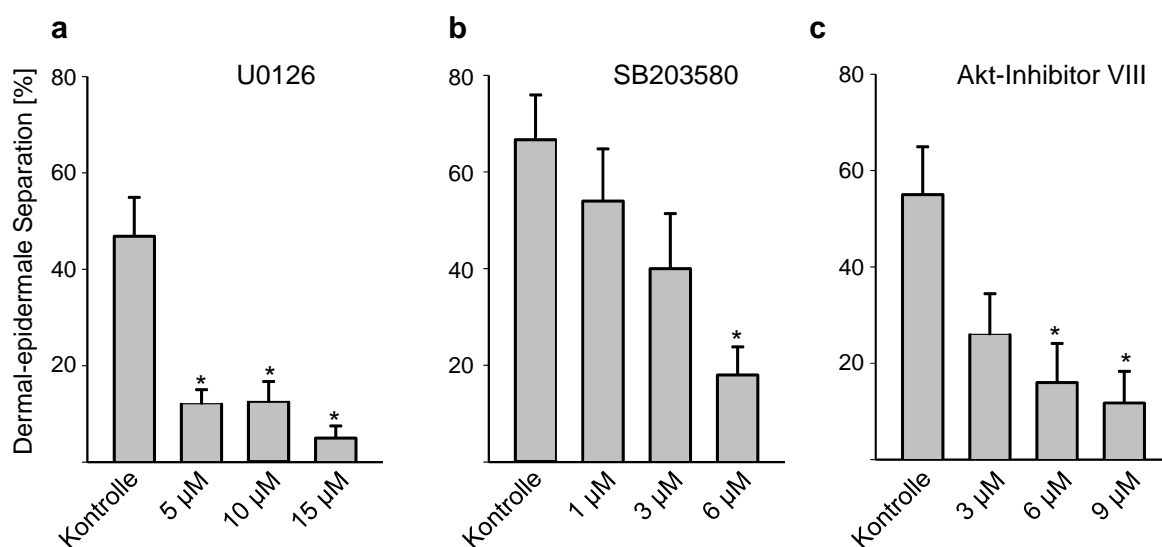


Abb. 43: Inhibition der dermal-epidermalen Separation im *Ex-Vivo*-BP-Gefrierschnitt-Modell durch pharmakologische Inhibitoren. Leukozyten (hauptsächlich Neutrophile) wurden mit verschiedenen Dosen U0126, SB203580 oder Akt-Inhibitor VIII vorbehandelt und anschließend für 3 Stunden auf humane Vorhaut gegeben, die mit BP-Patientenseren inkubiert worden war. Der Anteil der abgelösten Epidermis wurde geblindet ausgewertet und ist als Anteil an der Gesamtlänge der dermal-epidermalen Bindung angegeben. **a:** U0126, **b:** SB203580, **c:** Akt-Inhibitor VIII. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 5 Versuchen. *: $p < 0,05$ verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle. (Daten M. Hänsel, mit freundlicher Erlaubnis)

4 Diskussion

4.1 Komplementfaktoren sind entscheidend für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch vitale Neutrophile

Erst kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass nicht nur Makrophagen und dendritische Zellen, sondern auch neutrophile Granulozyten apoptotische Neutrophile phagozytieren können. Dieser Phagozytoseprozess durch Neutrophile unterscheidet sich aber von dem bei dendritischen Zellen und Makrophagen insofern, als dass hitzelabile Serumfaktoren erforderlich sind (Esmann et al., 2010). Wichtige hitzelabile Faktoren des Serums sind unter anderem die Bestandteile des Komplementsystems. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass fötales Kälberserum nicht für die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Neutrophile ausreichend ist und dass die Komplementfaktoren C1q, C3 und C5 wichtig für den Phagozytoseprozess sind, wobei C3 den stärksten Einfluss hatte.

Es ist bereits bekannt, dass die Komplementfaktoren iC3b, ein Spaltprodukt von C3, sowie C1q wichtig für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen und dendritische Zellen sind (Fraser et al., 2009; Takizawa et al., 1996). Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern diese Aussage nun auch auf neutrophile Granulozyten. C1q kann direkt an apoptotische Zellen binden (Korb und Ahearn, 1997) und so deren Aufnahme durch Makrophagen induzieren (Ogden et al., 2001). Auch die nachfolgende Anlagerung von C3b, das dann zu iC3b umgesetzt wird, kann durch C1q initiiert werden (Fraser et al., 2009). Die Anlagerung von C3b an die apoptotischen Zellen kann hierbei nicht nur in Abhängigkeit von C1q erfolgen, sondern auch durch das Komplement-assoziierte Protein Properdin induziert werden (Kemper et al., 2008). Da C3 der Faktor ist, der in der höchsten Konzentration in humanem Serum vorkommt, ist es wahrscheinlich, dass der größte Teil der Phagozytose apoptotischer Zellen von C3-Spaltprodukten abhängig ist. Diese Hypothese wird darüber hinaus von der Beobachtung gestützt, dass fötales Kälberserum nicht ausreicht, um die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Neutrophile zu induzieren. Fötales Serum enthält nur 1-3 % der Menge an C1, die in adultem bovinen Serum enthalten ist und nicht detektierbare Mengen von C3 (Triglia und Linscott, 1980). Der Befund, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen in C5-defizientem Medium vermindert ist, war zunächst überraschend, da nicht bekannt ist, dass Spaltprodukte von C5 die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen oder dendritische Zellen modulieren können. Allerdings kann C5a, das kleinere Spaltprodukt von

C5, stimulatorisch auf Neutrophile wirken (Ehrenguber et al., 1994) und so eventuell die Aufnahme apoptotischer Zellen erhöhen.

Eine andere Beobachtung war, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen dosisabhängig durch EDTA hemmbar ist. Über die Abhängigkeit des Phagozytoseprozesses von zweiwertigen Ionen wie Calcium, die durch EDTA chelatiert werden, gibt es widersprüchliche Berichte. Für die serumabhängige Phagozytose von *Mycobacterium tuberculosis* durch Neutrophile ist kein extrazelluläres Calcium erforderlich (Majeed et al., 1998). Das Vermögen von bovinen Neutrophilen *Latex-Beads* zu phagozytieren ist allerdings vermindert, wenn EDTA als Antikoagulationsmittel bei der Blutentnahme verwendet wird (Ducusin et al., 2001). Eine andere Studie zeigt, dass extrazelluläres Calcium für die Aufnahme von apoptotischem Material durch dendritische Zellen, aber nicht durch Makrophagen benötigt wird (Rubartelli et al., 1997). Die Abhängigkeit von Calcium ist wahrscheinlich auf eine Änderung der Konformation von Mac-1, einem Bestandteil der Komplementrezeptoren 3 und 4, die iC3b binden, in der Abwesenheit von Calcium zurückzuführen (Graham und Brown, 1991). Bei Makrophagen wird die Phagozytose apoptotischer Zellen außerdem über eine Reihe von Scavenger-Rezeptoren wie z.B. CD36 vermittelt (Savill et al., 1992). Dieser Rezeptor ist nicht von Calcium abhängig und auch für die Phosphatidylserin-induzierte Phagozytose apoptotischer Zellen mitverantwortlich (Fadok et al., 1998b). Da Neutrophile diese Rezeptoren nicht besitzen (Peiser et al., 2002), scheinen sie auf Komplement-Rezeptoren zur Erkennung apoptotischer Zellen angewiesen zu sein.

Für den Phagozytoseprozess ist auch die Remodellierung des Aktin-Zytoskelettes erforderlich. Ein wichtiges Molekül bei der Komplementrezeptor-vermittelten Phagozytose ist hierfür die kleine GTPase Rac1. Mithilfe pharmakologischer Inhibitoren wurde bestätigt, dass Rac1 an der Aufnahme apoptotischer Zellen durch Neutrophile beteiligt ist. Rac1 ist allerdings auch für die Aufnahme von durch Antikörper opsonierten Bakterien, die über FcγR erkannt werden, wichtig (Lowell, 2006). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass Antikörper unspezifisch an der Oberfläche apoptotischer Neutrophiler binden und so die FcγR-vermittelte Phagozytose induzieren, wurden pharmakologisch auch die Kinasen Syk und Kinasen aus der Src-Familie inhibiert, die nach Ligation von FcγR aktiviert werden. Das Ergebnis, dass die Inhibierung von Src-Kinasen oder Syk keinen Einfluss auf die Aufnahme apoptotischer Zellen hat, weist darauf hin, dass FcγR nicht an der Aufnahme apoptotischer Zellen durch Neutrophile beteiligt sind.

Zusammengefasst lässt sich schlussfolgern, dass Komplementrezeptoren ausgesprochen wichtig für die Erkennung apoptotischer Zellen durch Neutrophile sind. Die neutrophilen Granulozyten erkennen apoptotische Zellen Calcium-abhängig über die Komplementfaktoren C1q und iC3b, die sich auf der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen anlagern. Die anschließende Aufnahme des apoptotischen Materials erfolgt dann unter Remodellierung des Zytoskelettes in Abhängigkeit von Rac1.

4.2 Pro-entzündliche Stimuli verstärken die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile

In infiziertem Gewebe gibt es eine Vielzahl mikrobieller Stimuli. Viele von ihnen werden auch von Toll-Like-Rezeptoren erkannt, über die die eingewanderten Zellen des Immunsystems aktiviert werden. Auch pro-entzündliche Zytokine, die im Gewebe sekretiert werden, modulieren die Aktivität der anwesenden Zellen. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie TLR-abhängige Stimuli und verschiedene Zytokine das Vermögen von Neutrophilen, apoptotische Zellen zu phagozytieren, modulieren können. Es konnte gezeigt werden, dass Liganden für TLR 1/2 (Pam3CSK4), TLR 2/6 (Malp-2), TLR 4 (LPS), TLR 7,8 (R848) und TLR 9 (ODN 2006) die Aufnahme apoptotischer Zellen durch isolierte Neutrophile verstärken. Liganden für TLR 3 (Poly I:C) und TLR 5 (Flagellin) zeigten keinen Effekt. Von den getesteten Zytokinen erhöhten TNF und GM-CSF, aber nicht IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17 oder M-CSF die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile. Alle verwendeten Stimuli wurden außerdem in einem Vollblut-Modell getestet. In diesem war die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Neutrophile unstimuliert bereits deutlich höher, als bei isolierten Neutrophilen. Im Vollblutmodell bestätigten sich weitgehend die Tendenzen aus den Experimenten mit isolierten Neutrophilen. Allerdings erhöhte hier auch Poly I:C die Phagozytoserate, während R848 und ODN 2006 keinen signifikanten Effekt zeigten. Von den getesteten Zytokinen erhöhte lediglich TNF die Phagozytoserate signifikant, GM-CSF-stimulierte Neutrophile im Vollblut zeigten allerdings eine deutlich, wenn auch nicht signifikant, erhöhte Phagozytoserate.

Es ist bekannt, dass Aktivierung von TLR 2/6 und 4 die Funktionen von Neutrophilen, darunter auch die Phagozytose, verstärken kann (Hayashi et al., 2003; Wilde et al., 2007). Außerdem kann auch die Ligation von TLR 1/2 durch Pam3CSK4 (Wilde et al., 2007) und TLR7 oder 8 durch R848 (Hayashi et al., 2003) die Phagozytosekapazität von Neutrophilen erhöhen. Liganden für TLR 9 wie CpG-Oligonukleotide können die Phagozytose von Latex-*Beads* durch Neutrophile (Hayashi et al., 2003) und die Aufnahme von apoptotischen Zellen durch Makrophagen stimulieren (Wang et al., 2009). Der Befund, dass Flagellin die Phagozytose nicht stimuliert, kann damit begründet werden, dass Flagellin nur schwach stimulierend auf Neutrophile wirkt, auch wenn die Phagozytose von Latex-*Beads* durch Stimulation mit Flagellin gesteigert werden kann (Hayashi et al., 2003). Dass Poly I:C Neutrophile nicht für die Aufnahme apoptotischer Zellen stimuliert, kann durch die Abwesenheit von TLR 3 auf Neutrophilen erklärt werden (Hayashi et al., 2003). Im Vollblut

verstärkte Poly I:C allerdings die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile. Hier zeigt sich, dass Interaktionen mit anderen Zellen wichtig sind, um das volle Potential von Neutrophilen, apoptotische Zellen aufzunehmen, zu aktivieren. So sind sicherlich auch in entzündetem Gewebe Interaktionen mit anderen Zellen, wie den Gewebsmakrophagen, wichtig für die vollständige Aktivierung der Neutrophilen. Vermutlich sind somit auch andere Zellen des Blutes, wie Monozyten, dafür verantwortlich, dass die Phagozytoserate im Vollblut deutlich höher lag als mit Neutrophilen allein. Tatsächlich sind Monozyten durch TLR3-Liganden stimulierbar und eine wichtige Quelle für TNF in Poly I:C stimuliertem Vollblut (Rosas-Ballina et al., 2009). TNF und GM-CSF stimulieren die Fc γ R-vermittelte Phagozytose in Neutrophilen (Moxey-Mims et al., 1991) und zeigten auch in dieser Arbeit stimulierenden Einfluss auf die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Neutrophile. Die meisten anderen getesteten Zytokine blieben allerdings ohne Effekt. IL-1 β , IL-2 und IL-6 können die Phagozytose von Bakterien durch neutrophile Granulozyten beeinflussen (Pechkovsky et al., 1996). Es wurde außerdem bereits gezeigt, dass IL-10, ein klassisches anti-inflammatorisches Zytokin, die Fc γ R-vermittelte Phagozytose von Bakterien durch Neutrophile inhibiert (Laichalk et al., 1996). Allerdings wurde ebenfalls gezeigt, dass IL-10 die Aufnahme apoptotischer Neutrophiler durch Makrophagen positiv beeinflusst (Michlewska et al., 2009). IL-17 ist ein wichtiges Zytokin, das indirekt die Rekrutierung von Neutrophilen induziert. Selbst beeinflusst IL-17 Neutrophile nicht, da Neutrophile die C-Untereinheit des IL-17-Rezeptors nicht exprimieren (Pelletier et al., 2010). Eventuell ist für einige der getesteten Zytokine, deren Rezeptoren durch Neutrophile exprimiert werden, außerdem eine Co-Stimulation durch andere Zytokine oder TLR nötig, damit sie ihren Effekt entfalten. So reagieren Neutrophile erst nach der durch GM-CSF induzierten verstärkten Expression des IL-2-Rezeptors auf der Zelloberfläche auf die Stimulation mit IL-2 (Girard et al., 1995). Auch andere Zytokine wie IFN- γ benötigen eine Co-Stimulation durch LPS oder TNF, um z.B. die Produktion von IP-10 in Neutrophilen zu induzieren (Cassatella et al., 1997). Die Annahme, dass eine Co-Stimulation mit anderen Faktoren notwendig ist, wird auch von der Tatsache gestützt, dass viele Zytokinrezeptoren in den Granula neutrophiler Granulozyten enthalten sind. Sie werden nach Stimulation an die Zellmembran transportiert und erhöhen dadurch die Empfindlichkeit der Neutrophilen für Zytokine (Borregaard et al., 2007). Insgesamt zeigen die Daten dieser Arbeit, dass pro-entzündliche Stimuli, insbesondere TLR-Liganden, TNF und GM-CSF, die am Ort einer Entzündung vorhanden sind, einen wichtigen Beitrag zur Erhöhung des Phagozytose-Vermögens neutrophiler Granulozyten leisten.

4.3 Die Phagozytose apoptotischer Zellen ist *in vivo* ein relevanter Prozess

Da die meisten durchgeführten Versuche zur Phagozytose apoptotischer Zellen *in vitro* durchgeführt worden waren, war es erforderlich die Relevanz der Aufnahme apoptotischer Zellen *in vivo* zu überprüfen. In dieser Arbeit wurde deshalb ein Modell zur Phagozytose apoptotischer Zellen durch murine Neutrophile etabliert. In einen Maus *Air-Pouch* wurden hierfür murine Neutrophile rekrutiert und anschließend apoptotische humane neutrophile Granulozyten injiziert. Dabei hat die Verwendung apoptotischer humaner Neutrophiler klare Vorzüge. Aus ethischer Sicht ist es vorteilhaft, dass keine Mäuse getötet werden müssen, um apoptotische Neutrophile für die Versuche zu gewinnen. Es ist bekannt, dass humane apoptotische Neutrophile im selben Maße durch murine Makrophagen aufgenommen werden wie murine Neutrophile (Fadok et al., 1992). Durch die Verwendung humaner apoptotischer Zellen konnten außerdem die murinen Neutrophilen im *Air-Pouch* einfach durch fluoreszenzmarkierte Ly-6G-Antikörper markiert werden, die humane Zellen nicht binden. Außerdem ist die Isolierung humaner Neutrophiler aus dem Blut weniger aufwendig als die Isolierung muriner Neutrophiler aus dem Knochenmark und kann so einfacher parallel zu der Vorbereitung der *Air-Pouch*-Versuche durchgeführt werden.

In den durchgeführten Versuchen hatten die murinen Neutrophilen bereits nach 10 Minuten zu über 50 % apoptotisches Material aufgenommen. Nach 30 Minuten hatten über 75 % der murinen Neutrophilen apoptotische Zellen phagozytiert. Somit konnte bestätigt werden, dass die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Neutrophile *in vivo* möglich ist. Dass die Phagozytose bereits nach 10 Minuten nachweisbar ist, deutet auf eine wichtige Rolle von Neutrophilen in der Beseitigung apoptotischer Zellen hin. Gestärkt wird diese Theorie von anderen Arbeiten, in denen die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Neutrophile in GM-CSF behandelten Karzinom-Patienten (Galati et al., 2000) und in der Lunge LPS-behandelter Mäusen (Rydell-Tormanen et al., 2006) beschrieben wurde.

Neutrophile, die durch LPS in den *Air-Pouch* rekrutiert worden waren, nahmen zu einem deutlich höheren Anteil apoptotisches Material auf als Neutrophile, die nach Injektion von MIP-1 in den *Air-Pouch* eingewandert waren. Hier bestätigte sich, dass in einem Umfeld, in dem bakterielle Stimuli wie LPS vorhanden sind, Neutrophile stärker apoptotische Zellen phagozytieren. Dies festigt die anderen Ergebnisse dieser Arbeit, in denen verschiedene TLR-Liganden die Aufnahme apoptotischer Zellen durch humane Neutrophile stimulierten. Allerdings war dieser Unterschied bei den in den *Air-Pouch* eingewanderten Makrophagen

nicht nachweisbar, was bestätigt, dass Makrophagen auch unstimuliert ein hohes Phagozytosevermögen haben und wahrscheinlich zu späteren Zeitpunkten der Entzündung entscheidend für die Beseitigung apoptotischer Neutrophiler sind. Allerdings ist davon auszugehen, dass Neutrophile in der initialen Phase der Entzündung, in der nur wenige Makrophagen, aber eine große Anzahl neutrophiler Granulozyten im Gewebe vorhanden sind, einen wichtigen Beitrag zur Beseitigung apoptotischer Zellen leisten.

4.4 Gegensätzliche Regulierung von Erk1/2 sowie Akt und p38 durch apoptotische Zellen

Um genauere Einblicke in die Prozesse innerhalb der vitalen Neutrophilen während der Phagozytose apoptotischer Zellen zu erhalten, wurden hochreine apoptotische Neutrophile generiert, die selbst keine Signaltransduktion zeigten. Der Kontakt von apoptotischen und vitalen Zellen induzierte die Aktivierung von Erk1/2, aber nicht p38 MAPK in vitalen Neutrophilen. Allerdings hatte die Inhibierung beider Signalwege keinen Einfluss auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die durch apoptotische Zellen induzierte Sekretion von IL-8, die bereits zuvor beschrieben worden war (Esmann et al., 2010), abhängig von Erk1/2 MAPK und C5a, aber unabhängig von p38 MAPK und Nf- κ B ist. Zudem wurde nachgewiesen, dass die Anwesenheit apoptotischer Zellen das Überleben vitaler Neutrophiler signifikant verlängerte.

Bei murinen Makrophagen induziert die Phagozytose apoptotischer Zellen die frühe Phosphorylierung von Akt und p38 MAPK und vermindert die M-CSF-induzierte Phosphorylierung von Erk1/2 MAPK (Patel et al., 2006; Reddy et al., 2002). Die Ergebnisse in Makrophagen, die den Daten in dieser Arbeit widersprechen, lassen sich vermutlich dadurch erklären, dass Makrophagen andere Rezeptoren, z.B. CD36 als Co-Rezeptor für die Erkennung von Phosphatidylserin benutzen, während Neutrophile apoptotische Zellen vermutlich über Komplementrezeptoren erkennen.

MAP-Kinasen können durch die Rezeptoren für die Komplementfaktoren iC3b und C5a aktiviert werden (Leslie und Hansen, 2001). Da die Sekretion von IL-8 durch Neutrophile von C5a und Erk1/2 MAPK abhängig sind, ist anzunehmen, dass die Aktivierung von Erk1/2 durch apoptotische Zellen über Komplement-Faktoren vermittelt wird. C5a kann Erk1/2 und p38 MAPK aktivieren und wirkt als positive Rückkopplung z.B. stimulatorisch auf die Sekretion von IL-6 durch Neutrophile (Riedemann et al., 2004). Neben der Induktion der Zytokinsekretion ist der Erk1/2 MAPK-Signalweg ein Überlebens-Signalweg in Neutrophilen, der das Überleben dieser Zellen durch Aktivierung des anti-apoptischen Proteins Bad ermöglicht (Klein et al., 2000). Außerdem kann auch IL-8 selbst die Lebensspanne von Neutrophilen verlängern (Leuenroth et al., 1998). Somit könnte die C5a- und Erk1/2-vermittelte IL-8-Sekretion zum Überleben der Neutrophilen in Anwesenheit apoptotischer Zellen beitragen. Diese Theorie könnte durch Experimente, in denen IL-8 in der Zellkultur depletiert oder die Erk1/2 Phosphorylierung durch Inhibitoren blockiert wird, bestätigt werden.

Neben diesen aktivierenden Effekten haben apoptotische Zellen einen starken inhibitorischen Effekt, z.B. auf die fMLP-induzierte ROS-Produktion in Neutrophilen (Esmann et al., 2010). Bei der fMLP-induzierten Produktion von ROS sind Erk1/2 und p38 MAPK sowie Akt wichtig für die Aktivierung der NADPH Oxidase (Dewald und Baggiolini, 1985). Wurden vitale und apoptotische Zellen co-inkubiert und anschließend mit fMLP stimuliert, wurde die Phosphorylierung von p38 und Akt, aber nicht die Phosphorylierung von Erk1/2 inhibiert. Somit ist anzunehmen, dass der inhibitorische Effekt auf die fMLP-induzierte-ROS Produktion über die Inhibierung dieser beiden Kinasen vermittelt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es eine strenge Regulierung der aktivierenden und inhibitorischen Effekte gibt, die durch apoptotische Zellen ausgelöst werden. So wird Erk1/2 MAPK durch apoptotische Zellen aktiviert, die fMLP-induzierte Aktivierung von p38 MAPK und Akt hingegen inhibiert (Abb. 44). Durch diese Regulierung könnte gewährleistet werden, dass die Aktivität der Zelle vermindert wird, um eventuellen Gewebeschaden zu vermeiden, aber trotzdem proentzündliche Mechanismen wie die Sekretion von Zytokinen aufrechterhalten werden.

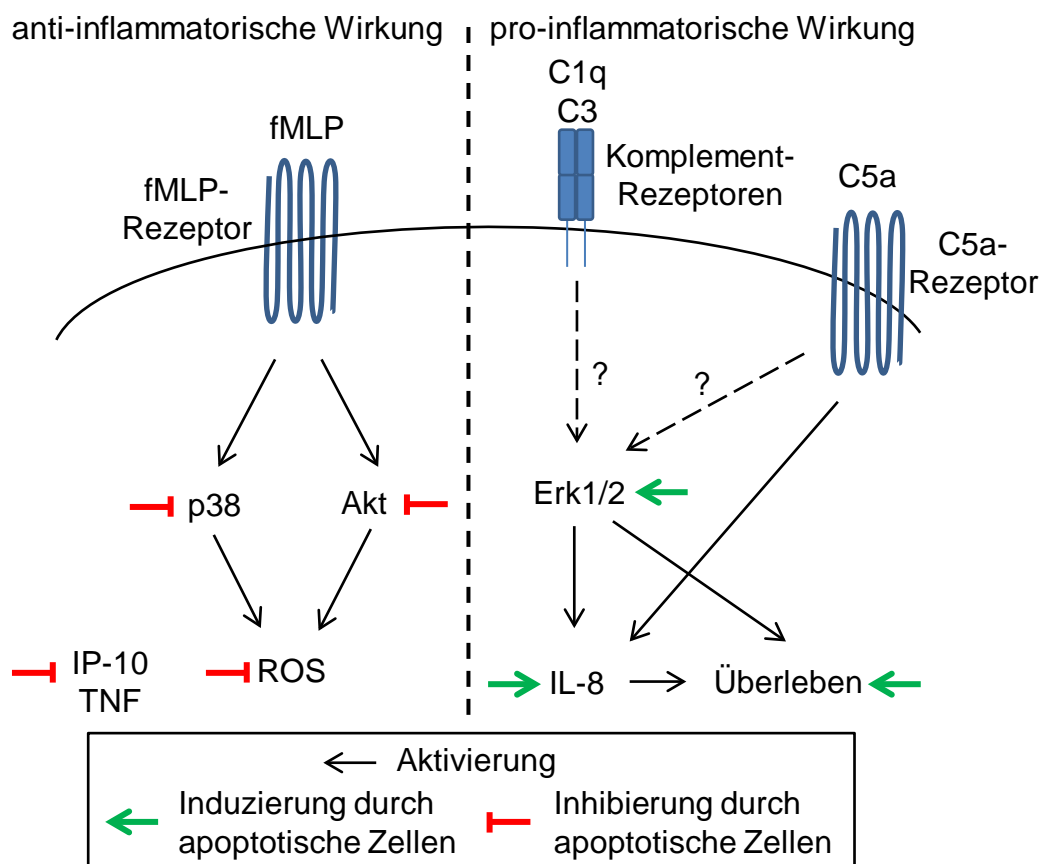


Abb. 44: Apoptotische Zellen haben eine gegensätzliche Wirkung auf die Erk1/2 und p38 MAPK-Kinasen.

4.5 Neutrophile Granulozyten sind ein Ziel von Methylprednisolon bei der Behandlung des bullösen Pemphigoid

Glucocorticoide wie Methylprednisolon sind wegen ihrer allgemein akzeptierten anti-inflammatorischen Eigenschaften Standardtherapeutika in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie dem bullösen Pemphigoid (Joly et al., 2009; Roujeau et al., 2009). Die Wirkung von topisch angewendeten Glucocorticoiden auf die angeborene Immunität ist allerdings noch nicht ausführlich untersucht. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Makrophagen und neutrophile Granulozyten die Zellen sind, auf die eine GC-Therapie bei der Behandlung einer experimentellen Kontaktallergie wirkt (Tuckermann et al., 2007). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von MP auf die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch LPS und fMLP als Modellstimuli oder im Kontext von BP durch Immunkomplexe untersucht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Neutrophile ein Ziel von MP in BP sein können. So konnte ausgehend von einem *Ex-Vivo*-BP-Modell nachgewiesen werden, dass MP inhibitorisch auf den Autoantikörper-induzierten Gewebeschaden wirkt. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Produktion von ROS und die Degranulierung von Neutrophilen durch MP inhibiert wird. Diese Effekte wurden auf die verminderte Phosphorylierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und p38 sowie Akt zurückgeführt. Die pharmakologische Inhibierung dieser drei Moleküle verminderte die Immunkomplex-induzierte ROS-Produktion. Die Inhibierung von p38 verminderte außerdem die IC-induzierte Degranulierung. Die Wirksamkeit aller drei Inhibitoren konnte auch in dem *Ex-Vivo*-BP-Modell nachgewiesen werden.

In ersten Versuchen zeigte sich, dass MP in der wirksamen Konzentration von 1 mM nicht toxisch auf Neutrophile wirkt und bei Inkubation über Nacht die spontane Apoptose inhibiert. Dieser Effekt ist bekannt (Liles et al., 1995) und lässt sich darauf zurückführen, dass die Behandlung von Neutrophilen mit GC zu einer Stabilisierung des anti-apoptotischen Proteins Bfl-1 und zur verminderten Expression des pro-apoptotischen Proteins Bak führt (Madsen-Bouterse et al., 2006). Außerdem exprimieren Neutrophile die inhibitorische β -Form des GC-Rezeptors, der die Expression pro-apoptotischer Gene verhindert (Strickland et al., 2001).

Der inhibitorische Effekt von verschiedenen GC auf die Sekretion von pro-entzündlichen Zytokinen ist in der Literatur akzeptiert. So inhibiert Prednison *in vitro* die Sekretion von IL-1 durch murine Makrophagen (Snyder und Unanue, 1982) sowie die Freisetzung von IL-1 β und TNF *in vivo* (Bendrups et al., 1993). Die Freisetzung von auf Makrophagen wirkenden Zytokinen durch Lymphozyten wird nach Behandlung mit Hydrocortisol reduziert (Wahl et

al., 1975) und Dexamethason vermindert die Expression von IL-6 und IL-8 in Fibroblasten (Tobler et al., 1992) sowie die Produktion von IL-8 durch eosinophile Granulozyten (Miyamasu et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die LPS-induzierte IL-8 Freisetzung durch Vorbehandlung mit MP inhibiert wurde. Da Neutrophile im Verlauf einer Entzündung eine wichtige Quelle für IL-8 sind und durch dieses Chemokin weitere Neutrophile angezogen werden, können GC so bei der Auflösung von Entzündungen helfen.

Es gibt widersprüchliche Daten bezüglich der Wirkung von GC auf die Degranulierung von Neutrophilen. Während Dexamethason in einer Konzentration von 1 μM die fMLP-induzierte Degranulierung von Neutrophilen nicht vermindert (Schleimer et al., 1989) und verschiedene GC, darunter auch MP, in einem Konzentrationsbereich von 0,1 μM - 1 mM die Stabilität isolierter Lysosomen aus humanen Neutrophilen nicht stabilisieren können (Persellin und Ku, 1974), zeigen andere Berichte, dass MP in einer Dosis von 0,1 mM die Degranulierung von Neutrophilen inhibieren kann (Liu et al., 2005). In einer ähnlichen Konzentration von 1 mM zeigte MP auch in dieser Arbeit einen klaren inhibitorischen Einfluss auf die fMLP- oder IC-induzierte Degranulierung von Neutrophilen. Da neutrophile Elastase und Gelatinase B, die beide aus den Granula freigesetzt werden, einen wichtigen Einfluss beim Gewebeschaden in BP haben (Shimanovich et al., 2004), ist davon auszugehen, dass der inhibitorische Effekt von MP auf Neutrophile hier eine wichtige Bedeutung hat.

GC werden in der Literatur als inhibitorisch für die Produktion von ROS beschrieben. So vermindert die Behandlung mit Dexamethason die Produktion von ROS in Kupffer-Zellen von Ratten *in vivo* (Melgert et al., 2001). Außerdem wurde berichtet, dass Cortisol in einem Bereich von 0,01 - 0,1 mM die fMLP-induzierte ROS Produktion bei Neutrophilen inhibieren kann (Bekesi et al., 2000). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich mit 1 mM MP eine deutliche inhibitorische Wirkung auf die fMLP- oder IC-induzierte ROS-Freisetzung durch Neutrophile. Da die NADPH Oxidase, die wichtig für die Produktion von ROS ist, für den Gewebeschaden in BP benötigt wird (Chiriac et al., 2007), ist davon auszugehen, dass die verminderte ROS-Produktion einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat.

Auf Ebene der Signaltransduktion sind für die Aktivierung der NADPH Oxidase in Neutrophilen unter anderem die Proteinkinase Akt sowie die MAP-Kinase Erk1/2 und p38 verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Neutrophilen mit MP die Phosphorylierung aller drei Moleküle in IC-stimulierten Neutrophilen inhibiert. In fMLP-

stimulierten Neutrophilen wurde lediglich die Aktivierung von Erk1/2 MAPK und Akt inhibiert. Die Phosphorylierung von p38 wurde durch die Vorinkubation mit MP nicht verändert oder leicht verstärkt, allerdings induzierte MP allein keine Phosphorylierung von p38. Als mögliche Ursache für die verminderte Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 kommt die verstärkte Expression von MKP-1 in Frage, die in dieser Arbeit in MP-behandelten Zellen nachgewiesen wurde. Diese Phosphatase wird nach Behandlung von Zellen mit GC stabilisiert und verstärkt exprimiert (Kassel et al., 2001). In U937-Zellen wurde allerdings gezeigt, dass die Affinität von MKP-1 für p38 höher ist als für Erk1/2 (Franklin und Kraft, 1997), woraus folgt, dass die MP-Behandlung die Phosphorylierung von p38 stärker inhibieren müsste als die Phosphorylierung von Erk1/2. In den IC-stimulierten Neutrophilen wurden beide Moleküle inhibiert, hier scheint eine Rolle von MKP-1 plausibel. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit fMLP-stimulierten Zellen deuten aber darauf hin, dass noch andere, bisher unverstandene Mechanismen an der GC-vermittelten Regulierung von MAP-Kinasen beteiligt sind. Denkbar wären z.B. Effekte durch andere Phosphatasen aus der MKP-Familie, die stärker auf Erk1/2 als auf p38 wirken. Neben den Effekten auf Erk1/2 und p38 MAPK wurde durch die Inkubation mit MP auch die Phosphorylierung von Akt inhibiert. Akt wird nach Aktivierung von PI3K aktiviert und kann die regulatorische p47phox-Untereinheit der NADPH Oxidase phosphorylieren und aktivieren (Chen et al., 2003). Es wurde bereits beschrieben, dass in Ratten, die mit Dexamethason behandelt worden waren, die Insulin-induzierte Phosphorylierung von PI3K in der Leber inhibiert wurde (Saad et al., 1993). In Ratten-Muskeln wurde gezeigt, dass eine Dexamethason-Behandlung die verstärkte Expression der regulatorischen PI3K-Untereinheit p85 induziert, die mit dem funktionalen p110/p85-Dimer der PI3K um die Bindung an den Insulinrezeptor konkurriert (Giorgino et al., 1997).

Dass die verminderte Aktivierung von Erk1/2 und p38 MAPK sowie Akt in MP-behandelten Neutrophilen relevant ist, konnte *in vitro* und *ex vivo* durch pharmakologische Inhibierung dieser Moleküle bestätigt werden. So wurde durch Inhibierung jedes dieser drei Moleküle die IC-induzierte Produktion von ROS und der *Ex-Vivo*-Gewebeschaden im BP Modell inhibiert. Es ist also davon auszugehen, dass MP über diese Signalmoleküle auf die Produktion von ROS in Neutrophilen wirkt. In Bezug auf die Degranulierung zeigte nur die Inhibierung von p38 einen Effekt. Es ist bereits beschrieben, dass die fMLP-induzierte Degranulierung von Neutrophilen durch p38 und nicht durch Erk1/2 MAPK vermittelt wird (Mocsai et al., 2000).

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass MP über die Inhibierung der Erk1/2 und p38 MAP-Kinase sowie PI3K-Akt-Signalwege einen inhibitorischen Einfluss auf Neutrophile hat. Da die ROS-Produktion und die Freisetzung von Granula-Proteinen, die beide für den Gewebeschaden in BP mitverantwortlich sind, inhibiert wurden, ist davon auszugehen, dass Neutrophile ein wichtiges Ziel von Glucocorticoiden wie MP in der topischen Therapie von BP sind (Abb. 45).

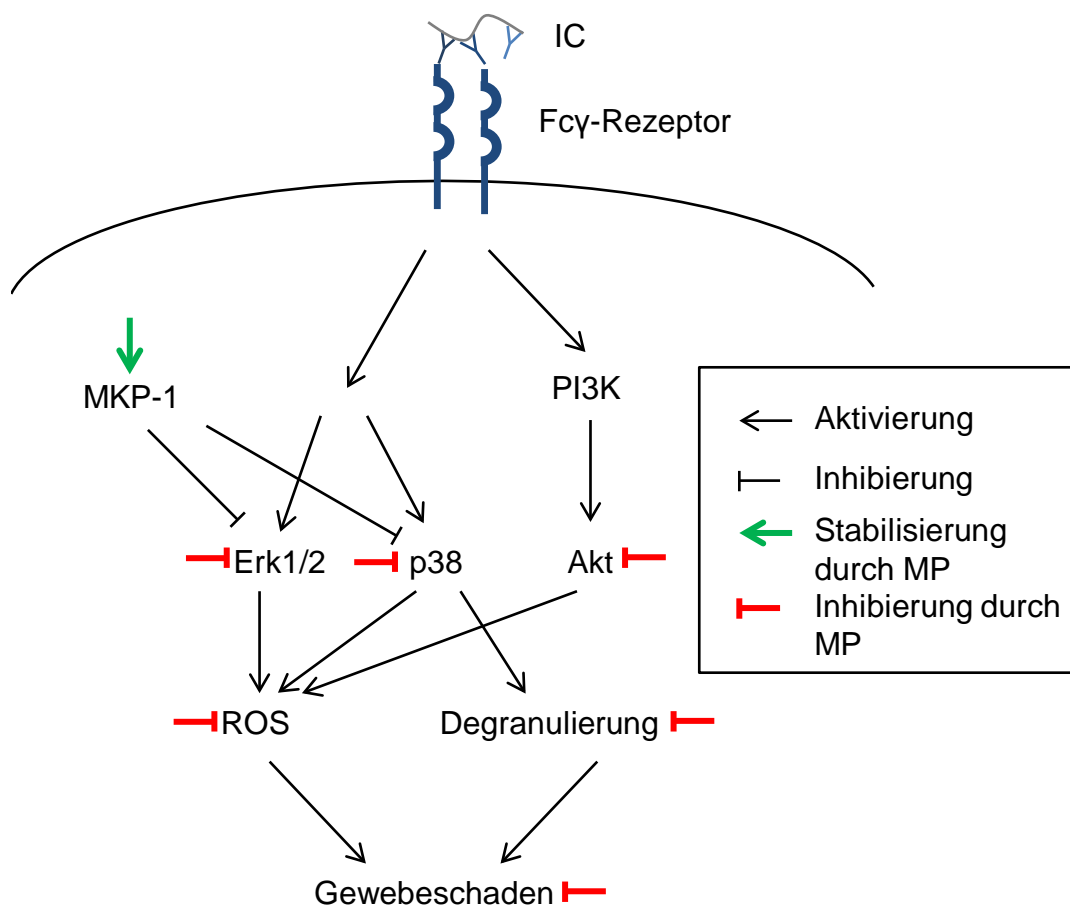


Abb. 45: Wirkung von Methylprednisolon (MP) auf Immunkomplex (IC)-stimulierte neutrophile Granulozyten.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Inaktivierung von neutrophilen Granulozyten in zwei unterschiedlichen Szenarien untersucht.

Im Kontext einer akuten Entzündung konnte gezeigt werden, dass vitale Neutrophile apoptotische Zellen in Abhängigkeit von Komplementfaktoren phagozytieren. Während dieses anti-inflammatorischen Vorganges, durch den die Produktion von ROS sowie die Sekretion von IP-10 und TNF inhibiert wird (Esmann et al., 2010), wurden die p38 MAPK und Akt Signalwege inhibiert. Die Phosphorylierung von Erk1/2 MAPK und die Erk1/2 MAPK- und C5a-abhängige Sekretion von IL-8 wurden hingegen induziert.

Ein anderes Szenario war die anti-inflammatorische Therapie von Autoimmunerkrankungen mit Methylprednisolon. MP inhibierte die Degranulierung und die Produktion von ROS durch Neutrophile. Darüber hinaus wurde die Phosphorylierung von Erk1/2 und p38 MAPK sowie Akt vermindert. Auch die Sekretion von IL-8 durch Neutrophile wurde inhibiert.

Da die Therapie mit GC viele Nebenwirkungen haben kann, wäre es interessant, wie einige anti-inflammatorischen Effekte dieser Medikamente ohne Nebeneffekte erreicht werden können. Eine Therapie, die den anti-inflammatorischen Effekt apoptotischer Zellen nutzt, ist die extrakorporale Photopherese, die bereits seit einigen Jahren für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen erprobt wird (Knobler et al., 2009). Bei diesem Verfahren werden Leukozyten des Patienten mit photoaktiven Substanzen und UV-Licht behandelt. Durch diese Behandlung kommt es zur Induktion der Apoptose in einem großen Teil der Lymphozyten (Tambur et al., 2000). Diese apoptotischen Zellen induzieren z.B. tolerogene dendritische Zellen (Lamioni et al., 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass in einem murinen Modell von Kontakthypersensitivität antigenspezifische regulatorische T-Zellen durch die Injektion apoptotischer Zellen induziert werden (Maeda et al., 2005). In der Klinik konnte z.B. in einer Studie mit 28 an Morbus Crohn erkrankten Patienten bei 50 % der Probanden eine Verbesserung des Krankheitsbildes durch extrakorporale Photopherese erzielt werden (Abreu et al., 2009). Eventuell spielt auch die anti-inflammatorische Wirkung apoptotischer Zellen auf Neutrophile bei dieser Therapie eine Rolle, so dass noch im Blut die Reaktivität der Neutrophilen vermindert und dadurch Gewebeschaden vermieden werden kann. Die in dieser Arbeit gewonnenen Einsichten über die Mechanismen während der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Neutrophile könnten somit einen Teil zum Verständnis dieser anti-inflammatorischen Therapie beitragen.

5 Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen des Immunsystems, die aus dem Blut an den Ort einer Entzündung rekrutiert werden. Sie besitzen potente antimikrobielle Mechanismen, um dort Erreger effizient abzutöten. Allerdings können Neutrophile auch das Gewebe schädigen, wenn ihre Aktivität nicht strikt kontrolliert wird.

Ein wichtiger Mechanismus für diese Kontrolle ist die konstitutive spontane Apoptose der Neutrophilen und die effiziente Beseitigung der apoptotischen Zellen. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war bereits gezeigt worden, dass nicht nur Makrophagen und dendritische Zellen, sondern auch Neutrophile Granulozyten apoptotische Neutrophile phagozytieren können. Im ersten Teil der Arbeit wurden vertiefend Interaktionen von vitalen und apoptotischen Neutrophilen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch vitale Neutrophile die Komplementfaktoren C1q und C3 erforderlich sind und pro-entzündliche Stimuli den Phagozytoseprozess stimulieren. Außerdem konnte durch den Einsatz pharmakologischer Inhibitoren gezeigt werden, dass Antikörper wahrscheinlich keine wichtige Rolle bei diesem Prozess spielen. Bei der Analyse der Signaltransduktion während der Interaktion von apoptotischen und vitalen Neutrophilen konnte nachgewiesen werden, dass der Kontakt der beiden Zellpopulationen die Phosphorylierung der MAP-Kinasen (MAPK) Erk1/2 in vitalen Neutrophilen induziert, allerdings die fMLP-induzierte Phosphorylierung von p38 MAPK und Akt inhibiert. Darüber hinaus wurde ein neues Mausmodell für die Analyse der Phagozytose apoptotischer Zellen durch murine Neutrophile *in vivo* im Maus Air-Pouch entwickelt. In diesem Modell konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Neutrophile *in vivo* innerhalb weniger Minuten erfolgt. Damit liefern die Ergebnisse klare Hinweise darauf, dass Neutrophile Granulozyten an der Beseitigung apoptotischer Zellen in entzündetem Gewebe beteiligt sein können.

Im Kontext von Autoimmunerkrankungen sind neutrophile Granulozyten oftmals an dem Gewebeschaden in entzündetem Gewebe beteiligt. Diese Krankheiten werden oft mit Glucocorticoiden behandelt, deren Wirkung auf das angeborene Immunsystem, insbesondere auf neutrophile Granulozyten, oft nicht genau untersucht worden ist. Im zweiten Teil der Arbeit wurde deshalb die Wirkung von Methylprednisolon (MP) auf die Effektorfunktionen von neutrophilen Granulozyten im Kontext des bullösen Pemphigoid (BP) untersucht. In einem *Ex-Vivo*-Modell für BP konnte gezeigt werden, dass der durch Blutleukozyten induzierte Gewebeschaden, der von neutrophilen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und

Proteasen abhängig ist, durch MP-Behandlung verhindert werden kann. Im Folgenden wurde nachgewiesen, dass die Behandlung mit MP die Immunkomplex-induzierte Produktion von ROS durch Neutrophile und die Degranulierung dieser Zellen inhibiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass MP die Immunkomplex-induzierte Phosphorylierung von Akt sowie der MAP-Kinasen Erk1/2 und p38 inhibiert. Durch den Einsatz pharmakologischer Inhibitoren wurden die zuvor beobachteten inhibitorischen Effekte von MP auf Degranulierung und ROS-Produktion neutrophiler Granulozyten auf die Effekte von MP auf Akt, Erk1/2 und p38 MAPK zurückgeführt. Auch der Gewebeschaden im *Ex-Vivo*-BP-Modell konnte durch Inhibitoren dieser Moleküle vermindert werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse deuten somit darauf hin, dass neutrophile Granulozyten ein wichtiges Ziel der Glucocorticoid-Therapie im bullösen Pemphigoid sind.

6 Summary

Neutrophil granulocytes are the first cells of the immune system that are recruited to sites of inflammation from the bloodstream. They bear potent anti-microbial mechanisms to efficiently kill invading microorganisms. However, these mechanisms have to be strictly regulated to prevent tissue damage.

One important mechanism of regulation is the constitutive apoptosis of neutrophils and the efficient removal of the apoptotic cells. Previous work from our group demonstrated that not only dendritic cells and macrophages, but also neutrophil granulocytes can phagocytose apoptotic cells. In the first part of this thesis, interactions of viable and apoptotic neutrophils were analyzed. It was shown that the complement factors C1q and C3 are required for the phagocytosis of apoptotic cells by neutrophils and that this process can be stimulated by pro-inflammatory mediators. Moreover, by using pharmacological inhibitors, it was demonstrated that antibodies probably are not involved in the phagocytic process. Analysis of signal transduction showed that contact to apoptotic cells activated Erk1/2 MAPK, while fMLP-induced activation of p38 MAPK and Akt was inhibited. Moreover, a murine in vivo model for the phagocytosis of apoptotic cells by murine neutrophils in an air-pouch was developed. Results generated in this model show that uptake of apoptotic cells by neutrophils occurs within minutes in vivo. These results clearly indicate that neutrophil granulocytes can play an important role in the clearance of apoptotic cells in inflamed tissue.

In the context of autoimmune diseases neutrophils are often responsible for tissue damage in inflamed tissue. These diseases are often treated with glucocorticoids. However, the exact way glucocorticoids influence the innate immune system, especially neutrophils, is not yet completely understood. In the second part of this thesis the impact of methylprednisolone (MP) on the effector functions of neutrophil granulocytes was analyzed in the context of the bullous pemphigoid (BP). In an ex vivo model of BP, dependent on reactive oxygen species (ROS) and proteases from blood neutrophils, tissue damage was inhibited by treatment with MP. It was demonstrated that MP inhibits neutrophil ROS production and degranulation in vitro. Moreover, MP reduced immune complex induced phosphorylation of p38 and Erk1/2 MAPK and Akt. By using pharmacological inhibitors it was shown that the reduction of ROS production and degranulation mediated by MP was due to reduced activation of these kinases. In the ex vivo model of BP, treatment with inhibitors of p38 or Erk1/2 MAPK or Akt reduced tissue damage. The results in this thesis thereby show that neutrophils can be an important target of glucocorticoids in the treatment of BP.

7 Literaturverzeichnis

- Abreu, M.T., von Tirpitz, C., Hardi, R., Kaatz, M., Van Assche, G., Rutgeerts, P., Bisaccia, E., Goerdts, S., Hanauer, S., Knobler, R., *et al.* (2009). *Extracorporeal photopheresis for the treatment of refractory Crohn's disease: results of an open-label pilot study.* *Inflamm Bowel Dis* 15, 829-836.
- Akira, S., und Takeda, K. (2004). *Toll-like receptor signalling.* *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.
- Arita, M., Yoshida, M., Hong, S., Tjonahen, E., Glickman, J.N., Petasis, N.A., Blumberg, R.S., und Serhan, C.N. (2005). *Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7671-7676.
- Bach, J.F. (2002). *The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases.* *N Engl J Med* 347, 911-920.
- Bekesi, G., Kakucs, R., Varbiro, S., Racz, K., Sprintz, D., Feher, J., und Szekacs, B. (2000). *In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes.* *Steroids* 65, 889-894.
- Bendrups, A., Hilton, A., Meager, A., und Hamilton, J.A. (1993). *Reduction of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta levels in human synovial tissue by interleukin-4 and glucocorticoid.* *Rheumatol Int* 12, 217-220.
- Biffi, W.L., Moore, E.E., Moore, F.A., und Barnett, C.C., Jr. (1995). *Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent.* *J Leukoc Biol* 58, 582-584.
- Borregaard, N., Sorensen, O.E., und Theilgaard-Monch, K. (2007). *Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins.* *Trends Immunol* 28, 340-345.
- Borrego, L., Maynard, B., Peterson, E.A., George, T., Iglesias, L., Peters, M.S., Newman, W., Gleich, G.J., und Leiferman, K.M. (1996). *Deposition of eosinophil granule proteins precedes blister formation in bullous pemphigoid. Comparison with neutrophil and mast cell granule proteins.* *AmJ Pathol* 148, 897-909.
- Boutros, T., Chevet, E., und Metrakos, P. (2008). *Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer.* *Pharmacol Rev* 60, 261-310.

- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., und Zychlinsky, A. (2004). *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science (New York, NY 303, 1532-1535.
- Calafat, J., Kuijpers, T.W., Janssen, H., Borregaard, N., Verhoeven, A.J., und Roos, D. (1993). *Evidence for small intracellular vesicles in human blood phagocytes containing cytochrome b558 and the adhesion molecule CD11b/CD18*. Blood 81, 3122-3129.
- Camous, L., Roumenina, L., Bigot, S., Brachemi, S., Fremeaux-Bacchi, V., Lesavre, P., und Halbwachs-Mecarelli, L. (2011). *Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation*. Blood 117, 1340-1349.
- Cassatella, M.A. (1999). *Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound*. Adv Immunol 73, 369-509.
- Cassatella, M.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bertagnin, A., Luster, A.D., und McDonald, P.P. (1997). *Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils*. Eur J Immunol 27, 111-115.
- Chen, Q., Powell, D.W., Rane, M.J., Singh, S., Butt, W., Klein, J.B., und McLeish, K.R. (2003). *Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils*. J Immunol 170, 5302-5308.
- Chiriac, M.T., Roesler, J., Sindrilaru, A., Scharffetter-Kochanek, K., Zillikens, D., und Sitaru, C. (2007). *NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage*. J Pathol 212, 56-65.
- Chuang, F.Y., Sassaroli, M., und Unkeless, J.C. (2000). *Convergence of Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils*. J Immunol 164, 350-360.
- Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., und Mantovani, A. (1992). *Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products*. Blood 80, 2012-2020.
- Cowburn, A.S., Deighton, J., Walmsley, S.R., und Chilvers, E.R. (2004). *The survival effect of TNF-alpha in human neutrophils is mediated via NF-kappa B-dependent IL-8 release*. Eur J Immunol 34, 1733-1743.
- Dancey, J.T., Deubelbeiss, K.A., Harker, L.A., und Finch, C.A. (1976). *Neutrophil kinetics in man*. J Clin Invest 58, 705-715.

- Deckers, C.L., Lyons, A.B., Samuel, K., Sanderson, A., und Maddy, A.H. (1993). *Alternative pathways of apoptosis induced by methylprednisolone and valinomycin analyzed by flow cytometry*. *Exp Cell Res* 208, 362-370.
- DeLeo, F.R., Renee, J., McCormick, S., Nakamura, M., Apicella, M., Weiss, J.P., und Nauseef, W.M. (1998). *Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly*. *J Clin Invest* 101, 455-463.
- Detmers, P.A., Powell, D.E., Walz, A., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., und Cohn, Z.A. (1991). *Differential effects of neutrophil-activating peptide 1/IL-8 and its homologues on leukocyte adhesion and phagocytosis*. *J Immunol* 147, 4211-4217.
- Detmers, P.A., Zhou, D., Powell, D., Lichtenstein, H., Kelley, M., und Pironkova, R. (1995). *Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase*. *J Immunol* 155, 2085-2095.
- Dewald, B., und Baggiolini, M. (1985). *Activation of NADPH oxidase in human neutrophils. Synergism between fMLP and the neutrophil products PAF and LTB4*. *Biochem Biophys Res Commun* 128, 297-304.
- Dewas, C., Fay, M., Gougerot-Pocidalo, M.A., und El-Benna, J. (2000). *The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils*. *J Immunol* 165, 5238-5244.
- Dubertret, L., Bertaux, B., Fosse, M., und Touraine, R. (1980). *Cellular events leading to blister formation in bullous pemphigoid*. *BrJ Dermatol* 103, 615-624.
- Ducusin, R.J., Sarashina, T., Uzuka, Y., Tanabe, S., und Ohtani, M. (2001). *Phagocytic response of bovine polymorphonuclear leukocytes to different incubation conditions and following exposure to some effectors of phagocytosis and different anticoagulants in vitro*. *Can J Vet Res* 65, 38-44.
- Ebner, K., Bandion, A., Binder, B.R., de Martin, R., und Schmid, J.A. (2003). *GMCSF activates NF-kappaB via direct interaction of the GMCSF receptor with IkappaB kinase beta*. *Blood* 102, 192-199.
- Egesten, A., Breton-Gorius, J., Guichard, J., Gullberg, U., und Olsson, I. (1994). *The heterogeneity of azurophil granules in neutrophil promyelocytes: immunogold localization of myeloperoxidase, cathepsin G, elastase, proteinase 3, and bactericidal/permeability increasing protein*. *Blood* 83, 2985-2994.

- Ehrengruber, M.U., Geiser, T., und Deranleau, D.A. (1994). *Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst.* FEBS Lett 346, 181-184.
- El-Benna, J., Dang, P.M., Gougerot-Pocidallo, M.A., Marie, J.C., und Braut-Boucher, F. (2009). *p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases.* Exp Mol Med 41, 217-225.
- El Benna, J., Han, J., Park, J.W., Schmid, E., Ulevitch, R.J., und Babior, B.M. (1996). *Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK.* Archives of biochemistry and biophysics 334, 395-400.
- Esmann, L., Idel, C., Sarkar, A., Hellberg, L., Behnen, M., Moller, S., van Zandbergen, G., Klinger, M., Kohl, J., Bussmeyer, U., et al. (2010). *Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: diminished proinflammatory neutrophil functions in the presence of apoptotic cells.* J Immunol 184, 391-400.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., und Henson, P.M. (1998a). *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF.* J Clin Invest 101, 890-898.
- Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.E., Campbell, P.A., und Henson, P.M. (1992). *Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells.* J Immunol 149, 4029-4035.
- Fadok, V.A., Warner, M.L., Bratton, D.L., und Henson, P.M. (1998b). *CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3).* J Immunol 161, 6250-6257.
- Faurschou, M., und Borregaard, N. (2003). *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.* Microbes and infection / Institut Pasteur 5, 1317-1327.
- Flammer, J.R., und Rogatsky, I. (2011). *Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms.* Mol Endocrinol 25, 1075-1086.
- Franklin, C.C., und Kraft, A.S. (1997). *Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells.* J Biol Chem 272, 16917-16923.

- Fraser, D.A., Laust, A.K., Nelson, E.L., und Tenner, A.J. (2009). *C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells*. *J Immunol* 183, 6175-6185.
- Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., und Zychlinsky, A. (2007). *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. *J Cell Biol* 176, 231-241.
- Galati, G., Rovere, P., Citterio, G., Bondanza, A., Scagliette, U., Bucci, E., Heltai, S., Fascio, U., Rugarli, C., und Manfredi, A.A. (2000). *In vivo administration of GM-CSF promotes the clearance of apoptotic cells: effects on monocytes and polymorphonuclear leukocytes*. *J Leukoc Biol* 67, 174-182.
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F., und Lehrer, R.I. (1985). *Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils*. *The Journal of clinical investigation* 76, 1427-1435.
- Giorgino, F., Pedrini, M.T., Matera, L., und Smith, R.J. (1997). *Specific increase in p85alpha expression in response to dexamethasone is associated with inhibition of insulin-like growth factor-I stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity in cultured muscle cells*. *J Biol Chem* 272, 7455-7463.
- Girard, D., Gosselin, J., Heitz, D., Paquin, R., und Beaulieu, A.D. (1995). *Effects of interleukin-2 on gene expression in human neutrophils*. *Blood* 86, 1170-1176.
- Graham, I.L., und Brown, E.J. (1991). *Extracellular calcium results in a conformational change in Mac-1 (CD11b/CD18) on neutrophils. Differentiation of adhesion and phagocytosis functions of Mac-1*. *J Immunol* 146, 685-691.
- Hall, A.B., Gakidis, M.A., Glogauer, M., Wilsbacher, J.L., Gao, S., Swat, W., und Brugge, J.S. (2006). *Requirements for Vav guanine nucleotide exchange factors and Rho GTPases in FcgammaR- and complement-mediated phagocytosis*. *Immunity* 24, 305-316.
- Hamilton, J.A. (2008). *Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity*. *Nat Rev Immunol* 8, 533-544.
- Hayashi, F., Means, T.K., und Luster, A.D. (2003). *Toll-like receptors stimulate human neutrophil function*. *Blood* 102, 2660-2669.
- Joly, P., Roujeau, J.C., Benichou, J., Delaporte, E., D'Incan, M., Dreno, B., Bedane, C., Sparsa, A., Gorin, I., Picard, C., et al. (2009). *A comparison of two regimens of topical corticosteroids in the treatment of patients with bullous pemphigoid: a multicenter randomized study*. *J Invest Dermatol* 129, 1681-1687.

- Kaneko, F., Minagawa, T., Takiguchi, Y., Suzuki, M., und Itoh, N. (1992). *Role of cell-mediated immune reaction in blister formation of bullous pemphigoid*. *Dermatology* 184, 34-39.
- Kassel, O., Sancono, A., Kratzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M., und Cato, A.C. (2001). *Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1*. *EMBO J* 20, 7108-7116.
- Kemper, C., Mitchell, L.M., Zhang, L., und Hourcade, D.E. (2008). *The complement protein properdin binds apoptotic T cells and promotes complement activation and phagocytosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9023-9028.
- Kirchner, T., Moller, S., Klinger, M., Solbach, W., Laskay, T., und Behnen, M. (2012). *The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps*. *Mediators Inflamm* 2012, 849136.
- Klein, J.B., Rane, M.J., Scherzer, J.A., Coxon, P.Y., Kettritz, R., Mathiesen, J.M., Buridi, A., und McLeish, K.R. (2000). *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways*. *J Immunol* 164, 4286-4291.
- Knobler, R., Barr, M.L., Couriel, D.R., Ferrara, J.L., French, L.E., Jaksch, P., Reinisch, W., Rook, A.H., Schwarz, T., und Greinix, H. (2009). *Extracorporeal photopheresis: past, present, and future*. *J Am Acad Dermatol* 61, 652-665.
- Korb, L.C., und Ahearn, J.M. (1997). *Clq binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited*. *J Immunol* 158, 4525-4528.
- Krauss, G. (2003). *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 3rd edn (Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).
- Laichalk, L.L., Danforth, J.M., und Standiford, T.J. (1996). *Interleukin-10 inhibits neutrophil phagocytic and bactericidal activity*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 15, 181-187.
- Lamioni, A., Parisi, F., Isacchi, G., Giorda, E., Di Cesare, S., Landolfo, A., Cenci, F., Bottazzo, G.F., und Carsetti, R. (2005). *The immunological effects of extracorporeal photopheresis unraveled: induction of tolerogenic dendritic cells in vitro and regulatory T cells in vivo*. *Transplantation* 79, 846-850.
- Langan, S.M., Smeeth, L., Hubbard, R., Fleming, K.M., Smith, C.J., und West, J. (2008). *Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study*. *BMJ* 337:a180. doi: 10.1136/bmj.a180., a180.

- Lee, W.L., Harrison, R.E., und Grinstein, S. (2003). *Phagocytosis by neutrophils*. *Microbes Infect* 5, 1299-1306.
- Leslie, R.G.Q., und Hansen, S. (2001). *Complement Receptors*. In eLS (John Wiley & Sons, Ltd).
- Lesur, O., Kokis, A., Hermans, C., Fulop, T., Bernard, A., und Lane, D. (2000). *Interleukin-2 involvement in early acute respiratory distress syndrome: relationship with polymorphonuclear neutrophil apoptosis and patient survival*. *Crit Care Med* 28, 3814-3822.
- Leuenroth, S., Lee, C., Grutkoski, P., Keeping, H., und Simms, H.H. (1998). *Interleukin-8-induced suppression of polymorphonuclear leukocyte apoptosis is mediated by suppressing CD95 (Fas/Apo-1) Fas-1 interactions*. *Surgery* 124, 409-417.
- Liles, W.C., Dale, D.C., und Klebanoff, S.J. (1995). *Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils*. *Blood* 86, 3181-3188.
- Liu, L., Wang, Y.X., Zhou, J., Long, F., Sun, H.W., Liu, Y., Chen, Y.Z., und Jiang, C.L. (2005). *Rapid non-genomic inhibitory effects of glucocorticoids on human neutrophil degranulation*. *Inflamm Res* 54, 37-41.
- Liu, Z., Giudice, G.J., Zhou, X., Swartz, S.J., Troy, J.L., Fairley, J.A., Till, G.O., und Diaz, L.A. (1997). *A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid*. *J Clin Invest* 100, 1256-1263.
- Lotz, S., Aga, E., Wilde, I., van Zandbergen, G., Hartung, T., Solbach, W., und Laskay, T. (2004). *Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2*. *J Leukoc Biol* 75, 467-477.
- Lowell, C.A. (2006). *Rewiring phagocytic signal transduction*. *Immunity* 24, 243-245.
- Lüllmann, H., Mohr, K., und Hein, L. (2010). *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*, 17th edn (Stuttgart, Georg Thieme Verlag).
- Madsen-Bouterse, S.A., Rosa, G.J., und Burton, J.L. (2006). *Glucocorticoid modulation of Bcl-2 family members A1 and Bak during delayed spontaneous apoptosis of bovine blood neutrophils*. *Endocrinology* 147, 3826-3834.
- Maeda, A., Schwarz, A., Kernebeck, K., Gross, N., Aragane, Y., Peritt, D., und Schwarz, T. (2005). *Intravenous infusion of syngeneic apoptotic cells by photopheresis induces antigen-specific regulatory T cells*. *J Immunol* 174, 5968-5976.

- Majeed, M., Perskvist, N., Ernst, J.D., Orselius, K., und Stendahl, O. (1998). *Roles of calcium and annexins in phagocytosis and elimination of an attenuated strain of Mycobacterium tuberculosis in human neutrophils*. *Microb Pathog* 24, 309-320.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., und Jaillon, S. (2011). *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. *Nat Rev Immunol* 11, 519-531.
- Melgert, B.N., Olinga, P., Van Der Laan, J.M., Weert, B., Cho, J., Schuppan, D., Groothuis, G.M., Meijer, D.K., und Poelstra, K. (2001). *Targeting dexamethasone to Kupffer cells: effects on liver inflammation and fibrosis in rats*. *Hepatology* 34, 719-728.
- Michlewska, S., Dransfield, I., Megson, I.L., und Rossi, A.G. (2009). *Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha*. *FASEB J* 23, 844-854.
- Miyamasu, M., Misaki, Y., Izumi, S., Takaishi, T., Morita, Y., Nakamura, H., Matsushima, K., Kasahara, T., und Hirai, K. (1998). *Glucocorticoids inhibit chemokine generation by human eosinophils*. *J Allergy Clin Immunol* 101, 75-83.
- Mocsai, A., Jakus, Z., Vantus, T., Berton, G., Lowell, C.A., und Ligeti, E. (2000). *Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases*. *J Immunol* 164, 4321-4331.
- Moxey-Mims, M.M., Simms, H.H., Frank, M.M., Lin, E.Y., und Gaither, T.A. (1991). *The effects of IL-1, IL-2, and tumor necrosis factor on polymorphonuclear leukocyte Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. IL-2 down-regulates the effect of tumor necrosis factor*. *J Immunol* 147, 1823-1830.
- Murphy, K. (2011). *Janeway's Immunobiology*, 8th edn (Taylor & Francis).
- Nick, J.A., Avdi, N.J., Young, S.K., Knall, C., Gerwins, P., Johnson, G.L., und Worthen, G.S. (1997). *Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP*. *J Clin Invest* 99, 975-986.
- Niessen, H.W., Kuijpers, T.W., Roos, D., und Verhoeven, A.J. (1991). *Release of azurophilic granule contents in fMLP-stimulated neutrophils requires two activation signals, one of which is a rise in cytosolic free Ca²⁺*. *Cell Signal* 3, 625-633.
- Nimmerjahn, F., und Ravetch, J.V. (2008). *Fc gamma receptors as regulators of immune responses*. *Nat Rev Immunol* 8, 34-47.

- Nourshargh, S., Hordijk, P.L., und Sixt, M. (2010). *Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 366-378.
- Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A., und Henson, P.M. (2001). *C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells*. *J Exp Med* 194, 781-795.
- Patel, V.A., Longacre, A., Hsiao, K., Fan, H., Meng, F., Mitchell, J.E., Rauch, J., Ucker, D.S., und Levine, J.S. (2006). *Apoptotic cells, at all stages of the death process, trigger characteristic signaling events that are divergent from and dominant over those triggered by necrotic cells: Implications for the delayed clearance model of autoimmunity*. *J Biol Chem* 281, 4663-4670.
- Pechkovsky, D.V., Potapnev, M.P., und Zalutskaya, O.M. (1996). *Different patterns of cytokine regulation of phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils*. *Int J Antimicrob Agents* 7, 33-40.
- Peiser, L., Mukhopadhyay, S., und Gordon, S. (2002). *Scavenger receptors in innate immunity*. *Curr Opin Immunol* 14, 123-128.
- Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Romagnani, S., et al. (2010). *Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells*. *Blood* 115, 335-343.
- Pellme, S., Morgelin, M., Tapper, H., Mellqvist, U.H., Dahlgren, C., und Karlsson, A. (2006). *Localization of human neutrophil interleukin-8 (CXCL-8) to organelle(s) distinct from the classical granules and secretory vesicles*. *J Leukoc Biol* 79, 564-573.
- Persellin, R.H., und Ku, L.C. (1974). *Effects of steroid hormones on human polymorphonuclear leukocyte lysosomes*. *J Clin Invest* 54, 919-925.
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A., Tesselaar, K., und Koenderman, L. (2010). *In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. *Blood* 116, 625-627.
- Reddy, S.M., Hsiao, K.H., Abernethy, V.E., Fan, H., Longacre, A., Lieberthal, W., Rauch, J., Koh, J.S., und Levine, J.S. (2002). *Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages induces novel signaling events leading to cytokine-independent survival and inhibition of proliferation: activation of Akt and inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*. *J Immunol* 169, 702-713.

- Riedemann, N.C., Guo, R.F., Hollmann, T.J., Gao, H., Neff, T.A., Reuben, J.S., Speyer, C.L., Sarma, J.V., Wetsel, R.A., Zetoune, F.S., *et al.* (2004). *Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis*. *FASEB J* 18, 370-372.
- Rosas-Ballina, M., Goldstein, R.S., Gallowitsch-Puerta, M., Yang, L., Valdes-Ferrer, S.I., Patel, N.B., Chavan, S., Al-Abed, Y., Yang, H., and Tracey, K.J. (2009). *The selective alpha7 agonist GTS-21 attenuates cytokine production in human whole blood and human monocytes activated by ligands for TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, and RAGE*. *Mol Med* 15, 195-202.
- Roujeau, J.C., Ingen-Housz-Oro, S., Leroux, C., and Joly, P. (2009). *Treatment of bullous pemphigoid and pemphigus. The French experience, 2009 update*. *GIItalDermatolVenereol* 144, 333-338.
- Rubartelli, A., Poggi, A., and Zocchi, M.R. (1997). *The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium*. *Eur J Immunol* 27, 1893-1900.
- Rydell-Tormanen, K., Uller, L., and Erjefalt, J.S. (2006). *Neutrophil cannibalism--a back up when the macrophage clearance system is insufficient*. *Respir Res* 7, 143.
- Saad, M.J., Folli, F., Kahn, J.A., and Kahn, C.R. (1993). *Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats*. *J Clin Invest* 92, 2065-2072.
- Savill, J., Hogg, N., Ren, Y., and Haslett, C. (1992). *Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis*. *J Clin Invest* 90, 1513-1522.
- Scapini, P., Bazzoni, F., and Cassatella, M.A. (2008). *Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils*. *Immunol Lett* 116, 1-6.
- Schleimer, R.P., Freeland, H.S., Peters, S.P., Brown, K.E., and Derse, C.P. (1989). *An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils*. *J Pharmacol Exp Ther* 250, 598-605.
- Serhan, C.N., and Savill, J. (2005). *Resolution of inflammation: the beginning programs the end*. *Nat Immunol* 6, 1191-1197.
- Sheppard, F.R., Kelher, M.R., Moore, E.E., McLaughlin, N.J., Banerjee, A., and Silliman, C.C. (2005). *Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase*:

- phosphorylation and translocation during priming and activation.* J Leukoc Biol 78, 1025-1042.
- Shimanovich, I., Mihai, S., Oostingh, G.J., Ilenchuk, T.T., Brocker, E.B., Opdenakker, G., Zillikens, D., und Sitaru, C. (2004). *Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid.* J Pathol 204, 519-527.
- Sitaru, C., Goebeler, M., und Zillikens, D. (2004). [*Bullous autoimmune dermatoses (I): Pathogenesis and diagnosis*]. JDtschDermatol Ges 2, 123-128.
- Snyder, D.S., und Unanue, E.R. (1982). *Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interleukin 1 production.* J Immunol 129, 1803-1805.
- Strickland, I., Kisich, K., Hauk, P.J., Vottero, A., Chrousos, G.P., Klemm, D.J., und Leung, D.Y. (2001). *High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids.* J Exp Med 193, 585-593.
- Sun, Y.P., Oh, S.F., Uddin, J., Yang, R., Gotlinger, K., Campbell, E., Colgan, S.P., Petasis, N.A., und Serhan, C.N. (2007). *Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation.* J Biol Chem 282, 9323-9334.
- Takizawa, F., Tsuji, S., und Nagasawa, S. (1996). *Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells.* FEBS Lett 397, 269-272.
- Tambur, A.R., Ortegell, J.W., Morales, A., Klingemann, H., Gebel, H.M., und Tharp, M.D. (2000). *Extracorporeal photopheresis induces lymphocyte but not monocyte apoptosis.* Transplant Proc 32, 747-748.
- Tilton, B., Andjelkovic, M., Didichenko, S.A., Hemmings, B.A., und Thelen, M. (1997). *G-Protein-coupled receptors and Fcgamma-receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes.* J Biol Chem 272, 28096-28101.
- Tobler, A., Meier, R., Seitz, M., Dewald, B., Baggiolini, M., und Fey, M.F. (1992). *Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8, and IL-6, but not of M-CSF in human fibroblasts.* Blood 79, 45-51.
- Triglia, R.P., und Linscott, W.D. (1980). *Titers of nine complement components, conglutinin and C3b-inactivator in adult and fetal bovine sera.* Mol Immunol 17, 741-748.

- Tuckermann, J.P., Kleiman, A., Moriggl, R., Spanbroek, R., Neumann, A., Illing, A., Clausen, B.E., Stride, B., Forster, I., Habenicht, A.J., *et al.* (2007). *Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy.* J Clin Invest 117, 1381-1390.
- Vivarelli, M.S., McDonald, D., Miller, M., Cusson, N., Kelliher, M., und Geha, R.S. (2004). *RIP links TLR4 to Akt and is essential for cell survival in response to LPS stimulation.* J Exp Med 200, 399-404.
- Vogt, A., McDonald, P.R., Tamewitz, A., Sikorski, R.P., Wipf, P., Skoko, J.J., 3rd, und Lazo, J.S. (2008). *A cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatases restores paclitaxel-induced apoptosis in dexamethasone-protected cancer cells.* Mol Cancer Ther 7, 330-340.
- Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., und Girkontaite, I. (1997). *Immunosuppressive effects of apoptotic cells.* Nature 390, 350-351.
- Wahl, S.M., Altman, L.C., und Rosenstreich, D.L. (1975). *Inhibition of in vitro lymphokine synthesis by glucocorticosteroids.* J Immunol 115, 476-481.
- Wang, J., Huang, W.L., und Liu, R.Y. (2009). *CpG-ODN enhances ingestion of apoptotic neutrophils by macrophages.* Clin Exp Med 9, 37-43.
- Weisbart, R.H., Kacena, A., Schuh, A., und Golde, D.W. (1988). *GM-CSF induces human neutrophil IgA-mediated phagocytosis by an IgA Fc receptor activation mechanism.* Nature 332, 647-648.
- Wilde, I., Lotz, S., Engelmann, D., Starke, A., van Zandbergen, G., Solbach, W., und Laskay, T. (2007). *Direct stimulatory effects of the TLR2/6 ligand bacterial lipopeptide MALP-2 on neutrophil granulocytes.* Med Microbiol Immunol 196, 61-71.
- Wyllie, A.H. (1980). *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.* Nature 284, 555-556.
- Yagi, M., Kantarci, A., Iwata, T., Omori, K., Ayilavarapu, S., Ito, K., Hasturk, H., und Van Dyke, T.E. (2009). *PDK1 regulates chemotaxis in human neutrophils.* J Dent Res 88, 1119-1124.

8 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 12: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance
apo.	apoptotisch
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
BAFF	B Cell-Activating Factor
BP	Bullöses Pemphigoid
BSA	Bovines Serum Albumin
C5aRA	C5a-Rezeptor Antagonist
CD	Cluster of Differentiation
CCL	C-C-Motiv Chemokin
CXCL	C-X-X-Motiv Chemokin
CXCR	C-X-X-Motiv Chemokin Rezeptor
DHR123	Dihydrorhodamin123
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence activated Cell Sorting
FcγR	Fc- γ -Rezeptor
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GC	Glucocorticoide
GM-CSF	Granulocyte-Monocyte-Colony stimulating factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	Hematopoetic Growth Factor
HRP	Horseradish Peroxidase
IC	Immunkomplex
IFN-γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-1-RA	IL-1-Rezeptor-Antagonist
JAK	Januskinase

JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
LSM-1077	Lymphozytenseparationsmedium-1077
MACS	Magnetic Cell Separation
Malp-2	Macrophage Activation Lipopeptide -2
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2
MKP-1	MAP-Kinase-Phosphatase-1
MP	Methylprednisolon
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NSC	NSC 95397
ODN	Oligodesoxinukleotid
PMN	Polymorphnukleäre Leukozyten
PBMC	Peripher Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PMN	Polymorphonukleäre Leukozyten
Poly I:C	Polyinosinic:polycytidylic acid
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCF	Stem Cell Factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxid-Dismutase
SSC	Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBS	Tris Buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vit.	vital

