

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. W. Solbach

Phagozytose apoptotischer Zellen durch neutrophile Granulozyten

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– **Aus der Medizinischen Fakultät** –

vorgelegt von
Lars Esmann
aus Nordhorn

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. univ. (Univ. Budapest) Tamás Laskay

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Achim Peters

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2008

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 09.12.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

– Dekan der Medizinischen Fakultät –

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Abkürzungen	7
1 Einleitung	9
1.1 Neutrophile Granulozyten	9
1.1.1 Extravasation (Austritt aus dem Blutgefäßsystem)	10
1.1.2 Phagozytose	11
1.1.3 PMN im Netzwerk von Entzündungsmediatoren	12
1.2 Apoptose und ihre Bedeutung im Entzündungsvorgang	13
1.3 Phagozytose apoptotischer Zellen	16
1.4 Ziel der Arbeit	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Laborbedarf	23
2.1.3 Chemikalien und sonstige Reagenzien	24
2.1.4 Kulturmedien und Puffer	26
2.1.5 Antikörper	26
2.2 Methoden	28
2.2.1 Zellkulturbedingungen	28
2.2.2 Isolation von neutrophilen Granulozyten aus humanem peri- phervenösem Blut	29
2.2.3 Makrophagen und Lymphozyten	31
2.2.4 Zellzählung in der Zählkammer	32
2.2.5 Herstellung von Zytospinpräparaten und Giemsa-Färbung	32

2.2.6	Darstellung von Oberflächenstrukturen auf PMN mit monoklonalen Antikörpern	33
2.2.7	Apoptose	34
2.2.8	Färbung der Zellen mit PKH-Farbstoffen	36
2.2.9	Phagozytoseversuche	36
2.2.10	Fluoreszenzmikroskopie	41
2.2.11	Durchflusszytometrie	41
2.2.12	Affinitätschromatographie	42
2.2.13	Statistik	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Vorversuche	45
3.1.1	Makrophagen phagozytieren apoptotische Lymphozyten	45
3.1.2	PMN phagozytieren <i>S. aureus</i> und <i>E. coli</i>	46
3.2	Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN	47
3.3	Generierung apoptotischer Zielzellen durch UV-Bestrahlung von PMN .	48
3.4	PMN phagozytieren apoptotische PMN	50
3.4.1	Giemsa-gefärbte Präparate	50
3.4.2	Fluoreszenzmikroskopische Präparate	51
3.4.3	Durchflusszytometrischer Nachweis	53
3.4.4	Vollblutphagozytoseversuche	55
3.5	Steigerung der Phagozytose durch Stimulation der Effektorgranulozyten mit verschiedenen Substanzen	57
3.6	Mechanismen der Aufnahme von apoptotischen Zellen durch PMN . . .	58
3.6.1	Die Phagozytose apoptotischer PMN durch PMN ist serumabhängig	59
3.6.2	Darstellung von Phagozytose-relevanten Oberflächenrezeptoren auf PMN	60
3.6.3	Der Fc γ Rezeptor II (CD32) ist von Bedeutung bei der Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN	62
3.6.4	C-reaktives Protein und Serum Amyloid P tragen nicht zur Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN bei	64
3.6.5	Depletion des Serums von IgG erniedrigt die Phagozytoserate von apoptotischen Zellen durch PMN	65

3.6.6	Apoptotische PMN werden in autologem Serum nicht durch IgG opsonisiert	67
4	Diskussion	68
4.1	Vorversuche	69
4.2	Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN	69
4.2.1	Morphologische Darstellung mittels Mikroskopie	69
4.2.2	Durchflusszytometrische Darstellung	71
4.2.3	Vollblutphagozytoseversuche	73
4.3	Stimulation zur Phagozytose	73
4.4	Mechanismen der Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN	75
4.4.1	Effekte von Serum	75
4.4.2	Rezeptoren, CD32, CRP, SAP und Immunkomplexe	76
4.5	Schlussbetrachtung	78
5	Zusammenfassung	80
6	Summary	82
	Literaturverzeichnis	84
	Veröffentlichungen	98
	Danksagung	99
	Lebenslauf	100

Abbildungsverzeichnis

1.1	Vorgänge bei der Apoptose	14
1.2	Die phagozytotische Synapse	19
2.1	Isolation von neutrophilen Granulozyten	30
2.2	Zytospinpräparat von PMN	35
2.3	Durchflusszytometrie von PMN	39
2.4	Durchflusszytometrie einer Leukozytensuspension	42
3.1	PMN und apoptotischer PMN	44
3.2	Makrophagen phagozytieren apoptotische Lymphozyten	45
3.3	PMN phagozytieren <i>S. aureus</i>	46
3.4	PMN phagozytieren <i>E. coli</i>	47
3.5	Annexin-V-/PI-Färbung (Durchflusszytometrie)	49
3.6	PMN phagozytieren apoptotische PMN (Fluoreszenzmikroskopie)	52
3.7	PMN phagozytieren apoptotische PMN (Durchflusszytometrie)	53
3.8	PMN phagozytieren apoptotische PMN (Durchflusszytometrie)	54
3.9	PMN phagozytieren apoptotische PMN (Durchflusszytometrie)	54
3.10	Vollblutphagozytoseversuch	56
3.11	Stimulation der Effektorzellen	58
3.12	Abhängigkeit von Serum	60
3.13	Oberflächenrezeptoren auf PMN	61
3.14	Rezeptorblockade	63
3.15	CRP und SAP	65
3.16	IgG-Depletion	66
3.17	IgG-Opsonisierung	67

Abkürzungen

Ab	Antibody
bp	Basenpaar
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma protein 2
BSA	Bovine serum albumine
CD	Cluster of differentiation
CR	Complement Receptor
CRP	C-reaktives Protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorter
Fc	Fragment cristallizable
Fc γ R	Fc-gamma-Rezeptor
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward scatter channel
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HIS	Hitzeinaktiviertes Serum

Abkürzungen

ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LFA	Lymphocyte function-associated antigen
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	Monoclonal antibody
Mac	Macrophage receptor
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MFG	Milk fat globule
MIP	Macrophage inflammatory protein
NHS	Normales humanes Serum
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PSR	Phosphatidylserinrezeptor
R	Region
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAP	Serum Amyloid P Komponente
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SSC	Sideward scatter channel
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Neutrophile Granulozyten

Als wichtiger Bestandteil der angeborenen zellulären Immunität nehmen polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) vor allem im Rahmen akuter Infektionen eine zentrale Stellung ein und tragen wesentlich zur schnellen Bekämpfung von Pathogenen bei. Wie alle zellulären Bestandteile des Blutes entstammen sie den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und werden unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Interleukinen über die Vorstufen Myeloblast – neutrophiler Promyelozyt – Myelozyt – Metamyelozyt – stabkerniger neutrophiler Granulozyt – ausgereifter polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt gebildet und in die Blutbahn entsandt. Im peripheren Blut gesunder Erwachsener stellen PMN mit 45–74 % die größte Population der Leukozyten dar. Ein Mikroliter Blut enthält etwa 2000–8000 PMN; bei Infektionen oder anderen entzündlichen Prozessen im Körper kann sich die Zahl der Neutrophilen massiv erhöhen [54], [112], [113]. Nur ein geringer Teil der PMN befindet sich im zirkulierenden Blut und etwa die Hälfte davon haftet als marginaler Pool am Gefäßendothel. Etwa 90 % der reifen PMN bleiben als Reserve im Knochenmark. Damit kann eine hohe Anzahl neutrophiler Granulozyten zum Beispiel im Fall einer akuten Entzündung schnell mobilisiert werden [7], [15], [54], [101].

PMN sind im Durchmesser etwa 12–15 μm große Zellen. Ihren Namen haben sie aufgrund ihres unregelmäßig geformten, mehrfach segmentierten Zellkerns und ihrer zahlreichen zytoplasmatischen Granula. Diese enthalten je nach Art bakterizide und

gewebedegradierende Enzyme, aber auch Oberflächenproteine. Der Inhalt der Granula kann intrazellulär an Phagosomen oder über die Fusion der Granula mit der Plasmamembran nach extrazellulär abgegeben werden [17], [112].

Im Vergleich zu anderen Leukozyten sind PMN sehr kurzlebige Zellen: Nach einer Reifungszeit von etwa 15 Tagen im Knochenmark und einer Verweildauer von wenigen Stunden im peripheren Blut können sie anschließend nur noch bis zu 1–2 Tage im Zielgewebe überleben [9], [65], [96].

1.1.1 Extravasation (Austritt aus dem Blutgefäßsystem)

Um aus den Blutgefäßen zum Ort der Infektion zu gelangen, ist die Interaktion der PMN mit dem Endothel entscheidend. Diese erfolgt über Adhäsionsmoleküle, welche unter Einfluss von Entzündungsmediatoren auf der Oberfläche von PMN und Endothelzellen exprimiert werden. Bedeutsame Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen sind die Selektine CD62P (P-Selektin) und CD62E (E-Selektin) sowie ICAM-1. Auf PMN befinden sich die Integrine CD11a/CD18 (LFA-1) und CD11b/CD18 (CR3 oder Mac-1) sowie die Sialyl-Lewis-X-Einheit bestimmter Glycoproteine.

Im Verlauf der Extravasation kommt es zunächst zu einer lockeren Bindung zwischen den Selektinen der Endothelzellen und dem Sialyl-Lewis-X-Liganden auf PMN, was dazu führt, dass die PMN an der Gefäßwand entlang rollen. Über eine Bindung zwischen Leukozytenintegrinen und ICAM-1 haften die Zellen später fester am Endothel, sodass sie dieses schließlich durchdringen und in den Extravasalraum gelangen.

Hier bewegen sich die PMN von Chemotaxinen geleitet zum Entzündungsherd. Bedeutsame Chemotaxine sind unter anderen Komplementfaktoren, bakterielle N-formylierte Peptide, endogene Entzündungsmediatoren wie Leukotrien B₄ und chemotaktische Zytokine (Chemokine) wie IL-8 [25], [58].

Ihren Weg durch die Gewebematrix bahnen sich PMN durch Ausschüttung gewebedegradierender Enzyme aus ihren Granula [58]. In schweren entzündlichen Prozessen kann die Freisetzung dieser Enzyme jedoch erhebliche gewebedestruierende Wirkung

auf Zellen und extrazelluläre Matrix haben [107].

1.1.2 Phagozytose

Die Hauptfunktion neutrophiler Granulozyten im infizierten Gewebe ist die Bekämpfung von Erregern, vornehmlich durch Phagozytose. Als Phagozytose wird die Aufnahme von festen Partikeln (Zellen, Mikroorganismen, Fremdkörper) mit anschließendem intrazellulärem Abbau bezeichnet. Voraussetzung dafür ist, dass der Phagozyt das zu phagozytierende Objekt erkennt und über Rezeptoren bindet. Dies kann über zwei Wege erfolgen: Ein direkter, bei dem Oberflächenstrukturen unmittelbar erkannt werden und ein opsoninvermittelter. Bei Letzterem werden die Zielstrukturen durch Opsonine wie zum Beispiel Komplementkomponenten, Antikörper oder akute-Phase-Proteine beladen, welche an Opsoninrezeptoren der Phagozyten binden [58].

Für die Aufnahme von Mikroorganismen durch PMN sind beide Wege beschrieben. Bekannte Rezeptoren für die direkte Erkennung von pathogenen Strukturen sind CD14 und die Toll like Rezeptoren [88]. Für die opsoninvermittelte Phagozytose sind zwei Rezeptorklassen von Bedeutung: Die Komplementrezeptoren für die Phagozytose von mit Komplementfaktoren opsonisierten Pathogenen und die Fc-Rezeptoren für die Phagozytose von Pathogenen, die mit Antikörpern oder akute-Phase-Proteinen der Pentraxinfamilie opsonisiert sind. PMN im peripheren Blut exprimieren die Fc-Rezeptoren $Fc\gamma RII$ (CD32), $Fc\gamma RIII$ (CD16) und $Fc\alpha R$ (CD89) und die Komplementrezeptoren CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18) [110].

Das Beispiel des Rezeptors CR3, der sowohl Komplement als auch direkt Strukturen auf Streptokokken erkennt, zeigt allerdings, dass eine strenge Unterscheidung zwischen Rezeptoren für die opsoninabhängige und opsoninunabhängige Phagozytose nicht gemacht werden kann [4].

Wenn PMN ein zu phagozytierendes Objekt erkannt und gebunden haben, umschließen sie es mit Pseudopodien und nehmen es in Form eines membranumschlossenen Vesikels, dem Phagosom, auf. Im Zellinneren fusioniert das Phagosom mit den auch als

Lysosomen bezeichneten Granula der PMN zum Phagolysosom. Durch die in den Granula enthaltenen Enzyme, bakteriziden Proteine und Peptide wird der phagozytierte Inhalt getötet und anschließend rasch abgebaut [58].

Zur Erregerabtötung haben PMN darüber hinaus noch einen weiteren Mechanismus, nämlich die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen: Nach Aktivierung, zum Beispiel durch Phagozytose oder Stimulation mit Zytokinen, werden – im wesentlichen über die Enzyme NADPH-Oxidase, Myeloperoxidase und Superoxiddismutase – reaktive Sauerstoffspezies generiert. Als bakterizide Produkte haben dabei Wasserstoffperoxid (H_2O_2), oxidierte Halogene und oxidierende Radikale besondere Bedeutung. Dieser Prozess findet unter Sauerstoffverbrauch statt und wird deshalb auch als „oxidative burst“ bezeichnet [8], [44].

Schließlich sei noch ein weiterer mikrobizider Mechanismus von PMN erwähnt: Ist eine Phagozytose bei sehr großen Erregern, zum Beispiel Würmern, nicht möglich, können Granulainhalte nach außen hin abgegeben werden und die Pathogene angreifen. Dieser Vorgang hat freilich ein stark gewebeschädigendes Potenzial [58], [107].

1.1.3 PMN im Netzwerk von Entzündungsmediatoren

Im Gewebe sind PMN stets einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren ausgesetzt, durch welche sie in ihrer Aktivität stimuliert, gehemmt oder in ihren phänotypischen Eigenschaften verändert werden können [41]. PMN nehmen auch selbst durch die Abgabe von Zytokinen und Lipidmediatoren an die Umgebung Einfluss auf den Entzündungsverlauf. Sie sind dabei in der Lage, Zytokine verschiedener Art zu generieren und an die Umgebung abzugeben. Neben proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen ($TNF-\alpha$, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β) sind sie auch Quelle von antiinflammatorischen Mediatoren (TGF- β), Wachstumsfaktoren (G-CSF) und Angiogenesefaktoren (VEGF) [19]. Neben Zytokinen können PMN auch über Lipidmediatoren den Entzündungsprozess modulieren: Sie synthetisieren die Entzündungsmediatoren Prostaglandin E₂ [115], Thromboxan A₂ [43] und Leukotrien B₄ [39]. Leukotrien B₄ kann durch die

thrombozytäre 12-Lipoxygenase zu den antiinflammatorischen Lipoxinen A₄ und B₄ umgesetzt werden [94].

Reife PMN sind also zur weiteren Differenzierung und zur Proteinbiosynthese fähig, und nicht, wie lange Zeit geglaubt, enddifferenzierte Effektorzellen, deren Aufgabe sich in der Phagozytose von Erregern erschöpft.

1.2 Apoptose und ihre Bedeutung im Entzündungsvorgang

Der als Apoptose bezeichnete programmierte Zelltod stellt einen wichtigen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase in vielzelligen Organismen dar, über den überschüssige oder potenziell schädliche Zellen entfernt werden können [61].

Als aktiver und Energie verbrauchender Prozess verläuft die Apoptose nach einem festgelegten Programm, das in den jeweiligen Zellen über zwei Wege eingeleitet werden kann: Beim extrinsischen Weg ist das Auslösesignal der Apoptose die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren auf der Zellmembran. Ein Beispiel aus der Familie der Todesrezeptoren ist der Fas-Rezeptor (CD95) [95]. Beim intrinsischen Weg wird die Apoptose durch Freisetzung von Cytochrom C und anderen apoptosefördernden Proteinen aus den Mitochondrien initiiert. Diese Freisetzung kann viele verschiedene Ursachen haben, zum Beispiel Entzug von Wachstumsfaktoren oder Zellschädigungen wie Hypoxie oder Bestrahlung [46].

Beide Wege führen zur Aktivierung von Caspasen (Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen), einer Gruppe von Enzymen, die durch Spaltung von intrazellulären Proteinen oder durch Aktivierung anderer Enzyme die Apoptose ausführen und damit die apoptotischen strukturellen Veränderungen der Zelle hervorrufen [76]. Einen Überblick über die Vorgänge bei der Apoptose gibt Abb. 1.1.

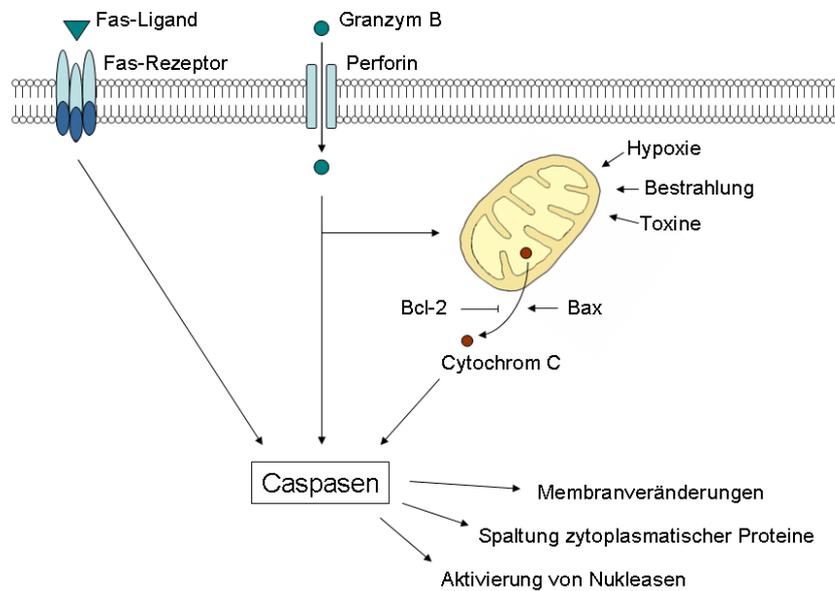


Abbildung 1.1: Vorgänge bei der Apoptose (stark vereinfachtes Schema). Die Ligandenbindung an Todesrezeptoren (extrinsischer Weg) und die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien (intrinsischer Weg) führen zur Aktivierung einer komplexen Kaskade einer Vielzahl von Caspasen. Die Freisetzung von Cytochrom C wird unter anderem durch intrazelluläre Proteine der Bcl-2- oder Bax-Familie reguliert. Überschneidungen von intrinsischem und extrinsischem Weg sind möglich: Granzym B, das von zytotoxischen T-Zellen über durch Perforin gebildete Membranporen in die Zellen eingeschleust wird, kann die Apoptose sowohl durch Freisetzung von Cytochrom C als auch durch direkte Aktivierung von Caspasen auslösen [99]. Abbildung in Anlehnung an Denk und Zatloukal 2001 [25].

Zahlreiche morphologische und biochemische Veränderungen kennzeichnen die apoptotische Zelle: Sehr früh kommt es zu einer Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran [68]. Die Zerstörung der Zytoskelettstruktur und die Kondensierung des Zellkerns führen zu einer Abnahme des Zellvolumens, die Zellorganellen bleiben jedoch strukturell intakt [22]. Die Kernmembran löst sich auf und Endonukleasen spalten die DNA in etwa 180 bp große nukleosomale Fragmente [114]. Schließlich kommt es zum *membrane blebbing*, zur Bildung von Bläschen in der Zellmembran und kleine *apoptotic bodies*, Apoptosekörperchen, schnüren sich mit Zellinhalt ab. Diese werden schnell von Phagozyten aufgenommen und abge-

baut. Da die Plasmamembran der apoptotischen Zellen und der Apoptosekörperchen intakt bleiben, wird deren Inhalt nicht freigesetzt und löst so keine Schädigung des umliegenden Gewebes aus [22].

Vom programmierten apoptotischen Zelltod ist der provozierte Zelltod, die Nekrose, abzugrenzen. Diese entsteht nach Zellverletzungen unterschiedlichster Art, sie kann aber auch als sekundäre Nekrose auf die Apoptose folgen, wenn die apoptotischen Zellen nicht rechtzeitig abgeräumt werden. Die Nekrose zeichnet sich durch Anschwellen der Zellen (Onkose), Zerstörung der Zellorganellen und frühen Verlust der Membranintegrität aus. Der nekrotische Zelltod resultiert in einem Zerfall der Zellen mit Freisetzung des Inhalts ins umgebende Gewebe und konsekutiver Entzündungsreaktion. Im Gegensatz zur caspasenabhängigen Apoptose verläuft der nekrotische Zelltod passiv und ohne Regelmäßigkeiten [36].

Während die Nekrose immer ein pathologischer Vorgang ist, kommt die Apoptose als physiologischer Prozess zum Beispiel während der Embryonalentwicklung, im normalen Gewebeumsatz oder zur Eliminierung entarteter Zellen vor. Fehlregulierte Apoptose kann aber auch pathologische Bedeutung haben. Die überschießende Apoptose bei neurodegenerativen Erkrankungen und die unzureichende Apoptose bei neoplastischen Erkrankungen sind Beispiele dafür [61], [86].

Auch für neutrophile Granulozyten in Entzündungsvorgängen spielt die Apoptose eine wichtige Rolle. PMN sind kurzlebige Zellen, die nach einer Überlebenszeit von wenigen Tagen im Gewebe spontan apoptotisch werden. Experimentell kann die Apoptose von PMN zwar durch Entzündungsmediatoren wie Interleukine, IFN- γ , G-CSF, GM-CSF und LPS hinausgezögert werden, verhindern lässt sie sich jedoch nicht. Neben den bereits beschriebenen allgemeinen Charakteristika apoptotischer Zellen erscheinen apoptotische PMN typischerweise als runde kompakte Zellen mit kondensierten abgerundeten Zellkernen (Abb. 2.2). Neben dem kennzeichnenden Verlust von CD16 zeigen sie eine verminderte Expression auch anderer Oberflächenmoleküle wie CD31, CD50 und CD66 [22], [29].

Erkenntnisse aus *in vitro*-Experimenten sprechen dafür, dass die Apoptose neutrophiler Granulozyten entzündungslimitierend wirkt: Apoptotische PMN verlieren funktionelle Fähigkeiten wie Degranulation und Bildung entzündungsfördernder Zytokine. Während der Apoptose bleibt die Zellmembran der PMN intakt und gewebeschädigende Inhalte werden bis zur Aufnahme durch Phagozyten nicht freigesetzt. Schließlich führt die Phagozytose apoptotischer PMN durch Makrophagen zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und zu einer gesteigerten Freisetzung entzündungshemmender Substanzen (vgl. Abschnitt 1.3) [50].

1.3 Phagozytose apoptotischer Zellen

Nicht nur in entzündeten Geweben ist eine effiziente Beseitigung von apoptotischen Zellen von Bedeutung. Allgemein werden in vitalen Geweben anfallende apoptotische Zellen schnell von Phagozyten aufgenommen. Dieser – auch als „letztes Stadium der Apoptose“ [33] bezeichnete – Vorgang ist notwendig, um einer Gewebeschädigung durch Freisetzung von entzündungsauslösenden oder immunogenen Zellinhalten vorzubeugen. Selbst in Geweben, in denen ein hoher Zellumsatz stattfindet, führen apoptotische Zellen zu keiner Entzündungsreaktion. Die Effizienz der Phagozytose apoptotischer Zellen in gesunden Organismen zeigt sich auch darin, dass apoptotische Zellen in intakten Geweben kaum zu finden sind [66].

Professionelle Phagozyten wie Makrophagen und dendritische Zellen [1], [51], aber auch beispielsweise Mesangiumzellen [57] sind zur Aufnahme befähigt.

Die Mechanismen, über die apoptotische Zellen von Phagozyten erkannt und aufgenommen werden, sind in den letzten Jahren vielfach untersucht worden. Dabei sind auf der einen Seite Oberflächenstrukturen auf apoptotischen Zellen, die als „Eat me“-Signale auf Phagozyten wirken, und auf der anderen Seite Aufnahmerezeptoren auf Phagozyten gefunden worden. Als eines der wichtigsten Signale für die Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen wird die Phosphatidylserintranslokation auf

die Membranaußenseite apoptotischer Zellen gesehen [32]. Weitere „Eat me“-Signale sind Veränderungen von oberflächlichen Kohlenhydratstrukturen mit Exposition von Galactose, N-Acetylglucosamin und Mannose [27] sowie strukturelle Veränderungen des Adhäsionsmoleküls ICAM-3 [72].

Neben „Eat me“-Signalen gibt es aber auch „Leave me“-Signale. Ein solches stellt das Oberflächenmolekül CD31 dar, das auf vitalen Zellen exprimiert wird. Es dient als „Abstoßungsmolekül“ und verhindert die Aufnahme der Zellen durch Phagozyten. Auf apoptotischen Zellen ist CD31 verändert und vermittelt nicht mehr Abstoßungssignale sondern eine Bindung zum Phagozyten [18].

Durch *in vitro*-Versuche sind eine Reihe von Rezeptoren auf Phagozyten entdeckt worden, die an der Erkennung und Aufnahme apoptotischer Zellen beteiligt sind. Dazu gehören die Integrine $\alpha v \beta 3$ und $\alpha v \alpha 5$ [2], [92], CD14 [26], die Scavenger-Rezeptoren CD36, CD68, Klasse A Makrophagen Scavenger Rezeptor (SR-A) und der Lektin-like oxidized low-density lipoprotein particle receptor 1 (LOX-1) [78], [82], [83], [93]. Von Fadok et al. ist 2000 ein Phosphatidylserinrezeptor auf Makrophagen beschrieben worden, der lange Zeit als der zentrale Aufnahmerezeptor für apoptotische Zellen angesehen wurde [34], [35], [53], [69], [111]. In ihren Experimenten haben Fadok et al. einen monoklonalen Antikörper, *mAb 217*, gegen mit β -Glucan und TGF- β stimulierte Makrophagen produziert. Die Bindung dieses Antikörpers an stimulierte Makrophagen konnte durch Phosphatidylserin-Liposomen inhibiert werden und die Blockierung von Makrophagen mit *mAb 217* führte *in vitro* zu einer Hemmung der Phagozytose apoptotischer Zellen. Fadok et al. schlussfolgerten daraus, dass *mAb 217* ein Antikörper gegen den Rezeptor für Phosphatidylserin sei [34]. Von Cui et al. wurde 2004 allerdings gezeigt, dass es sich bei dem vermeintlichen Phosphatidylserinrezeptor um ein nukleäres Protein handelt [24] und Experimente an Phosphatidylserinrezeptordefizienten Mäusen haben ergeben, dass diese Tiere Defekte in der Differenzierung verschiedener Organe während der Embryogenese, jedoch keine gestörte Phagozytose apoptotischer Zellen aufweisen [14]. Ob es einen Phagozytoserezeptor gibt, der direkt

Phosphatidylserin erkennt, bleibt unklar.

Apoptotische Zellen können durch Serumfaktoren wie Komplementproteine, Immunglobuline, akute-Phase-Proteine, Kollektine und antikoagulatorische Proteine opsonisiert werden. Für die opsoninabhängige Phagozytose spielen die Komplementrezeptoren und Fc γ Rezeptoren eine wichtige Rolle [49].

Eine Übersicht über die verschiedenen Mechanismen bei der Erkennung apoptotischer Zellen gibt Abb. 1.2.

Nach der Erkennung und Bindung führen nach intrazellulär geleitete Transduktions-signale zu Zytoskeletumbildungen, die zur Internalisation der apoptotischen Zelle in den Phagozyten führen. Hier wird die apoptotische Zelle schließlich intraphagozytär in Phagolysosomen abgebaut [66].

Wie beschrieben, ist zur Vermeidung einer entzündlichen Begleitreaktion der Apoptose die schnelle Elimination der apoptotischen Zellen wesentlich. Darüber hinaus wird die Aufnahme apoptotischer Zellen von einer antiinflammatorischen Zytokinantwort seitens der Makrophagen begleitet: Nach der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen reagieren diese mit einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-8, IL-1, GM-CSF, TNF- α und IL-12 und mit einer gesteigerten Sekretion von antiinflammatorischen Substanzen wie TGF- β , IL10 und Prostaglandin E2 [31], [105].

Störungen in der Phagozytose apoptotischer Zellen werden für die Entstehung von schweren entzündlichen Erkrankungen verantwortlich gemacht: So wird eine verminderte Phagozytose apoptotischer Zellen in der Pathogenese der Autoimmunerkrankung systemischer Lupus erythematosus (SLE) diskutiert [52]. Auch bei Patienten mit schweren entzündlichen Erkrankungen der Atemwege im Rahmen von Bronchiektasen oder der Stoffwechselkrankheit Mukoviszidose wurde eine verminderte Phagozytose apoptotischer Zellen festgestellt [103].

Wenngleich die Phagozytose apoptotischer Zellen physiologischerweise von einer entzündungshemmenden Reaktion begleitet wird und es selbst in Geweben mit hohem

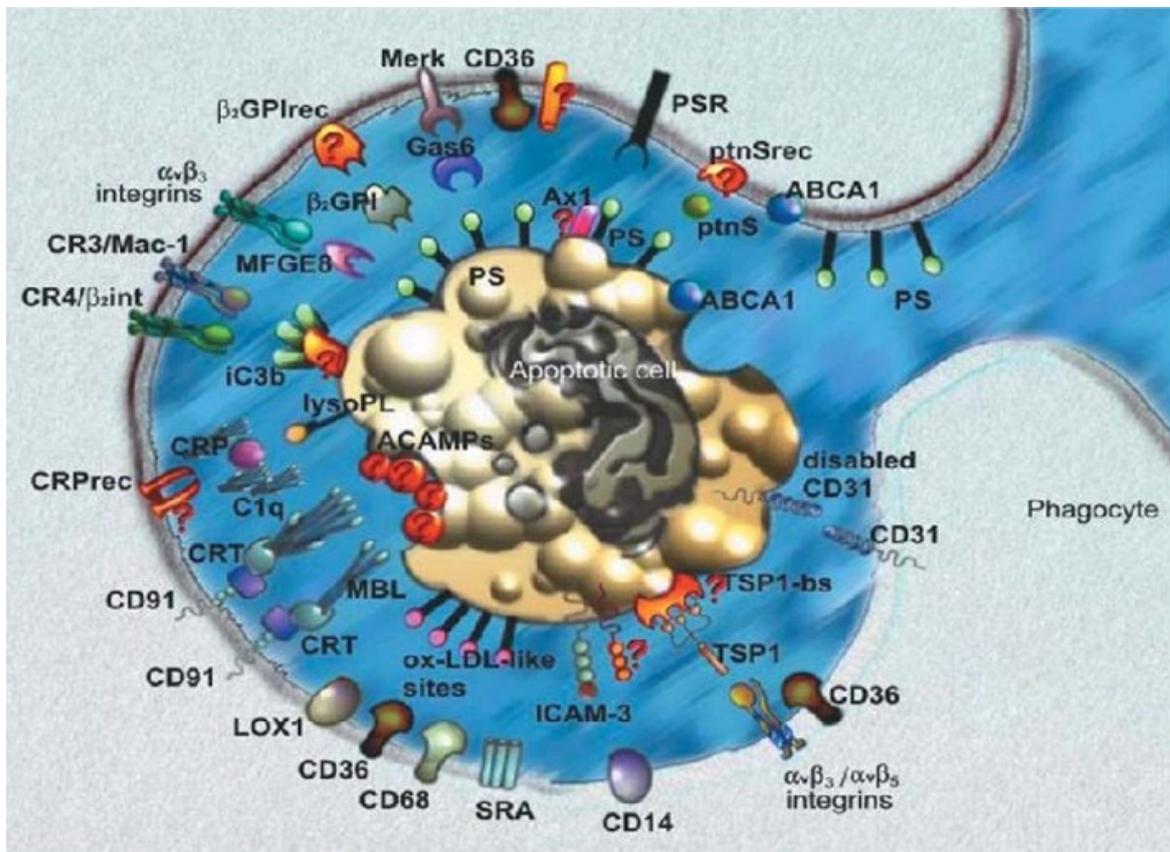


Abbildung 1.2: Die phagozytotische Synapse. Die Oberfläche apoptotischer Zellen weist ein breites Spektrum an „Eat-me“-Signalen auf, die direkt oder über Brückenmoleküle von verschiedenen Rezeptoren auf Phagozyten erkannt werden. Erstaunlicherweise exprimieren nicht nur apoptotische Zellen, sondern auch Phagozyten Phosphatidylserin (PS) auf ihrer Außenmembran. Die genaue Bedeutung von PS auf Phagozyten ist nicht bekannt. Legende: rec: Rezeptor, ABCA: ATP-binding cassette transporter, ptnS: Protein S , PSR: Phosphatidylserinrezeptor, Ax1: Annexin 1, Merck: Mer tyrosine kinase, Gas6: Growth arrest specific gene, β_2 GPI: β_2 -Glycoprotein I, MFGE8: Milk-fat globule epidermal growth factor 8, C: Complement, CR: Complement receptor, lyso PL: Lysophospholipide, CRP: C-reactive protein, ACAMPs: Apoptotic cell associated molecular patterns CRT: Calreticulin, MBL: Mannose binding lectin, LOX1: Oxidized low-density lipoprotein receptor 1, SRA: Scavenger receptor A, ICAM3: Intercellular adhesion molecule 3, TSP1: Thrombospondin 1. Noch nicht charakterisierte Oberflächenmoleküle sind mit Fragezeichen bezeichnet. Natürlich findet die Umschließung und Internalisation der aufgenommenen Zelle erst nach den Bindungen an den Rezeptoren statt und nicht, wie es dieses Schema suggeriert, bereits vorher. Abbildung aus: Moreira et al. (2002) [74].

Zellumsatz zu keiner begleitenden Entzündungsreaktion kommt, konnte andererseits auch gezeigt werden, dass artifiziell ausgelöste massiv gesteigerte Apoptose zu einer begleitenden Entzündungsreaktion mit Einstrom von PMN führt [71], [102]. Auch in entzündeten Geweben, in denen viele apoptotische Zellen entstehen, stellen PMN die vorherrschende Zellart dar. Deren Funktion für die Phagozytose apoptotischer Zellen ist hingegen bisher weitgehend unbekannt.

1.4 Ziel der Arbeit

In entzündeten Geweben ist die Apoptose von Entzündungszellen entscheidend für die Begrenzung der Entzündung. Um Gewebeschäden zu verhindern, müssen apoptotische Zellen durch Phagozyten schnell und effizient abgeräumt werden. Es ist viel über Apoptosevorgänge bekannt und die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Makrophagen oder dendritische Zellen ist weitgehend untersucht. Bei den meisten infektionsinduzierten akuten Entzündungen und in vielen Autoimmunreaktionen bilden jedoch nicht Makrophagen, sondern PMN die zahlenmäßig größte Phagozytenpopulation. Dennoch ist über die Funktion neutrophiler Granulozyten für die Phagozytose apoptotischer Zellen wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob PMN apoptotische Zellen *in vitro* phagozytieren, und wenn dies so ist, die Aufnahmemechanismen für diesen Vorgang zu erforschen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage BP61S	Sartorius, Göttingen
CO ₂ -Inkubator	Jouan, Unterhaching
Durchflusszytometer FACS-Calibur®	Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Mikroskope	
Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Axioskop 40	Carl Zeiss, Jena
AxioCam HRc (Digitale Mikroskopkamera)	Carl Zeiss, Jena
pH-Meter inolab	WTW GmbH, Weilheim
Rüttler Vibrofix VF1 Electronic	Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, Staufen
Sterile Werkbank	Biohit, Köln
Stratalinker® 2400	Stratagene, La Jolla, USA
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen

Zentrifugen

Multifuge 3 SR	Kendro (Heraeus), Langenselbold
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zytozentrifuge Cytospin3	Shandon, Frankfurt am Main

2.1.2 Laborbedarf

Bakterienfilter, rund, 0,45 μm , steril	Schleicher und Schuell, Dassel
Blutentnahmeröhrchen Li-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht
Blutentnahmeröhrchen Serum	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser, rund, 15 mm	Hecht-Assistent, Sondheim
Gewebekulturplatten, 6-, 12-, 24-, 48-, 96-Loch, Flachboden	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebekulturplatten, 96-Loch, Rundboden	Greiner bio-one, Frickenhausen
Glasobjektträger Superfrost®	Menzel, Braunschweig
Mikrotiterplatte 96-Loch, Spitzboden, mit Abdeckung	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipetten 5, 10, 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 1-10 μl , 10-100 μl , 100-1000 μl	Greiner bio-one, Frickenhausen
Plastikröhrchen 15 ml, Polystyrol	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikröhrchen 50 ml, Polypropylen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml, Polypropylen	Eppendorf, Hamburg
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
U-Röhrchen für die Durchflusszytometrie	Micronic, Lelystad, Niederlande
Zählkammern	Neubauer, Marienfeld

Zellkulturflaschen Greiner bio-one, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth, Karlsruhe
Annexin-V-FITC	Roche Diagnostics, Mannheim
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma, Deisenhofen
C-reaktives Protein (CRP) aus humanem Serum	Calbiochem, Bad Soden
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Karlsruhe
Giemsa-Färbelösung	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Rekombinantes humanes G-CSF	PeptoTech, Offenbach
Rekombinantes humanes GM-CSF	PeptoTech, Offenbach
HEPES	Biochrom, Berlin
Histopaque® 1119	Sigma, Deisenhofen
Rekombinantes humanes IFN- γ	PeptoTech, Offenbach
IgG aus humanem Serum	Sigma, Deisenhofen
IMAGEN® Mounting Fluid	Dako, Hamburg
Immersionsöl	Carl Zeiss, Jena
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma, Deisenhofen
Lipopolysaccharide <i>E. coli</i> 0111:B4	Sigma, Deisenhofen
Lymphozytenseparationsmedium 1077	PAA, Pasching, Österreich
Rekombinantes humanes M-CSF	PeptoTech, Offenbach

2 Material und Methoden

2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PBS (1×) sterile Lösung	Apotheke der Universität zu Lübeck, Lübeck
PBS (10×) sterile Lösung	Gibco, Karlsruhe
PBS, Instamed, Dulbecco w/o Mg, Ca	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Percoll®	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Phagotest®	Orpegen Pharma, Heidelberg
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma, Deisenhofen
PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma, Deisenhofen
Propidiumiodid-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Protein G Sepharose 4 Fast flow	Amersham Bioscience, Freiburg
Protein S	Kordia, Leiden, Niederlande
RPMI 1640 Medium	Sigma, Deisenhofen
Serum Amyloid P (SAP) aus humanem Serum	Calbiochem, Bad Soden
Trypanblau-Färbelösung 0.4 %	Sigma, Deisenhofen

2.1.4 Kulturmedien und Puffer

Annexin-V-Puffer	10 mM HEPES + 140 mM NaCl + 5 mM CaCl ₂ pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)
Kulturmedium	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium + 50 µM 2-Mercaptoethanol + 2 mM L-Glutamin + 10 mM HEPES + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 10 % FCS
FACS-Puffer	PBS + 1 % humanes Serum + 1 % BSA + 0.1 % Natrium- azid
Erylysepuffer	8,29 g/l NH ₄ Cl + 0,037 g/l EDTA + 1 g/l KHCO ₃ pH 7,5 (eingestellt mit NaOH)

2.1.5 Antikörper

Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper

Maus-anti-human...

CD3 (FITC, IgG1, Klon UCHT1)	Dako, Hamburg
CD14 (PE/FITC, IgG2a, Klon Tük4)	Dako, Hamburg
CD36 (FITC, IgM, Klon CB38/NL07)	BD Pharmingen, Heidelberg
IgG (PE, IgG1, Klon G18145)	BD Pharmingen, Heidelberg

Unkonjugierte Antikörper

Maus-anti-human...

CD11b (IgG1, Klon ICRF44)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD11c (IgG1, Klon B-ly6)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD14 (IgG1, Klon 18D11)	Diatec, Hamburg
CD16 (F(ab') ₂ , Klon 3G8)	Nephrologie, Universität Leiden, Niederlande

CD18 (IgG1, Klon 7E4)	Beckman Coulter, Krefeld
CD32 (IgG, Klon IV.3)	Nephrologie, Universität Leiden, Niederlande
CD35 (IgG1, Klon J3.D3)	Beckman Coulter, Krefeld
CD64 (F(ab') ₂ , Klon 10.1)	Ancell Alexis, Grünberg
Phosphatidylserin-Rezeptor (PSR) (Hybridomkulturüberstand, IgM, mAb 217)	Dr. Fadok, Denver, USA

Sekundärantikörper

Anti-Maus-IgG (PE, FITC) (F(ab') ₂) aus Kaninchen	Dako, Hamburg
Anti-Maus-IgM (Alexa Fluor 568) (IgG2a) aus Kaninchen	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Isotypkontrollantikörper

Maus IgG2b (PE)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus IgG1 (PE, FITC)	Dako, Hamburg
Maus IgM (unkonjugiert)	Biocarta, Hamburg
Maus IgG1 (unkonjugiert)	Beckman Coulter, Krefeld

Software

CellQuest®	BD Pharmingen, Heidelberg
WinMDI 2.8	Joseph Trotter, Scripps, San Diego, USA)
Graphpad Prism ®Version 5.00	Graphpad Software San Diego, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturbedingungen

Als Zellkulturmedium für die Versuche wurde Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium verwendet, dem 50 μM 2-Mercaptoethanol, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin zugesetzt wurden. Im Folgenden wird dieses kurz als Medium bezeichnet. Falls nicht anders angegeben, wurde das Medium stets mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS versetzt.

Die Inkubation der Zellen im Zellkulturschrank fand bei einer Temperatur von 37°C und gesättigter Wasserdampfatmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 % statt.

Medienzusätze

Bei einigen Versuchen wurde dem Medium humanes Serum oder heparinisiertes humanes Plasma zugefügt.

Zur Gewinnung von Serum wurde von freiwilligen Spendern etwa 10 ml Blut abgenommen und nach abgelaufener Gerinnung und Zentrifugation bei 2600 \times g der Überstand zellfrei abgenommen.

Plasma wurde bei der Isolation der neutrophilen Granulozyten (in 2.2.2 beschrieben) nach der Zentrifugation des Gradienten aus Histopaque® 1119, Lymphozytenseparationsmedium 1077 und heparinisiertem Vollblut als „Fraktion 4“ gewonnen.

Zur Hitzeinaktivierung der Medienzusätze wurden diese für 30 Minuten im Wasserbad bei 56°C erhitzt. Damit wurden hitzelabile Serumfaktoren, insbesondere Komponenten des Komplementsystems, inaktiviert.

2.2.2 Isolation von neutrophilen Granulozyten aus humanem peripherenvenösem Blut

Genehmigt durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck (26.07.2005, Az: 05-124).

Die für die Versuche benötigten neutrophilen Granulozyten wurden aus humanem Vollblut isoliert, das gesunden Probanden aus einer oberflächlichen Armvene in Heparinröhrchen abgenommen wurde. Im Folgenden wird die Isolation von PMN aus 4,5 ml heparinisiertem Vollblut beschrieben (sämtliche Isolationsschritte fanden bei Raumtemperatur statt):

In einem 15-ml-Polystyrolröhrchen wurden 5 ml Histopaque® 1119, 2 ml Lymphozytenseparationsmedium 1077 und 4,5 ml heparinisieretes Vollblut übereinander geschichtet und für 20 Minuten bei $800 \times g$ zentrifugiert. Hierdurch wurde das Blut in vier Fraktionen aufgetrennt, von unten nach oben waren dies ein Bodensatz aus Erythrozyten (Fraktion 1), eine granulozytenreiche Phase Histopaque® 1119, die noch vereinzelt Erythrozyten enthielt (Fraktion 2), eine vorwiegend aus Lymphozyten und Monozyten bestehende Zellschicht (Fraktion 3) und Plasma (Fraktion 4) (Abb. 2.1). Zur weiteren Aufreinigung der granulozytenreichen Fraktion 2 wurde diese mit einer Transferpipette vorsichtig abgesaugt, mit PBS-Puffer gewaschen, in 2 ml Medium aufgenommen und auf einen Percollgradienten geschichtet. Dieser bestand aus 5 Schichten mit den Dichtewerten 1,105 g/ml (85 % isotonierte Percoll-Stammlösung verdünnt in Medium), 1,100 g/ml (80 %), 1,093 g/ml (75 %) 1,087 g/ml (70 %), und 1,081 g/ml (65 %). Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei $800 \times g$ wurden die Zellfraktionen zwischen der 80 %- und der 70 %-Percoll®-Schicht gesammelt, mit PBS-Puffer gewaschen und in Medium resuspendiert.

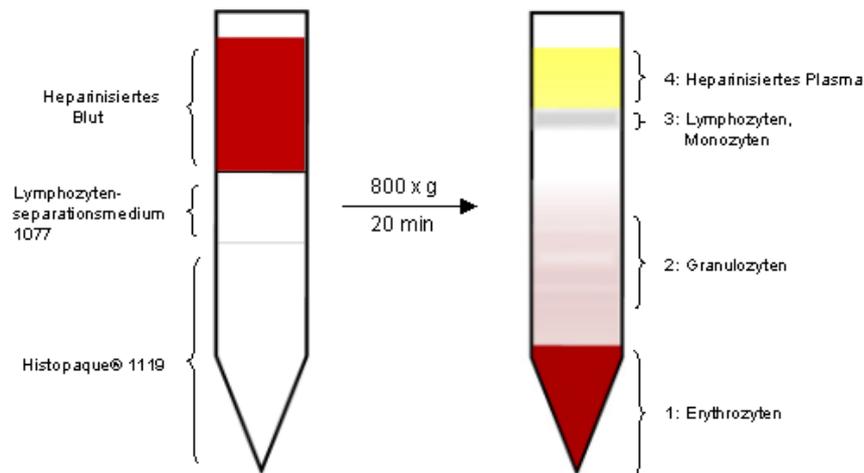


Abbildung 2.1: Isolation von neutrophilen Granulozyten durch Dichtezentrifugation. Auf Histopaque® 1119 und Lymphozytenseparationsmedium 1077 wurde heparinisiertes Blut geschichtet (linkes Bild). Nach der Zentrifugation ergaben sich die mit 1–4 bezeichneten Zellfraktionen (rechtes Bild).

Reinheit und Vitalität der isolierten neutrophilen Granulozyten

Nach der Isolierung wurde die Reinheit der gewonnenen PMN kontrolliert, indem auf einem nach Giemsa gefärbten Zytozentrifugenpräparat mindestens 200 Zellen mikroskopisch untersucht wurden. Demnach betrug die Reinheit der durch diese Isolationsmethode gewonnenen Granulozyten stets über 99 %. Unter den Granulozyten waren neben den neutrophilen Granulozyten spenderabhängig bis zu 5 % eosinophile Granulozyten. Die Vitalität der Zellen wurde mittels Trypanblaufärbung getestet. Trypanblau ist ein Farbstoff, der membrandefekte Zellen blau anfärbt. Die PMN waren stets zu über 99 % vital, das heißt Trypanblau-negativ.

2.2.3 Makrophagen und Lymphozyten

Isolation von Lymphozyten und Monozyten aus *Buffy coats*

Die Isolation von Monozyten und Lymphozyten erfolgte unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur aus *Buffy coats*, die freundlicherweise vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck bereitgestellt wurden. Ein *Buffy coat* enthielt in einem Volumen von ca. 50 ml stark angereicherte Leukozyten einer 450 ml Blutspende. Zur weiteren Aufreinigung wurde der Inhalt des *Buffy coats* im Verhältnis 1:6 mit PBS-Puffer verdünnt und 25 ml dieser Verdünnung auf einen Gradienten von 12,5 ml Histopaque® 1119 und 12,5 ml Lymphozytenseparationsmedium 1077 analog zum ersten Schritt der Granulozytenaufreinigung wie in 2.2.2 beschrieben geschichtet und zentrifugiert. Die dadurch entstandene, vorwiegend aus Lymphozyten und Monozyten bestehende Zellschicht zwischen Lymphozytenseparationsmedium 1077 und *Buffy coat*-Verdünnung („Fraktion 3“) wurde entnommen und zur Elimination von Thrombozyten dreimal bei $140 \times g$ in PBS-Puffer gewaschen.

Separation von Monozyten und Lymphozyten aus PBMCs und Generierung von Makrophagen aus Monozyten

Die im vorigen Abschnitt gewonnenen Zellen wurden in einer Konzentration von 8×10^6 Zellen pro ml in Medium aufgenommen. 10 ml dieser lympho-monozytären Zellsuspension wurden in eine Zellkulturflasche gegeben, und für zwei Stunden im Zellkulturschrank liegend inkubiert. In dieser Zeit adhärten die Monozyten an der Polystyroloberfläche am Boden der Zellkulturflaschen. Danach wurde der Mediumüberstand mit den nichtadhärenten Lymphozyten abgenommen und in eine andere Zellkulturflasche gegeben. Die adhärenen Monozyten wurden zweimal mit 37°C vorgewärmten Medium vorsichtig überspült um noch verbliebene nichtadhärente Zellen zu entfernen. Dann wurde auf die Zellschicht 10 ml 37°C warmes Medium gegeben, das 100 ng/ml M-CSF enthielt.

Nach acht Tagen wurden die adhärennten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturflasche abgelöst und als Makrophagen für die Versuche verwendet.

Die Lymphozyten wurden in der Zeit, in der sich die Monozyten zu Makrophagen differenzierten, in Konzentrationen von 5×10^6 Zellen pro ml in Zellkulturflaschen unter Zellkulturbedingungen aufbewahrt. Nach sieben Tagen waren noch etwa 95 % der Lymphozyten vital (Trypanblau negativ). Vor der Verwendung für die Phagozytoseversuche wurde bei den Lymphozyten wie in 2.2.7 beschrieben mittels Staurosporin die Apoptose induziert.

2.2.4 Zellzählung in der Zählkammer

Die Zählung der Zellen erfolgte nach Färbung mit Kristallviolett in einer Zählkammer nach Neubauer mit einer Tiefe von 0,1 mm und einer Grundfläche von $0,0625 \text{ mm}^2$ pro Kleinquadrat. Nach Auszählen der Zellen in 16 Kleinquadraten wurde die Konzentration der Zellsuspension berechnet.

2.2.5 Herstellung von Zytospinpräparaten und Giemsa-Färbung

Zellsuspensionen von 100.000 Zellen in $100 \mu\text{l}$ PBS wurden mit einer Zytocentrifuge bei $400 \times g$ auf Objektträger zentrifugiert. Diese Zytospinpräparate wurden anschließend für 5 Minuten in Methanol fixiert, luftgetrocknet und dann für 30 Minuten in Giemsa-Färbelösung (1:20-Verdünnung von Giemsa-Stammlösung in deionisiertem Wasser) gefärbt. Nach Abspülen der gefärbten Präparate mit Leitungswasser wurden sie lichtmikroskopisch beurteilt.

2.2.6 Darstellung von Oberflächenstrukturen auf PMN mit monoklonalen Antikörpern

Membranrezeptoren

Um die Expression von Oberflächenrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurden 500.000 PMN in FACS-Puffer aufgenommen und mit den Antikörpern gegen die zu testenden Oberflächenstrukturen in Konzentrationen von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CD14, CD35, CD18, CD11b, CD11c, CD16, CD32), 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (PSR), 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (CD36), für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurden fluoreszenzfarbstoffmarkierte Antikörper, die gegen die ersten Antikörper gerichtet waren, in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zur Zellsuspension gegeben und wiederum für 20 Minuten auf Eis inkubiert (Letztgenannter Schritt entfiel beim CD36-Ansatz, da der Anti-CD36-Antikörper bereits fluoreszenzfarbstoffmarkiert war). Negativkontrollen erfolgten mit unspezifischen Antikörpern vom entsprechenden Isotyp. Nach anschließendem zweimaligem Waschen mit eiskaltem FACS-Puffer wurden die Zellen in 1 %-iger Paraformaldehydlösung fixiert und durchflusszytometrisch untersucht. Aus jeder Probe wurden 10.000 Zellen aufgezeichnet. Nur Zellen, die im FSC/SSC-Dotplot vitalen PMN entsprachen, wurden bei der Auswertung berücksichtigt.

IgG

Um die Bindung von IgG auf der Oberfläche von apoptotischen PMN zu untersuchen, wurden die Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur in autologem Serum inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit FACS-Puffer erfolgte die anschließende Antikörperfärbung in Analogie zum eben beschriebenen Verfahren mit Anti-human-IgG PE in einer Konzentrationen von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Zellen wurden wie beschrieben fixiert und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.7 Apoptose

Methoden zur Induktion der Apoptose

Induktion der Apoptose bei Lymphozyten durch Staurosporin Staurosporin, ein Alkaloid aus *Streptomyces*-Spezies, ist ein unspezifischer Tyrosinkinaseinhibitor. Über im Einzelnen noch unbekannte Mechanismen kann durch Staurosporin in fast allen Säugetierzellen eine schnelle Apoptose ausgelöst werden [59], [98].

Die Apoptose von Lymphozyten wurde hier durch Zugabe von Staurosporin zur Zellsuspension in einer Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$ induziert. Nach 18 Stunden Inkubation unter Zellkulturbedingungen wurden die Zellen einmal gewaschen und in 4 ml Medium aufgenommen. Zur Elimination von Zelldetritus wurde diese Zellsuspension in einem 50 ml Polypropylenröhrchen vorsichtig auf 8 ml vorgelegtes Lymphozytenseparationsmedium geschichtet. Dieser Gradient wurde anschließend bei $700 \times g$ ohne Bremse für 10 Minuten zentrifugiert. Zelltrümmer setzten sich dabei als Pellet am Boden ab, die apoptotischen Lymphozyten wurden aus der Interphase zwischen den beiden Schichten abgesaugt.

Induktion der Apoptose bei neutrophilen Granulozyten durch UV-Bestrahlung

UV-Bestrahlung führt über Schädigung nukleärer DNA, direkte Aktivierung von Todesrezeptoren und über die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien zur Einleitung der Apoptose [63].

Zur Induktion der Apoptose durch UV-Bestrahlung wurden PMN in einer Konzentration von 20×10^6 Zellen pro ml in Medium eingestellt. Jeweils $350 \mu\text{l}$ dieser Zellsuspension wurden in eine Vertiefung einer 12-Lochplatte gegeben. Die Platte mit den Zellen wurde in das UV-Bestrahlungsgerät Stratalinker® gestellt, dort wurden die PMN mit UV-Licht der Wellenlänge 256 nm bestrahlt. Für die Phagozytoseversuche wurden die zu phagozytierenden Zielzellen mit einer Dosis von $200 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ bestrahlt und anschließend vier Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Bei

dieser Strahlendosis und Inkubationsdauer waren schließlich etwa 80 % der Zellen apoptotisch und nur etwa ein Prozent nekrotisch (siehe Abschnitt 3.3).

Methoden zum Nachweis und zur Quantifizierung der Apoptose

Giensa-Färbung Giensa-gefärbte Zytospinpräparate zeigen lichtmikroskopisch charakteristische morphologische Unterschiede zwischen nicht-apoptotischen und apoptotischen PMN. Typische Zeichen apoptotischer PMN sind die Aufhebung der gelappten Form der Zellkerne und Verdichtung des Kernchromatins [80], [97], (Abb. 2.2).

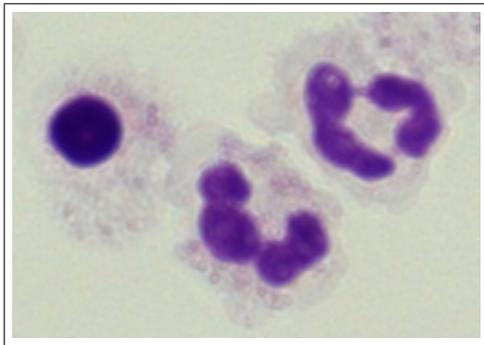


Abbildung 2.2: Lichtmikroskopische Aufnahme eines nach Giensa gefärbten Zytospinpräparates von PMN. Dargestellt sind eine apoptotische (links) und zwei nicht-apoptotische PMN mit den typischen morphologischen Zeichen (Originalvergrößerung: 1000 fach).

Annexin-V/Propidiumiodid-Färbung Zum Nachweis der Apoptose sowie zur Unterscheidung zwischen frühapoptotischen und spätapoptotischen Zellen wurde eine Doppelfärbung mit FITC-konjugiertem Annexin-V und Propidiumiodid (PI) durchgeführt.

Annexin-V bindet kalziumabhängig an Phosphatidylserin, das auf der Membranoaußenseite von apoptotischen Zellen exprimiert wird [55], [104]. Propidiumiodid lagert sich als rotfluoreszierender Farbstoff in die DNA von membrandefekten Zellen ein und markiert somit spätapoptotische, nekrotische Zellen [81]. Die Färbung mit Annexin-V erfolgte in kalziumhaltiger Annexinpufferlösung auf Eis entsprechend der Anleitung des Herstellers. Zur Gegenfärbung der nekrotischen Zellen wurde die Zellsuspension nach der Annexin-V-Färbung mit 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI versetzt. Die Zellen wurden unmittelbar nach der Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Für jeden Testansatz wurden 10.000 eingelesene Zellen ausgewertet. Mit dieser Methode konnte zwischen nicht

apoptotischen (Annexin-V- und PI-negativ), frühapoptotischen (Annexin-V-positiv, PI-negativ) und spätapoptotischen (Annexin-V- und PI-positiv) Zellen differenziert werden.

2.2.8 Färbung der Zellen mit PKH-Farbstoffen

Zur fluoreszenzmikroskopischen und durchflusszytometrischen Darstellung der Phagozytose apoptotischer Zellen wurden die Zellen mit den PKH-Farbstoffen PKH26 (rot) oder PKH67 (grün) gefärbt. PKH-Farbstoffe sind aliphatische Fluoreszenzfarbstoffe, die sich in die Lipidmembran von Zellen einlagern [56].

Für die Phagozytoseversuche wurden – falls nicht anders angegeben – die lebendigen Effektorzellen grün gefärbt. Die Zielzellen wurden direkt nach der UV-Bestrahlung rot gefärbt. Für einen Färbeansatz wurden 15 Millionen Zellen zunächst in einem 15-ml-Polystyrolröhrchen mit 5 ml serumfreiem Medium gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in 0,5 ml einer $2,3 \times 10^{-6}$ molaren (PKH26) bzw. $5,0 \times 10^{-7}$ molaren (PKH67) Farbstofflösung (PKH-Stammlösung in „Diluent-C“-Verdünnungsflüssigkeit) resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 0,5 ml FCS und zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Färbung gestoppt. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit Medium gewaschen.

2.2.9 Phagozytoseversuche

Das Prinzip der Phagozytoseversuche beruht darauf, dass Phagozyten als *Effektorzellen* zusammen mit den zu phagozytierenden *Zielzellen* inkubiert werden. Für den Nachweis der Phagozytose kamen folgende Methoden zum Einsatz: Lichtmikroskopie von Giemsa-gefärbten Zytospinpräparaten, Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie.

Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten durch Makrophagen

Makrophagen und apoptotische Lymphozyten wurden im Verhältnis 1:5 (500.000 Makrophagen und 2,5 Millionen apoptotische Lymphozyten) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in einem Volumen von 200 μl für 2 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden aus dem Zellgemisch Zytospinpräparate angefertigt, diese nach Giemsa gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt.

Phagozytose von Mikroorganismen durch PMN

Um zu zeigen, dass PMN prinzipiell zur Phagozytose fähig sind, wurden Vorversuche mit Mikroorganismen als zu phagozytierende Zielobjekte durchgeführt.

Phagozytose von *Staphylococcus aureus* durch PMN Klinische Isolate von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) standen aus der mikrobiologischen Diagnostik des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene, Universität zu Lübeck, zur Verfügung. PMN und lebendige *S. aureus* wurden im Verhältnis 1:10 in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in einem Volumen von 200 μl für 3 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Zytospinpräparate dieser Suspension wurden anschließend angefertigt, nach Giemsa gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt.

Phagozytose von *Escherichia coli* durch PMN Die Phagozytose von *Escherichia coli* (*E. coli*) durch PMN wurde mit dem Testkit PhagoTest® (Orpegen, Heidelberg) untersucht, bei dem komplement- und immunglobulin-opsonisierte FITC-markierte tote *E. coli*-Bakterien die zu phagozytierenden Zielobjekte waren. Für diesen Versuch wurden die PMN zunächst mit PKH26 (rot) gefärbt. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden dann 500.000 gefärbte PMN in 100 μl Medium zusammen mit 2×10^7 FITC-markierten *E. coli* für 10 Minuten im 37°C warmem Wasserbad inkubiert. Ein entsprechender Kontrollansatz wurde auf Eis gestellt. Die Fluoreszenz der an Zelloberflächen gebundenen (aber nicht phagozytierten) Bakterien wurde anschlie-

ßend mit einer Quenching-Lösung gelöscht und die Zellen danach zweimal mit einer Waschlösung gewaschen, bevor sie in FACS-Puffer aufgenommen und fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch untersucht wurden.

Phagozytose von apoptotischen PMN durch PMN

Für diese Phagozytoseversuche wurden vitale PMN – entweder isoliert oder im Vollblut – als Effektorzellen und apoptotische PMN als Zielzellen verwendet. Die Versuche fanden in einem autologen System statt, d.h. Effektorzellen, Zielzellen und Serum stammten vom selben Probanden. In einigen Versuchen wurden parallel Negativkontrollen durchgeführt, bei denen im Phagozytoseansatz anstatt apoptotischer PMN vitale PMN als Zielzellen eingesetzt wurden.

Phagozytose durch isolierte PMN PKH26 (rot) gefärbte apoptotische PMN wurden mit PKH67 (grün) gefärbten vitalen PMN in einem Volumen von 100 μl Medium im Verhältnis 4:1 in einer 96-Loch-Zellkulturplatte zusammengeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurde zu dieser Zellsuspension 100 μl autologes humanes Serum gegeben. Die Zellen wurden für 90 Minuten im Zellkulturschrank koinkubiert und anschließend in eiskaltem FACS-Puffer aufgenommen. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch. Außerdem wurden Giemsa-gefärbte Zytospinpräparate angefertigt. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden aus jeder Probe so viele Zellen aufgezeichnet, dass mindestens 10.000 Effektorzellen eingelesen waren. Bei der Auswertung wurden die Zellen berücksichtigt, die nach Größe und Granularität im FSC/SSC-Diagramm vitalen PMN entsprachen (Abb. 2.3).

Vollblutphagozytoseversuch 200 μl heparinisieretes Vollblut und 200 μl einer Suspension aus 4×10^6 PKH26 (rot) gefärbten Zielzellen in Medium wurden in einer 48-Loch-Zellkulturplatte zusammengeführt und für 90 Minuten im Zellkulturschrank inkubiert.

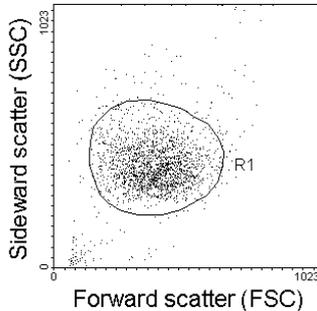


Abbildung 2.3: Durchflusszytometrische Darstellung des Koinkubationsansatzes von PMN und apoptotischen PMN im FSC/SSC-Diagramm. PMN und apoptotische PMN wurden für 90 Minuten unter Zellkulturbedingungen koinkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Im FSC/SSC-Diagramm entsprechen die in R1 liegenden Zellen vitalen PMN. Nur diese Zellen wurden bei der Auswertung berücksichtigt.

Für die anschließende durchflusszytometrische Analyse war es zunächst nötig, die Erythrozyten aus den Ansätzen zu eliminieren. Dazu wurden die Zellgemische in 45 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer gegeben. Nach drei Minuten wurde die Pufferlösung durch Zugabe von 5 ml 10 × PBS isotoniert und die verbliebenen Leukozyten konnten abzentrifugiert werden. Um die einzelnen Leukozytenpopulationen voneinander abgrenzen zu können, wurden die Zellen mit FITC markiertem Anti-CD14-IgG gefärbt. Schließlich wurden die Zellen in eiskaltem FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden so viele Zellen aufgenommen, dass mindestens 10.000 Effektorgranulozyten eingelesen waren.

Stimulation der Effektorgranulozyten In einigen Experimenten wurde untersucht, ob sich die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Stimulation der Effektorgranulozyten steigern lässt. Dazu wurden die Effektorzellen vor der Koinkubation mit den apoptotischen Zellen für zwei Stunden unter Zellkulturbedingungen in einer 96-Loch-Zellkulturplatte in 100 μ l Medium mit verschiedenen Substanzen inkubiert:

1. G-CSF (100 ng/ml)
2. M-CSF (100 ng/ml)
3. GM-CSF (100 ng/ml)
4. LPS (100 ng/ml)
5. IFN- γ (100 U/ml)

6. GM-CSF (100 ng/ml) + IFN- γ (100 U/ml)
7. LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (100 U/ml)

Nach der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und anschließend mit den apoptotischen Zellen koinkubiert.

Blockierung von Oberflächenrezeptoren der Effektorgranulozyten durch monoklonale Antikörper Um die Rolle von Oberflächenrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten für die Phagozytose apoptotischer Zellen zu untersuchen, wurden Blockierungsexperimente mit Antikörpern gegen die jeweiligen Rezeptoren durchgeführt. Isolierte und mit GM-CSF (100 ng/ml) + IFN- γ (100 U/ml) stimulierte PMN wurden dazu vor der Koinkubation mit den apoptotischen Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Antikörpern gegen die Rezeptoren CD14, CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18), Fc γ R II (CD32) und Fc γ R III (CD16) in Konzentrationen von 50 μ g/ml inkubiert. Ein Kontrollansatz erfolgte mit unspezifischem murinen IgG in der gleichen Konzentration. Vor der Koinkubation mit apoptotischen Zellen wurden überschüssige, nicht gebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen der PMN mit Medium entfernt. Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die Bedeutung der Rezeptoren [58]:

- CD14 Rezeptor für den Komplex aus LPS und LPS-bindendem Protein (LBP)
- CD11b Mac-1; α M-Untereinheit des Integrins CR3 (assoziiert mit CD18);
bindet unter anderem Komplementkomponente iC3b
- CD11c gp150,95; α X-Untereinheit des Integrins CR4 (assoziiert mit CD 18);
bindet unter anderem Komplementkomponente iC3b
- CD18 β_2 -Untereinheit der Integrine; bindet an CD11a, b, c und d
- CD35 CR1; bindet Komplementkomponenten C3b und C4b
- CD16 Fc γ RIII; niedrigaffiner Fc-Rezeptor für IgG
- CD32 Fc γ RII; niedrigaffiner Fc-Rezeptor für IgG

2.2.10 Fluoreszenzmikroskopie

Auf luftgetrocknete paraformaldehydfixierte Zytospinpräparate fluoreszenzgefärbter Zellen wurde ein kleiner Tropfen Mounting-Fluid gegeben und darauf ein Deckgläschen gesetzt, das mit handelsüblichem Nagellack fixiert wurde. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Präparate bei 630- und 1000-facher Vergrößerung beurteilt.

2.2.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, mit dem sich Partikel – in der vorliegenden Arbeit Zellen – in einer Suspension hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität einzeln analysieren lassen.

Dabei passieren die Zellen nacheinander einen Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm, dessen Licht von den Zellen gestreut wird. Das in einem geringen Winkel abgelenkte sogenannte Vorwärtsstreulicht (Forward scatter channel, FSC) kann als Maß für die Größe der Zellen angesehen werden. Das um 90° gestreute Seitwärtsstreulicht (Side scatter channel, SSC) korreliert mit der Granularität der Zellen.

Zusätzlich können durch den Laserstrahl Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt werden, das in einem weiteren Detektorsystem gemessen wird. Im FL-1-Kanal wird dabei Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 530 nm (FITC, PKH67) detektiert, im FL-2-Kanal Licht der Wellenlänge 585 nm (PE, PI, PKH26).

Die Darstellung der aufgenommenen Zelleigenschaften erfolgt in Form von Dotplots (Punktediagrammen) oder Histogrammen. Im Dotplot werden die Zellen im Diagramm als Punkte mit entsprechenden Eigenschaften dargestellt. In der Histogrammdarstellung wird die Anzahl der Zellen gegen einen bestimmten Parameter aufgetragen. Es ist bei der Auswertung möglich, bestimmte Zellpopulationen durch Anlage von „Gates“ abzugrenzen und von den eingegrenzten Zellen weitere Parameter darzustellen. Als Beispiel ist in Abb. 2.4 die Auswertung einer durchflusszytometrischen Analyse einer Leukozytensuspension, die mit Anti-CD3 FITC und Anti-CD14 PE gefärbt wur-

de, dargestellt. Abb. 2.4 A zeigt die Leukozyten im FSC/SSC-Dotplot, bei dem Gates um die Subpopulationen gesetzt wurden. In B wurden von den jeweils eingegrenzten Zellpopulationen die FL-1- und FL-2- Eigenschaften in Dotplots dargestellt.

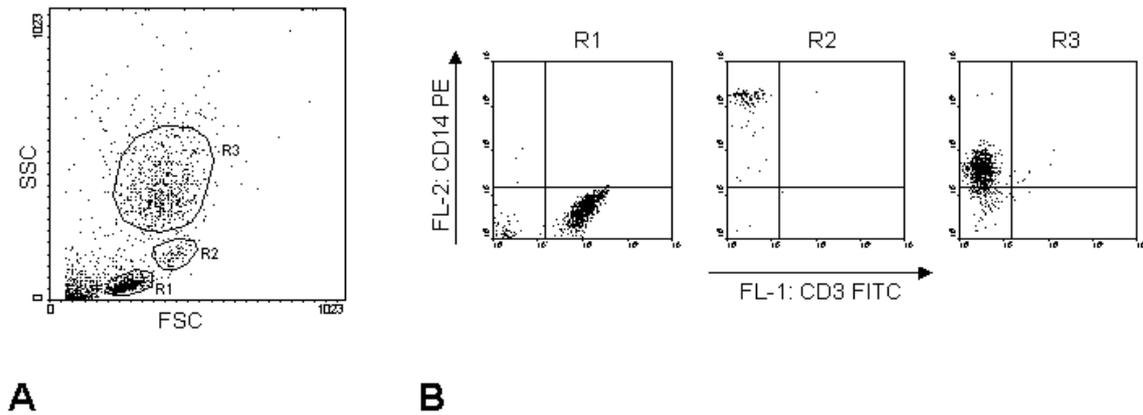


Abbildung 2.4: Dotplots einer Leukozytensuspension, die mit CD14 PE und CD3 FITC gefärbt wurde. A Im FCS-SSC-Diagramm grenzen sich nach Größe und Granularität der Zellen drei Subpopulationen R1–R3 ab. Die nicht eingegrenzten Punkte ganz links unten entsprechen Zelltrümmern und verbliebenen Erythrozyten. In **B** wurden einzelnen Regionen im FL-1/FL-2-Diagramm untersucht. Es wird deutlich, dass es sich bei der Population R1 um Lymphozyten (CD14 negativ, CD3 positiv oder negativ), bei R2 um Monozyten (CD14 stark positiv, CD3 negativ) und bei R3 um PMN (CD14 leicht positiv, CD3 negativ) handelt.

2.2.12 Affinitätschromatographie

Die Depletion von IgG aus humanem Serum erfolgte mittels Affinitätschromatographie mit Protein G Sepharose 4. Dabei bindet das Protein G, ein Protein der Zellwand von Streptokokken, an die Fc-Region von IgG. Das Procedere der Depletion entsprach dem Herstellerprotokoll: 1 ml Protein G Sepharose 4 Fast Flow *beads* wurden pelletiert, zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml zu depletierendem Serum resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die *beads* erneut pelletiert und der Überstand gesammelt.

Der IgG-Gehalt des depletierten Serums lag stets unter 22 % des unteren Nor-

malwertes für gesunde Erwachsene (Nephelometrische Bestimmung im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Daten nicht gezeigt).

2.2.13 Statistik

Von einer Normalverteilung der experimentellen Daten ausgehend erfolgte die statistische Auswertung mit dem Student-t-Test für ungepaarte Stichproben. Als signifikant galten Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$.

3 Ergebnisse

Die Idee zu dieser Arbeit entstand aus einem Zufallsbefund in unserer Arbeitsgruppe: Als eine Kultur aus mit *Chlamydomytila pneumoniae* infizierten PMN, die für 48 Stunden bei 37°C inkubiert wurden, elektronenmikroskopisch untersucht wurde, fand sich das in Abb. 3.1 gezeigte Bild. Es zeigt einen neutrophilen Granulozyten, der mit schmalen Zellausläufern einen apoptotischen PMN umschließt.

Zwar ist die apoptotische Zelle nur etwa zur Hälfte umschlossen und nicht vollständig internalisiert, die für den Vorgang der Phagozytose typische Anordnung des PMN um die apoptotische Zelle spricht jedoch dafür, dass mit diesem Bild die Aufnahme einer apoptotischen Zelle durch einen PMN gezeigt wurde.

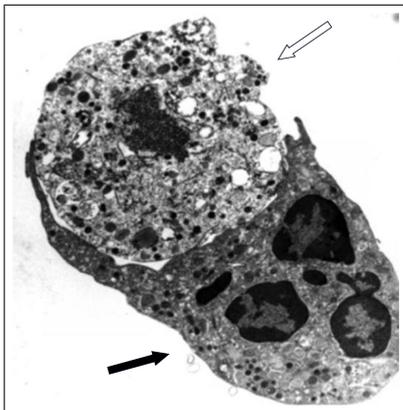


Abbildung 3.1: PMN und apoptotischer PMN. Elektronenmikroskopische Aufnahme aus einer Kultur neutrophiler Granulozyten, die für 48 Stunden bei 37°C in Medium (10 % FCS) inkubiert wurden. Schwarzer Pfeil: PMN, offener Pfeil: apoptotischer PMN. Aufnahme von PD Dr. M. Klinger, Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck.

Während die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Makrophagen bekannt ist, gibt dieses elektronenmikroskopische Bild einen Hinweis darauf, dass auch PMN zur Phagozytose apoptotischer Zellen fähig sind. Ob die beschriebene Deutung dieses Bildes richtig ist, soll in dieser Arbeit geklärt werden.

3.1 Vorversuche

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob PMN in der Lage sind, apoptotische Zellen zu phagozytieren. Dazu wurden zunächst Methoden entwickelt, mit denen dies dargestellt und quantifiziert werden kann.

Es ist bekannt, dass einerseits apoptotische Zellen phagozytiert werden (z.B. von Makrophagen) und dass andererseits PMN grundsätzlich zur Phagozytose (z.B. von Mikroorganismen) fähig sind. Diese beiden Voraussetzungen sollten in Vorversuchen zunächst mit geeigneten Methoden dargestellt werden, um diese Methoden dann auf die eigentliche Fragestellung übertragen zu können.

3.1.1 Makrophagen phagozytieren apoptotische Lymphozyten

In einem ersten Vorversuch sollte die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen gezeigt werden. Dazu wurden Makrophagen, die aus Monozyten des peripheren Blutes generiert wurden, mit apoptotischen Lymphozyten koinkubiert. In Giemsa-gefärbten mikroskopischen Präparaten ließen sich von Makrophagen aufgenommene Lymphozyten erkennen (Abb. 3.2). Der Anteil der Makrophagen, der apoptotische Zellen aufgenommen hatte, lag bei etwa 30 %.

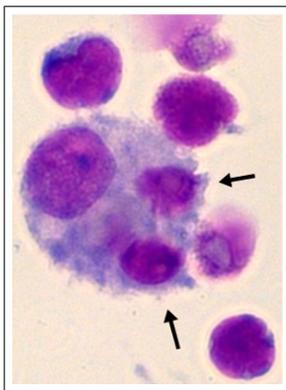


Abbildung 3.2: Makrophagen phagozytieren apoptotische Lymphozyten. Makrophagen wurden aus Monozyten des peripheren Blutes generiert wie in 2.2.1 beschrieben. Als Zielzellen wurden Lymphozyten gewählt, bei denen die Apoptose durch Staurosporin induziert wurde. Im Phagozytoseansatz wurden Makrophagen und apoptotische Lymphozyten im Verhältnis 1:5 für zwei Stunden in Medium (10 % FCS) unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die Abbildung zeigt ein Giemsa-gefärbtes mikroskopisches Präparat. Zu sehen ist ein Makrophage, der zwei apoptotische Lymphozyten (Pfeile) aufgenommen hat. Originalvergrößerung: 1000 fach.

3.1.2 PMN phagozytieren *S. aureus* und *E. coli*

In zwei weiteren Vorversuchen sollte die generelle Fähigkeit von PMN zur Phagozytose gezeigt werden. Als Zielobjekte wurden dazu Bakterien verwendet.

In einem Versuch wurden PMN mit *S. aureus* inkubiert. In Giemsa-gefärbten mikroskopischen Präparaten ließen sich in durchschnittlich etwa 75 % der PMN Bakterien erkennen (Abb. 3.3).

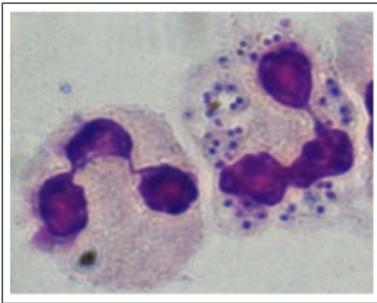


Abbildung 3.3: PMN phagozytieren *S. aureus*. PMN wurden mit *S. aureus* (gewonnen aus klinischen Isolaten) im Verhältnis 1:10 für 3 Stunden in Medium (10 % FCS) unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die lichtmikroskopische Aufnahme eines nach Giemsa gefärbten Zytospinpräparates zeigt einen PMN mit multiplen internalisierten Staphylokokken. Links daneben ein PMN, der keine Bakterien phagozytiert hat. Originalvergrößerung: 1000 fach.

Über die Giemsa-Färbung hinaus sollte die Phagozytosefähigkeit von PMN nun fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch dargestellt werden. Dazu wurden in einem weiteren Versuch PKH26 (rot) gefärbte PMN mit FITC (grün) markierten *E. coli* bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde hierbei eine Kokultur von PMN und *E. coli* auf Eis gestellt, wodurch eine aktive Phagozytose verhindert werden sollte. Fluoreszenzmikroskopisch waren die grünen Bakterien bereits nach 10 Minuten klar in den rot gefärbten PMN zu erkennen (Abb. 3.4 A). Auch durchflusszytometrisch zeigten sich FITC-positive PMN, und zwar bei 37°C in deutlich höherem Ausmaß als in der Negativkontrolle auf Eis (Abb. 3.4 B).

Es konnte somit eine Methode entwickelt werden, mit der der Nachweis der Phagozytose von Mikroorganismen durch PMN lichtmikroskopisch am Giemsa-gefärbten Zytospinpräparat, fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch erbracht werden konnte.

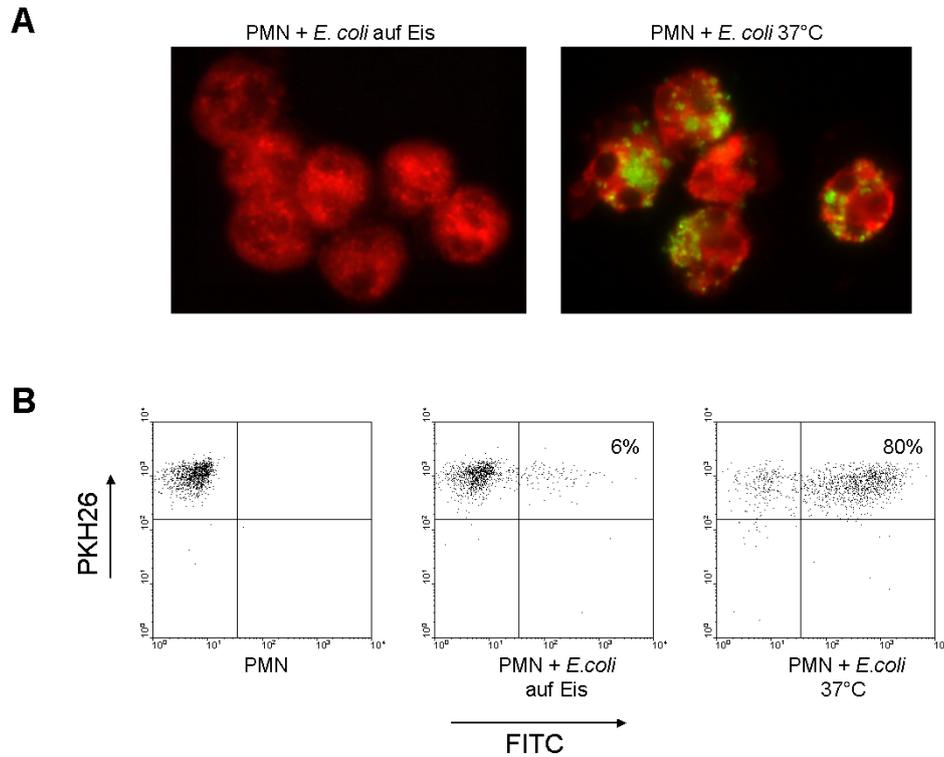


Abbildung 3.4: PMN phagozytieren *E. coli*. PKH26 (rot) gefärbte PMN wurden mit komplement- und immunglobulinopsonierten FITC-markierten *E. coli* des Testkits Phagotest® im Verhältnis 1:40 für 10 Minuten in Medium (10 % FCS) inkubiert. Ein Phagozytoseansatz fand bei 37°C, ein Kontrollansatz fand auf Eis statt. Der FITC-Farbstoff von oberflächlich gebundenen *E. coli* wurde anschließend mit einer Quenching-Lösung gelöscht. **A.** Fluoreszenzmikroskopisch konnte die Phagozytose von grünen *E. coli* durch rote PMN bei 37°C, nicht aber im Kontrollansatz dargestellt werden (Originalvergrößerung: 1000 fach). **B.** Quantitative Auswertung mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen im rechten oberen Quadranten repräsentieren PMN, die *E. coli* phagozytiert haben. Die Prozentwerte stellen den Anteil der FITC-positiven Granulozyten als Maß für die Phagozytose dar. Daten eines Experiments.

3.2 Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN

Nachdem es methodisch gelungen war, sowohl die Phagozytose apoptotischer Zellen als auch die Phagozytosefähigkeit von PMN darzustellen, sollte nun mit den Methoden der Vorversuche im Speziellen die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN gezeigt werden.

Als apoptotische Zellen wurden in den folgenden Versuchen allerdings nicht wie in 3.1.1 Lymphozyten verwendet, sondern UV-bestrahlte PMN (siehe Abschnitt 3.3). Unter der Vorstellung, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN *in vivo* vor allem in entzündeten Geweben stattfindet, erschienen als Zielzellen apoptotische PMN von größerer pathophysiologischer Relevanz als andere apoptotische Zellen, denn in entzündeten Geweben fallen vorwiegend apoptotische PMN an.

3.3 Generierung apoptotischer Zielzellen durch UV-Bestrahlung von PMN

Es war nun notwendig, eine Methode zu entwickeln, mit der verlässlich apoptotische, nicht-nekrotische PMN generiert werden konnten. PMN sind kurzlebige Zellen, die nach wenigen Stunden in der Zellkultur spontan apoptotisch werden. Die Apoptose von PMN lässt sich aber auch durch äußere Einflüsse induzieren. In dieser Arbeit sollte die Apoptose durch UV-Bestrahlung – wie bei Devitt et al. beschrieben [26] – eingeleitet werden:

Frisch isolierte PMN wurden mit verschiedenen Strahlungsdosen von UV-Licht bestrahlt und anschließend für 4 bzw. 20 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach einer Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC und Propidiumiodid (PI) wurde der Anteil der apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Im Dotplot lassen sich frühapoptotische (Annexin-V-positiv, PI-negativ) von spätapoptotischen (Annexin-V-positiv, PI-positiv) Zellen unterscheiden.

Nach vier Stunden waren auch ohne Bestrahlung bereits etwa 20 % der Zellen apoptotisch. Nach Bestrahlung mit UV-Licht wurden mit zunehmender Strahlungsdosis gesteigert apoptotische Zellen generiert. Bei einer Bestrahlung mit 200 mJ/cm² lag der Anteil an apoptotischen Zellen nach 4-stündiger Inkubation bei über 80 % und nahm auch bei weiterer Erhöhung der Strahlungsdosis nicht wesentlich zu. Indessen

3 Ergebnisse

fürte eine sehr hohe Bestrahlungsenergie von 1000 mJ/cm^2 und eine Inkubationsdauer von 20 Stunden zu einer deutlichen Steigerung des Anteils an nekrotischen Zellen (Abb. 3.5).

Da bei der Bestrahlung mit 200 mJ/cm^2 ein Großteil der Zellen apoptotisch, jedoch weniger als 5 % nekrotisch waren, wurde diese Dosis für die Generierung der Zielzellen für die folgenden Phagozytoseversuche gewählt.

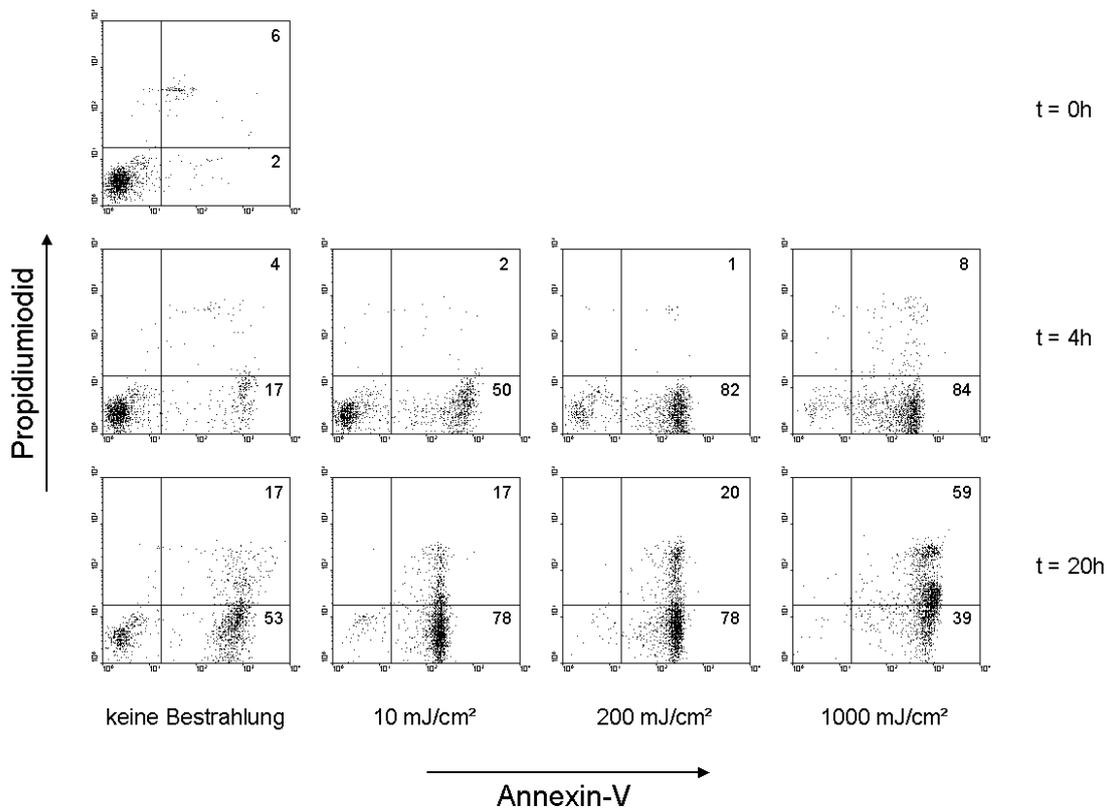


Abbildung 3.5: Durchflusszytometrische Auswertung der Annexin-V-/Propidiumiodid-färbung von UV-bestrahlten PMN. PMN wurden mit verschiedenen Dosen von UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt und anschließend in Medium (10 % FCS) unter Zellkulturbedingungen inkubiert. 0, 4 und 20 Stunden nach der Bestrahlung wurden Annexin-V-/PI-Färbungen durchgeführt. Die gefärbten Zellen wurden durchflusszytometrisch ausgewertet. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil an PMN in den jeweiligen Quadranten an. Daten eines Experiments, repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.4 PMN phagozytieren apoptotische PMN

Nachdem in den Vorversuchen Methoden entwickelt wurden, mit denen die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Makrophagen und die Aufnahme von Mikroorganismen durch PMN dargestellt werden konnte, waren die Voraussetzungen geschaffen, die Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN zu analysieren.

Im Folgenden werden die als Phagozyten eingesetzten PMN als *Effektorzellen* bezeichnet und die zu phagozytierenden apoptotischen PMN als *Zielzellen*. In einigen Ansätzen kamen neben apoptotischen Zielzellen als Negativkontrolle PMN zum Einsatz, bei denen die Apoptose nicht induziert wurde.

Für diese Versuche wurden alle im Phagozytoseansatz eingesetzten neutrophilen Granulozyten gemeinsam isoliert. Bei einem Teil der Zellen, den späteren Zielzellen, wurde wie beschrieben die Apoptose induziert. Die Effektorzellen oder Negativkontrollzellen wurden für diese Zeit bei Raumtemperatur gelagert. Obwohl nach vier Stunden auch ohne Bestrahlung bereits ein Teil der Zellen spontan apoptotisch geworden ist (vgl. Abb. 3.5), werden im Folgenden die unbestrahlten PMN als „vitale“ Zellen bezeichnet. Diese Bezeichnung wurde zur Vereinfachung gewählt obwohl sie wissenschaftlich nicht ganz korrekt ist.

3.4.1 Giemsa-gefärbte Präparate

In den Vorversuchen konnte die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Makrophagen und die Aufnahme von Staphylokokken durch PMN in Giemsa-gefärbten mikroskopischen Präparaten dargestellt werden. Mit dieser Methode sollte nun auch die Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN gezeigt werden.

Dazu wurden zunächst Kokulturen aus vitalen PMN und apoptotischen PMN im Verhältnis 1:4 in Medium (10 % FCS) für zwei Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Aus dieser Zellsuspension wurden anschließend Zytospinpräparate erstellt, die nach Giemsa gefärbt wurden. Bei der Auswertung der Präparate wurde nach

apoptotischen Zellen oder apoptotischem Material gesucht, das sich innerhalb von PMN befand. Indes, auf den Giemsa-gefärbten Präparaten konnte die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN nicht gezeigt werden. Einschlüsse in PMN, die apoptotischem Material entsprechen könnten, konnten nicht entdeckt werden.

Es ist bekannt, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen durch Zugabe von Serum zum Phagozytoseansatz gesteigert werden kann [3]. Aus diesem Grund wurden Versuche durchgeführt, bei denen im oben genannten Phagozytoseansatz 50 % autologes Serum anwesend war. In weiteren Versuchen wurden die Effektorzellen vor der Koinkubation mit den Zielzellen für zwei Stunden bei 37°C mit GM-CSF (100 ng/ml) und IFN- γ (100 U/ml) stimuliert. Doch auch hiermit gelang die Darstellung der Phagozytose apoptotischer Zellen auf Giemsa-gefärbten mikroskopischen Präparaten nicht.

3.4.2 Fluoreszenzmikroskopische Präparate

Es wäre voreilig, aus den in 3.4.1 beschriebenen Befunden zu schließen, dass PMN keine apoptotischen Zellen phagozytieren, nur weil dies auf Giemsa-gefärbten Zytospinpräparaten lichtmikroskopisch nicht zu erkennen ist. Möglicherweise ist diese Methode der Auswertung für diese Versuche nur nicht sensitiv genug. Als weiterer Versuch, die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN morphologisch darzustellen wurde deshalb nun die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Dazu wurden PKH67 (grün fluoreszierend) gefärbte PMN mit PKH26 (rot fluoreszierend) gefärbten apoptotischen PMN für 90 Minuten unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Diese Phagozytoseversuche fanden in Anwesenheit von 50 % autologem Serum statt und die Effektorzellen wurden vor der Koinkubation der Zellen für zwei Stunden mit GM-CSF und IFN- γ stimuliert.

Im Gegensatz zu den Giemsa-gefärbten Präparaten zeigten fluoreszenzmikroskopische Bilder von Zytospinpräparaten dieser Phagozytoseansätze zweifelsfrei die Aufnahme von apoptotischem Material in PMN. Damit war der „proof of principle“ erbracht. Bilder wie in Abb. 3.6 B dargestellt, waren auf den Präparaten aber schwierig zu fin-

den, in weniger als 5 % der ausgezählten Zellen eines Zyotspinpräparates ließen sich Einschlüsse von apoptotischem Material deutlich erkennen. Zur quantitativen Analyse der Phagozytose apoptotischer Zellen war die fluoreszenzmikroskopische Auswertung daher nur bedingt geeignet.

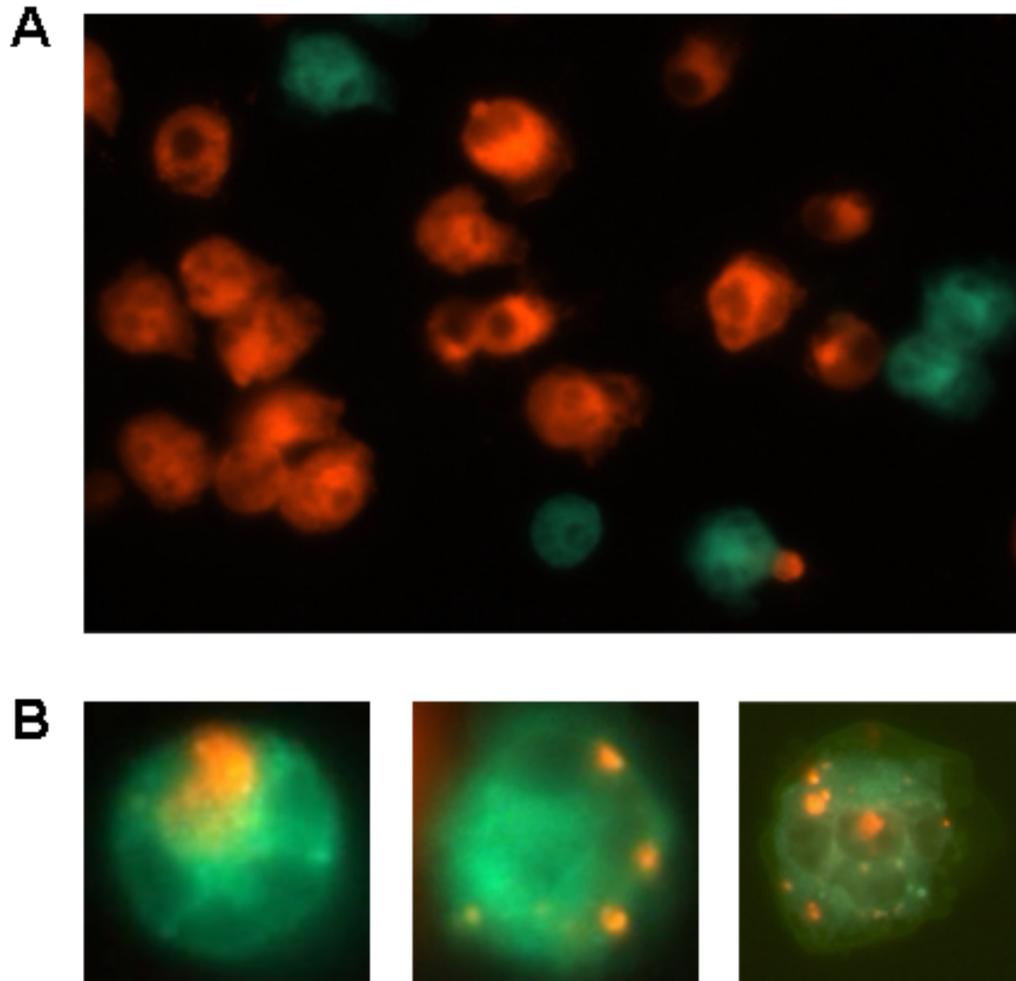


Abbildung 3.6: PMN phagozytieren apoptotische PMN. PKH67 (grün) gefärbte, mit GM-CSF (100 ng/ml) und IFN- γ (100 U/ml) stimulierte PMN wurden mit PKH26 (rot) gefärbten apoptotischen PMN im Verhältnis 1:4 für 90 Minuten in Medium (50 % autologes Serum) unter Zellkulturbedingungen inkubiert. **A.** Übersichtsaufnahme aus dem Koinkubationsansatz (Originalvergrößerung: 630 fach). In **B** sind drei Bilder von grün gefärbten PMN dargestellt, in denen roter Inhalt phagozytierter Zellen zu erkennen ist (Originalvergrößerung: 1000 fach).

3.4.3 Durchflusszytometrischer Nachweis

Als geeignete Methode, die Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN darzustellen und insbesondere zu quantifizieren, stellte sich die durchflusszytometrische Analyse heraus. Die durchflusszytometrische Darstellung der Phagozytose apoptotischer Zellen ist in Abb. 3.7 zu erkennen und soll im Folgenden erläutert werden:

Nach Koinkubation von grün gefärbten vitalen PMN (unterer rechter Quadrant) mit rot gefärbten apoptotischen PMN (oberer linker Quadrant) stellten sich die Effektorzellen, die apoptotische Zellen aufgenommen haben, als doppelt-positive Zellen im oberen rechten Quadranten dar.

Der Anteil der Effektorzellen, der sich im oberen rechten Quadranten befand, wurde als Maß für die Phagozytose angesehen. Wenn im Folgenden das Ausmaß der Phagozytose in Prozent angegeben wird, so bezeichnet diese Zahl stets den Anteil der doppelt positiven Effektorzellen an der Gesamtzahl der Effektorzellen.

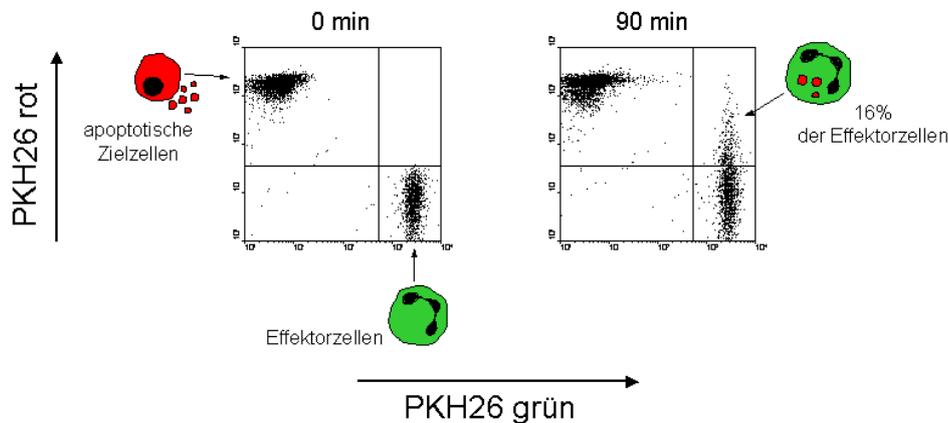


Abbildung 3.7: Durchflusszytometrische Analyse der Phagozytose apoptotischer PMN durch PMN. PKH67 (grün) gefärbte Effektorzellen stellen sich im rechten unteren Quadranten dar, PKH26 (rot) gefärbten apoptotische Zielzellen im linken oberen Quadranten. Effektorzellen und Zielzellen wurden im Verhältnis 1:4 in Medium (50 % autologes Serum) inkubiert. Nach 90 Minuten Inkubation unter Zellkulturbedingungen stellten sich die Effektorzellen, die apoptotische Zellen phagozytiert haben, als doppelt-positive Zellen im rechten oberen Quadranten dar. Die angegebene Prozentzahl von 16 % gibt den Anteil der doppelt-positiven Effektorzellen an der Gesamtzahl der Effektorzellen an. Daten eines Experiments, repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

3 Ergebnisse

Als Kontrolle wurden Ansätze durchgeführt, in denen anstatt apoptotischer unbe-
strahlte PMN als Zielzellen eingesetzt wurden. Es zeigten sich in den Ansätzen mit
apoptotischen Zielzellen nach der Inkubation etwa drei mal mehr doppelt-positive Ef-
fektorzellen als in den Kontrollansätzen (Abb. 3.8).

Übereinstimmende Ergebnisse wurden in einem Phagozytoseversuch beobachtet, bei
dem die Zellen entgegengesetzt gefärbt wurden, also die Zielzellen PKH67 (grün) und
die Effektorzellen PKH26 (rot) (Abb. 3.9).

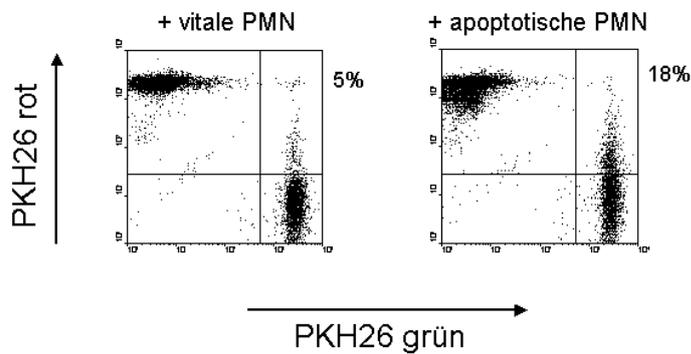


Abbildung 3.8: PKH67 (grün) gefärbte PMN wurden mit PKH26 (rot) gefärbten apoptotischen PMN oder mit PKH26 (rot) gefärbten vitalen PMN im Verhältnis 1:4 für 90 Minuten in Medium (50 % autologes Serum) unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die Prozentzahlen geben die Phagozytoserate, also den Anteil der doppelt-positiven Effektorzellen an der Gesamtzahl der Effektorzellen an. Daten eines Experiments, repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

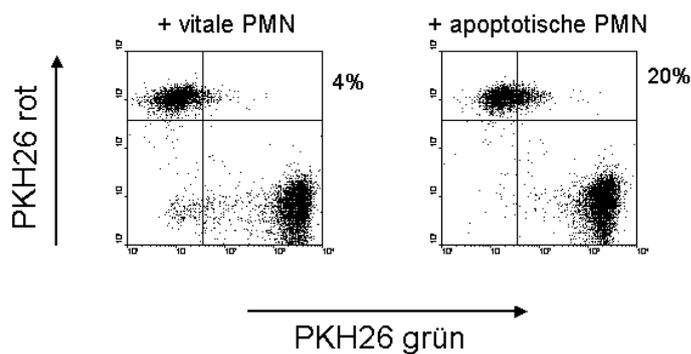


Abbildung 3.9: Der Versuchsaufbau, der zu den hier dargestellten Dotplots führte, entspricht dem von Abb. 3.8, mit dem Unterschied, dass bei diesem Versuch ausnahmsweise die Effektorzellen PKH26 (rot) und die Zielzellen PKH67 (grün) gefärbt wurden. Daten eines Experiments.

3.4.4 Vollblutphagozytoseversuche

Als eine Methode, die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN unter *quasi in vivo*-Bedingungen darzustellen, wurde der Vollblutphagozytoseversuch entwickelt. Dabei wurden PKH26 gefärbte apoptotische PMN zusammen mit Vollblut inkubiert. Nach Lysierung der Erythrozyten und Färbung mit Anti-CD14 FITC wurden die Zellgemische durchflusszytometrisch analysiert. Monozyten, PMN und Lymphozyten konnten im FSC/SSC-Dotplot sowie aufgrund unterschiedlicher CD14-Intensität differenziert werden.

Abb. 3.10 zeigt die Auswertung einer durchflusszytometrischen Analyse eines Vollblutphagozytoseversuchs. Wie beim Phagozytoseversuch mit isolierten PMN konnte auch im Vollblut die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN durchflusszytometrisch dargestellt werden. Zu erkennen ist, dass die Phagozytoserate der PMN im Vollblut vergleichbar ist mit der von isolierten PMN (vgl. Abb. 3.7–3.9). Betrachtet man die anderen Leukozytenpopulationen, so ist zu erkennen, dass neben den PMN die Monozyten phagozytotisch aktiv sind, Lymphozyten hingegen keine apoptotischen Zellen aufnehmen.

Mit dieser Methode war es möglich, das Phagozytoseausmaß der PMN mit dem der Monozyten und Lymphozyten zu vergleichen. Außerdem konnten die Effektorzellen mit dem Vollblut unmittelbar vor der Inkubation mit den apoptotischen Zellen entnommen werden, ohne die Isolations- und Färbeschritte zu durchlaufen. Die Effektorzellen lagen also in frischem Zustand vor. Ein weiterer Vorzug dieser Methode lag darin, dass sie den *in vivo*-Verhältnissen näher kommt, denn es besteht im Vollblut ein physiologisches Milieu, Serumfaktoren und unterschiedliche Zellarten sind in physiologischem Verhältnis anwesend.

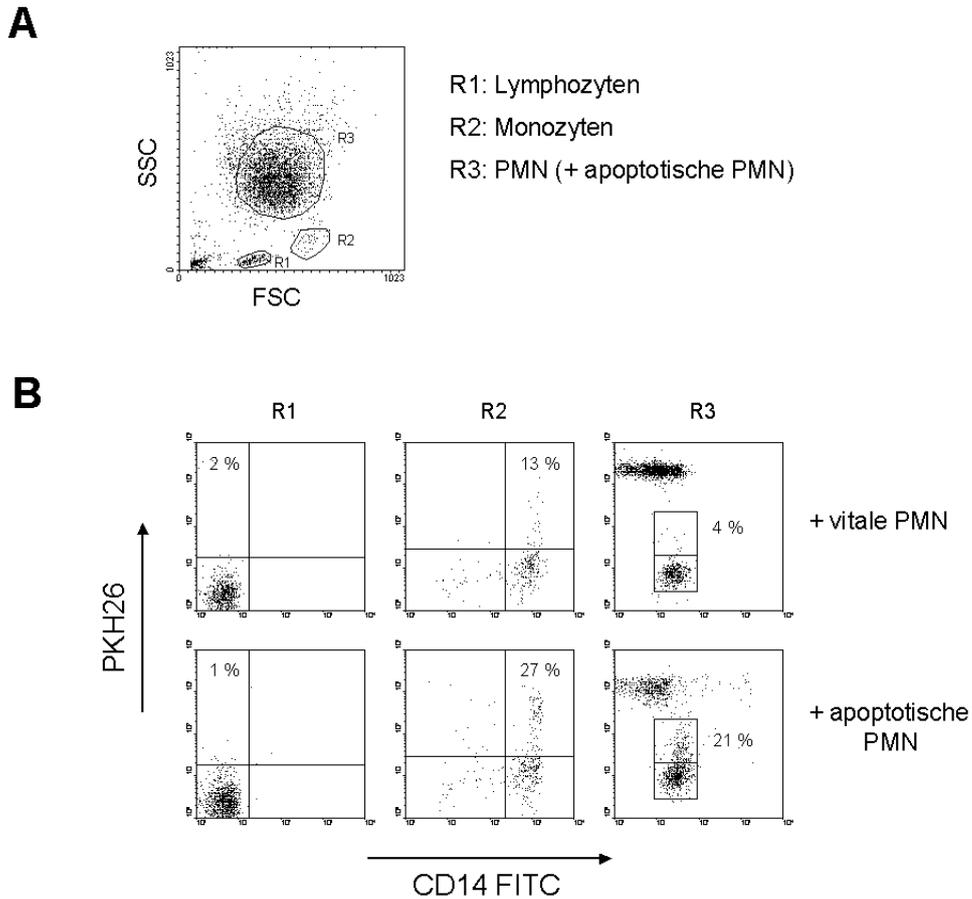


Abbildung 3.10: Durchflusszytometrische Darstellung des Vollblutphagozytoseversuchs. PKH26 (rot) gefärbte apoptotische oder vitale PMN wurden in heparinisiertem Vollblut für 90 Minuten unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten lysiert und die verbliebenen Leukozyten mit Anti-CD14 FITC gefärbt. **A.** Im FSC/SSC-Dotplot grenzen sich die Leukozytensubpopulationen ab: Lymphozyten (R1), Monozyten (R2), PMN und apoptotische PMN (R3). In **B** sind die einzelnen Regionen R1–R3 nach ihrer Fluoreszenzaktivität dargestellt. Es wird erkennbar, dass R3 aus PKH26-negativen Effektor-PMN und aus PKH26 gefärbten Ziel-PMN besteht. Nach Zugabe von apoptotischen PMN (untere Diagramme), lässt sich die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Monozyten (R2) und PMN (R3) darstellen und zwar in deutlich höherem Ausmaß als in den Negativkontrollen nach Zugabe von vitalen PMN (obere Diagramme). Lymphozyten (R1) hingegen bleiben stets PKH26-negativ. Die eingetragenen Prozentzahlen geben die den Anteil der PKH26 positiven Effektorzellen an der Gesamtzahl der Effektorzellen an. Daten eines Experiments, repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Die Vollblutphagozytoseversuche ergeben zwar klare Aussagen hinsichtlich der prinzipiellen Phagozytosefähigkeit, die Auswertung wurde jedoch dadurch erschwert, dass

sich im FSC/SSC-Diagramm sowie durch die Färbung mit CD14 FITC zwar die einzelnen Leukozyten voneinander abgrenzen ließen, nicht jedoch apoptotische PMN und vitale PMN. Also waren sowohl die apoptotischen PMN als auch die vitalen PMN, die phagozytiert hatten, doppelt positiv. In Abb. 3.10 B sind die Zellpopulationen noch recht klar voneinander abzugrenzen, denn die Effektorzellen, die phagozytiert hatten, wurden nicht so stark PKH26-positiv wie die Zielzellen. In den Versuchen der folgenden Abschnitte wurden die Effektorzellen vor der Phagozytose jedoch mit Zytokinen zu erhöhter Phagozytose stimuliert. Deshalb wurden die folgenden Phagozytoseversuche zur genaueren quantitativen Auswertbarkeit mit isolierten PMN als Effektorzellen durchgeführt.

3.5 Steigerung der Phagozytose durch Stimulation der Effektorgranulozyten mit verschiedenen Substanzen

In den beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass PMN apoptotische PMN phagozytieren. Der Anteil der PMN, die apoptotische Zellen phagozytiert haben, war allerdings mit etwa 15–20 % geringer als die in 3.1.2 dargestellte Phagozytose von *S. aureus* und *E. coli* und die in 3.1.1 gezeigte Phagozytose apoptotischer Lymphozyten durch Makrophagen. In einem nächsten Versuch wurde deshalb untersucht, ob sich die Phagozytose apoptotischer PMN durch Stimulation der Effektorzellen steigern lässt. Die Effektorzellen wurden deshalb vor der Koinkubation mit den apoptotischen Zellen für zwei Stunden mit verschiedenen Substanzen wie in 2.2.9 beschrieben stimuliert. Es zeigte sich, dass nach Stimulation mit GM-CSF, LPS und IFN- γ die Zahl der durchflusszytometrisch doppelt-positiven Effektorzellen auf das zwei- bis dreifache gesteigert werden konnte (Abb. 3.11).

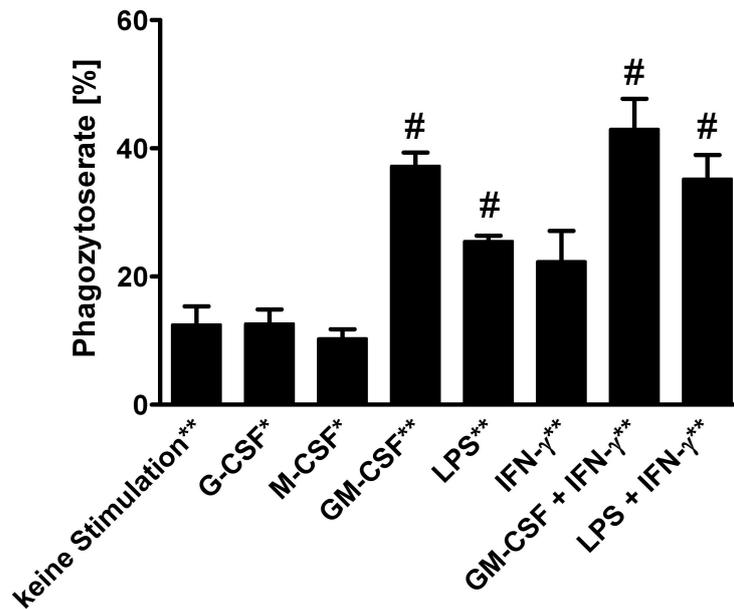


Abbildung 3.11: Phagozytose apoptotischer PMN durch PMN nach Stimulation der Effektorzellen mit verschiedenen Substanzen. PKH67 (grün) gefärbte PMN wurden für zwei Stunden mit G-CSF (100 ng/ml), M-CSF (100 ng/ml), GM-CSF (100 ng/ml), LPS (100 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml), GM-CSF (100 ng/ml)+IFN- γ (100 U/ml), LPS (100 ng/ml)+IFN- γ (100 U/ml) und ohne Zusatz unter Zellkulturbedingungen in Medium (10 % FCS) inkubiert. Nach zwei Waschschritten folgte die Inkubation mit PKH26 (rot) gefärbten apoptotischen PMN im Verhältnis 1:4 für 90 Minuten unter Zellkulturbedingungen in Medium (50 % autologes Serum). Die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Im Diagramm ist die Phagozytoserate (d. h. der Anteil der doppelt-positiven Effektorzellen an der Gesamtzahl der Effektorzellen) der verschiedenen Ansätze verglichen. * n=3 Experimente, ** n=4 Experimente mit Standardabweichung, #: Signifikante Steigerung im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Stimulation ($p \leq 0,01$).

3.6 Mechanismen der Aufnahme von apoptotischen Zellen durch PMN

Nachdem gezeigt werden konnte, dass apoptotische Zellen von PMN aufgenommen werden, sollte der Aufnahmemechanismus untersucht werden. In den folgenden Versuchen wurden die Effektorzellen jeweils vor der Koinkubation mit den apoptotischen Zellen für zwei Stunden mit GM-CSF (100 ng/ml) und IFN- γ (100 U/ml) stimuliert wie in 2.2.9 beschrieben.

3.6.1 Die Phagozytose apoptotischer PMN durch PMN ist serumabhängig

Bei den bisher durchgeführten Experimenten, in denen die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN gezeigt werden konnte, war jeweils autologes Serum oder – bei den Phagozytoseassays im Vollblut – Plasma im Phagozytoseansatz enthalten. Die Bedeutung von Serum für die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch PMN sollte nun näher untersucht werden. Dazu wurden drei Ansätze gewählt: Neben einem wie bisher durchgeführten Versuchsansatz mit 50 % autologem Serum wurde in einem weiteren Ansatz das Serum zuvor hitzeinaktiviert. Einem dritten Ansatz wurde kein Serum zugefügt. Unter serumfreien Bedingungen war keine Phagozytose zu beobachten. In Anwesenheit von frischem Serum zeigte sich erwartungsgemäß eine hohe Phagozytoserate (44 %), Hitzeinaktivierung des Serums führte zu einer deutlichen Reduktion der Phagozytoserate auf etwa ein Drittel (13 %) des ursprünglichen Wertes (Abb. 3.12).

Dieser Versuch zeigt, dass zur Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN Serum notwendig ist und weist damit auf eine opsoninabhängige Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN hin. Sowohl hitzestabile als auch hitzelabile Serumfaktoren sind dabei von Bedeutung.

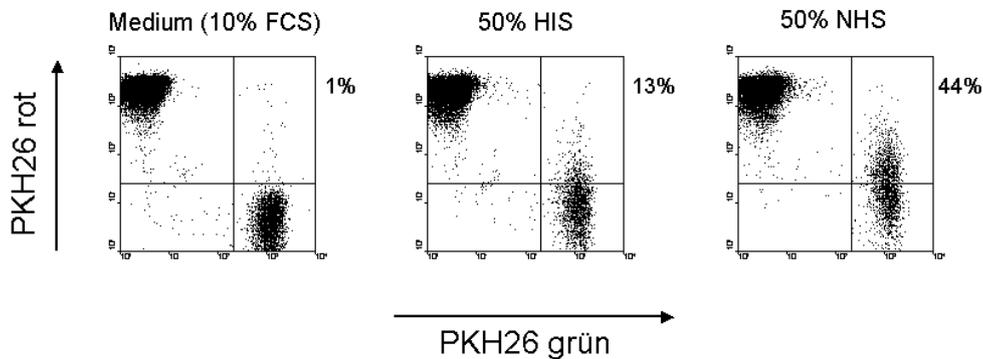


Abbildung 3.12: Phagozytose apoptotischer PMN durch PMN in Abhängigkeit von der Art der zum Phagozytoseansatz zugegebenen Seren. PKH67 (grün) gefärbte und mit GM-CSF (100 ng/ml) und IFN- γ (100 U/ml) stimulierte PMN wurden mit PKH26 (rot) gefärbten apoptotischen Zellen im Verhältnis 1:4 in Medium unter Zellkulturbedingungen inkubiert. In den verschiedenen Phagozytoseansätzen war dabei entweder nur Medium (10 % FCS), 50 % HIS oder 50 % NHS anwesend. Durchflusszytometrische Analyse. Die Prozentzahlen geben die Phagozytoserate (Anteil der doppelt-positiven Effektorzellen an der Gesamtzahl der Effektorzellen) an. Daten eines Experiments, repräsentativ für mindestens 3 unabhängige Experimente.

3.6.2 Darstellung von Phagozytose-relevanten

Oberflächenrezeptoren auf PMN

Wie gezeigt, waren Serumfaktoren zur Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN notwendig. Es ist naheliegend, dass diese Serumfaktoren apoptotische Zellen opsonisieren. Die Opsonine auf den apoptotischen Zellen interagieren dann mit spezifischen Rezeptoren auf PMN und vermitteln die Phagozytose.

In den folgenden Versuchen sollten Rezeptoren, die bei der Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN eine Rolle spielen könnten, näher untersucht werden.

In der Literatur sind für Makrophagen verschiedene Rezeptoren beschrieben, die bei der Phagozytose apoptotischer Zellen involviert sind. Die Expression einiger dieser Rezeptoren auf der Oberfläche von PMN wurde im nächsten Experiment mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörperfärbungen und durchflusszytometrischer Analyse unter-

sucht. Insbesondere die Komplementrezeptoren CR1 (CD35), CR3 (CD18/CD11b), CR4 (CD18/CD11c) und die Fc γ Rezeptoren II und III (CD32, CD16) erschienen dabei interessant, da sie Rezeptoren für Serumfaktoren (Komplement bzw. Immunglobuline, CRP, SAP) sind und somit an der serumvermittelten Phagozytose beteiligt sein könnten. Auch die Expression des Scavenger-Rezeptors CD36 und des von Fadok et al. beschriebenen Phosphatidylserinrezeptors (PSR) wurden untersucht.

Wie in Abb. 3.13 zu erkennen ist, konnten CD36 und der PSR auf PMN nicht dargestellt werden. Die anderen untersuchten Rezeptoren CD14, die Komplementrezeptoren CD35, CD18, CD11b, CD11c, und die Fc γ Rezeptoren CD16 und CD32 waren hingegen klar exprimiert.

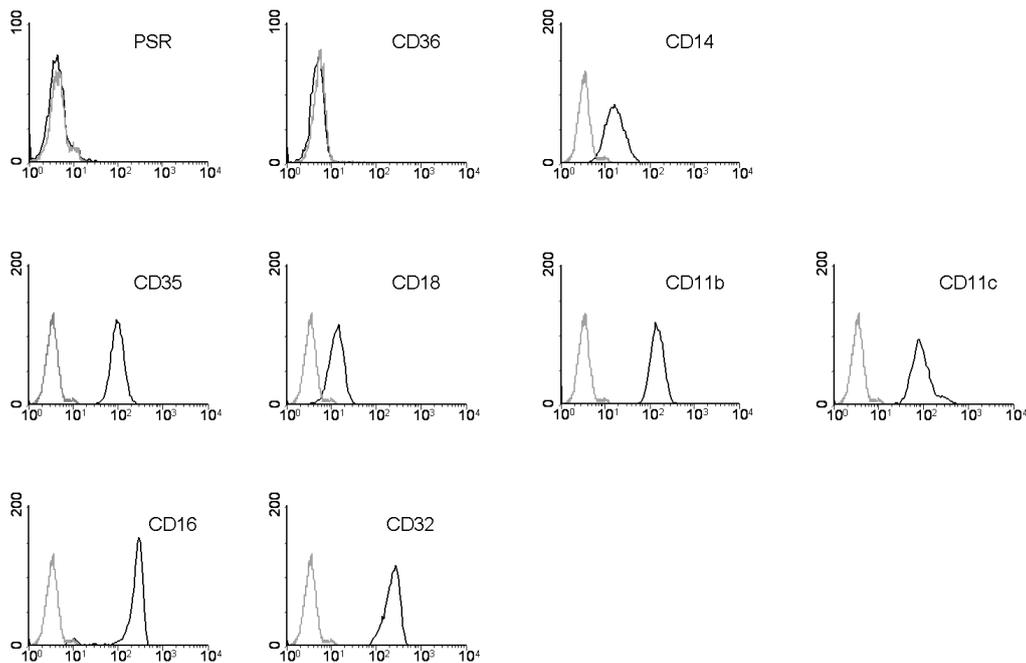


Abbildung 3.13: Darstellung von Oberflächenrezeptoren auf PMN. Die Färbung mit monoklonalen Antikörpern wurde wie in 2.2.6 beschrieben durchgeführt. Die graue Linie stellt die Isotypkontrolle dar, die schwarze Linie die Fluoreszenzintensität des jeweiligen konjugierten Antikörpers. Daten eines Experiments.

3.6.3 Der Fc γ Rezeptor II (CD32) ist von Bedeutung bei der Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN

Nun sollte untersucht werden, ob die im vorigen Versuch darstellbaren Oberflächenrezeptoren an der Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN beteiligt sind. Dazu wurden die jeweiligen Rezeptoren vor der Phagozytose mit spezifischen Antikörpern blockiert. Durch Blockierung des Fc γ Rezeptor II (CD32) konnte die Aufnahme apoptotischer Zellen um etwa ein Drittel reduziert werden. Die Blockade der anderen Rezeptoren führte hingegen zu keiner Erniedrigung der Phagozytoserate (Abb. 3.14).

Aus diesem Befund kann geschlossen werden, dass der Fc γ Rezeptor II (CD32) auf PMN an der Phagozytose apoptotischer Zellen beteiligt ist. Da die Aufnahme apoptotischer Zellen aber nur zu einem Teil blockiert ist, sind wahrscheinlich noch weitere Rezeptoren beteiligt.

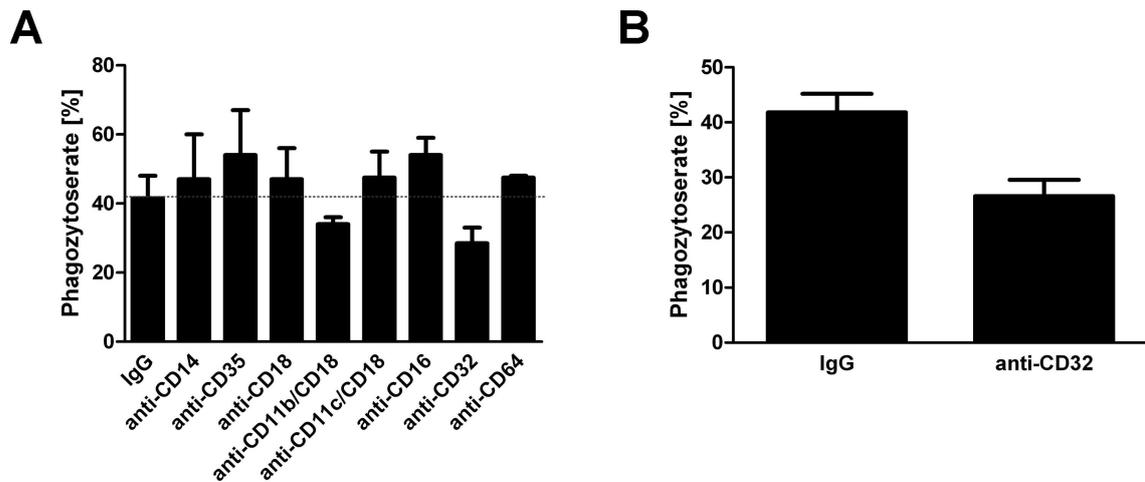


Abbildung 3.14: Auswirkung der Rezeptorblockade durch spezifische Antikörper auf die Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN. PKH67 gefärbte, mit GM-CSF (100 ng/ml) und IFN- γ (100 U/ml) stimulierte PMN wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Antikörpern gegen die Rezeptoren CD14, CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18), Fc γ R I (CD64), Fc γ R II (CD32) Fc γ R III (CD16) in Konzentrationen von 50 μ g/ml inkubiert. Ein Kontrollansatz erfolgte mit unspezifischem murinen IgG in der gleichen Konzentration. Nach zweimaligem Waschen wurden die blockierten PMN mit PKH26 gefärbten apoptotischen PMN im Verhältnis 1:4 in Medium (50 % autologes Serum) unter Zellkulturbedingungen für 90 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert und die Phagozytoserate (Anteil der doppelt-positiven Effektorzellen an der Gesamtzahl der Effektorzellen) der einzelnen Ansätze festgestellt. In **A** ist bereits zu erkennen, dass die Blockierung durch Anti-CD32 Antikörper zu einer Abnahme der Phagozytoserate führt (n=2 Experimente mit Standardabweichung). **B** stellt die Phagozytose der PMN nach Blockierung mit Anti-CD32 der Kontrollgruppe gegenüber (n=5 Experimente mit Standardabweichung, $p \leq 0,01$).

3.6.4 C-reaktives Protein und Serum Amyloid P tragen nicht zur Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN bei

Aus den Feststellungen, dass auf der einen Seite Serumfaktoren zur Aufnahme apoptotischer Zellen nötig sind, und dass auf der anderen Seite ein Rezeptor auf PMN gefunden wurde, der die Aufnahme apoptotischer Zellen vermittelt, stellte sich nun die Frage: Welche Serumfaktoren opsonisieren apoptotische Zellen und passen zum $Fc\gamma$ Rezeptor II (CD32)?

CD32 interagiert bekanntermaßen mit der Fc-Region von Gammaglobulinen und ist ein Phagozytoserezeptor für Immunglobulinkomplexe [79], [84]. Weiterhin sind aber auch die akute-Phase-Proteine C-reaktives Protein (CRP) und Serum Amyloid P Komponente (SAP) Liganden dieses Rezeptors [11], [12]. Von CRP und SAP ist außerdem beschrieben, dass sie apoptotische Zellen opsonisieren und dadurch deren Phagozytose durch Makrophagen vermitteln [42], [73]. So erschien es naheliegend, dass CRP oder SAP auch zur Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN beitragen könnten. Dies wurde in einem Experiment untersucht, bei dem zu den Phagozytoseansätzen CRP oder SAP zugegeben wurde. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass die Phagozytoserate sich nach Zugabe von CRP oder SAP zum Phagozytoseansatz nicht wesentlich ändert, unabhängig davon, ob im Phagozytoseansatz normales humanes Serum, hitzeinaktiviertes Serum oder kein Serumzusatz enthalten war (Abb. 3.15).

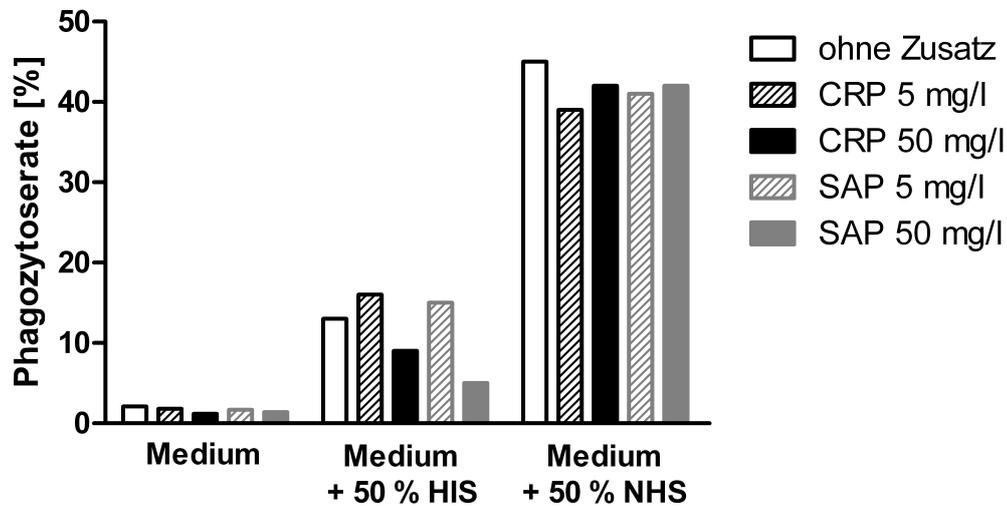


Abbildung 3.15: Auswirkung von CRP und SAP auf die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch PMN. PKH67 gefärbte, mit GM-CSF (100 ng/ml) und IFN- γ (100 U/ml) stimulierte PMN wurden für 90 Minuten mit PKH26 gefärbten apoptotischen PMN im Verhältnis 1:4 in Medium unter Zellkulturbedingungen inkubiert. In den verschiedenen Inkubationsansätzen war dabei entweder nur Medium (10 % FCS), 50 % HIS oder 50 % NHS anwesend. Den Phagozytoseansätzen wurde CRP oder SAP in Konzentrationen von 5 mg/l oder 50 mg/l zugefügt. Durchflusszytometrisch wurde die Phagozytoserate (Anteil der doppelt-positiven Effektorzellen an der Gesamtzahl der Effektorzellen) ermittelt. Es ist festzustellen, dass die Zugabe von CRP oder SAP zum Phagozytoseassay in keinem Fall die Phagozytoserate deutlich erhöht. Daten eines Experiments, repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.6.5 Depletion des Serums von IgG erniedrigt die

Phagozytoserate von apoptotischen Zellen durch PMN

Wenn nun CRP und SAP keinen Einfluss auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN haben, so sollte weiter untersucht werden, ob Immunglobuline dabei eine Rolle spielen. Von IgG ist aus *in vitro*-Versuchen beschrieben, dass es – in Form von Immunkomplexen oder als Autoantikörper – apoptotische Zellen opsonisieren und damit deren Phagozytose durch Makrophagen oder dendritische Zellen steigern kann [47], [48], [67].

Um die Bedeutung von IgG für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN

zu untersuchen, wurden Versuche durchgeführt, bei denen als Medienzusatz anstatt NHS IgG-depletiertes Serum zum Phagozytoseansatz zugegeben wurde. IgG wurde dem Serum mittels Affinitätschromatografie (Protein G Sepharose) entzogen. Im IgG-depletierten Serum war die Phagozytose um etwa 75 % geringer als im Kontrollansatz mit normalem humanen Serum (Abb. 3.16).

Diese erstaunlich hohe Reduktion der Phagozytose gab Anlass zur Frage, ob dieser Effekt allein auf das fehlende IgG zurückzuführen ist oder ob bei der Depletion auch andere Serumfaktoren entzogen oder inaktiviert wurden. Deshalb wurde eine Prüfung der IgG-depletierten Seren auf Gesamtkomplementaktivität mittels Erythrozytolysen veranlasst, die im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck durchgeführt wurde. Es zeigte sich in beiden in den Phagozytoseansätzen verwendeten IgG-depletierten Seren eine verringerte Gesamtkomplementaktivität im klassischen Weg (26 % bzw. 42 % des unteren Normwertes), eines der Seren wies zusätzlich eine verringerte Gesamtkomplementaktivität im alternativen Weg auf (77 % des unteren Normwertes, Daten nicht gezeigt).

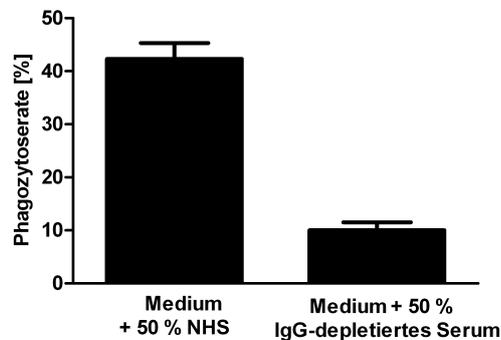


Abbildung 3.16: Auswirkung der IgG-Depletion des zum Phagozytoseansatz zugegebenen Serums auf die Phagozytoserate. PKH67 gefärbte, mit GM-CSF (100 ng/ml) und IFN- γ (100 U/ml) stimulierte PMN wurden für 90 Minuten mit PKH26 gefärbten apoptotischen PMN im Verhältnis 1:4 in Medium unter Zellkulturbedingungen inkubiert. In zwei verschiedenen Phagozytoseansätzen waren dabei 50 % NHS oder 50 % IgG-depletiertes Serum (zwei unterschiedliche Serumspenden) anwesend. Die Phagozytoserate (Anteil der doppelt-positiven Effektorzellen an der Gesamtzahl der Effektorzellen) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. n=3 Experimente mit Standardabweichung, $p \leq 0,01$.

3.6.6 Apoptotische PMN werden in autologem Serum nicht durch IgG opsonisiert

Die Reduktion der Phagozytose nach IgG-Depletion des Serums gab Hinweise darauf, dass Immunglobuline an der Aufnahme apoptotischer Zellen beteiligt sind. Im folgenden Versuch sollte geprüft werden, ob apoptotische Zellen durch IgG im Serum opsonisiert werden. Dazu wurde nach der Inkubation von apoptotischen PMN in autologem Serum eine Oberflächenanalyse mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern gegen humanes IgG wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben durchgeführt. Abb. 3.17 zeigt die Auswertung eines solchen Experiments. Es ist zu erkennen, dass auf der Oberfläche der apoptotischen PMN kein IgG nachgewiesen werden konnte.

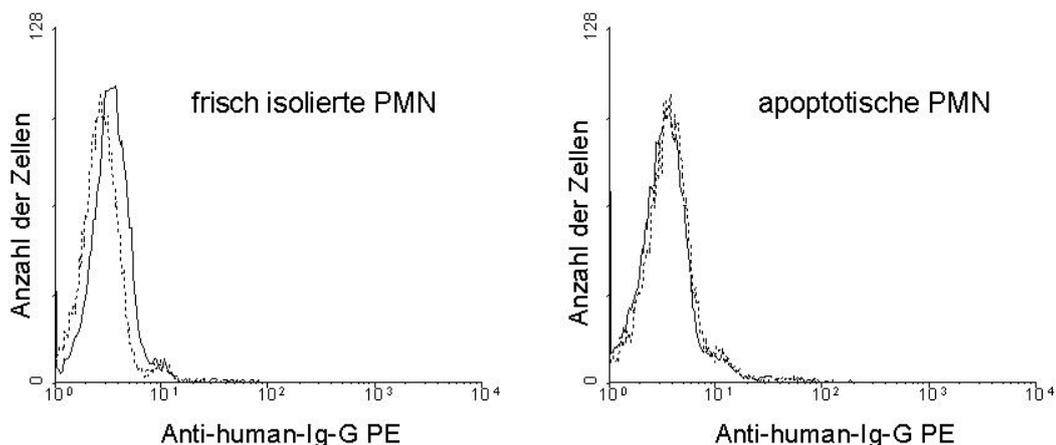


Abbildung 3.17: Eine IgG-Opsonisierung apoptotischer PMN lässt sich durchflusszytometrisch nicht nachweisen. Frisch isolierte und apoptotische PMN wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur in autologem Serum inkubiert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit 50 µg/ml Anti-human-IgG PE für 20 Minuten auf Eis. Für die Kontrollfärbung wurden 50 µg/ml eines PE-markiertem Isotypkontrollantikörpers eingesetzt. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Im dargestellten Diagramm ist die Anzahl der Zellen gegen die Fluoreszenzaktivität des gebundenen Antikörpers aufgetragen. Wie der Isotypkontrollantikörper (unterbrochene Linie) bindet auch Anti-human-IgG (durchgezogene Linie) weder an frisch isolierten noch an apoptotischen PMN. Daten eines Experiments, repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

4 Diskussion

Entzündungen gehen regelhaft mit einem Einstrom von Leukozyten in das entzündete Gewebe einher. Neutrophile Granulozyten stellen dort die überwiegende Zellart dar und übernehmen wichtige Aufgaben zum Beispiel bei der Infektabwehr. Bei einer sehr kurzen Überlebenszeit fallen im Laufe der Entzündung viele apoptotische PMN an. Eine effiziente und schnelle Abräumung dieser apoptotischen Zellen ist zur Begrenzung der Entzündung wichtig, um einer Gewebeschädigung durch Freisetzung toxischer Substanzen aus sekundär nekrotischen PMN vorzubeugen. Insbesondere im Rahmen der Beendigung der Entzündung ist eine rasche Eliminierung apoptotischer Zellen wichtig [23], [50], [60].

Die Phagozytose der apoptotischen Zellen erfolgt nach überwiegender Autorennennung durch Makrophagen und ist dort ausführlich untersucht, wenngleich die Aufnahmemechanismen noch nicht vollständig geklärt sind. Sie geht einher mit der Ausschüttung immunmodulierender, pro- und antiinflammatorischer Zytokine. Inwieweit PMN zur Beendigung der Entzündung und zur Eliminierung apoptotischer Zellen beitragen, ist indessen so gut wie nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Rolle von PMN für die Phagozytose apoptotischer Zellen untersucht. Dabei wurde insbesondere der Frage nachgegangen, ob PMN in der Lage sind, apoptotische Zellen zu phagozytieren.

4.1 Vorversuche

Die Lichtmikroskopie Giemsa-gefärbter Präparate aus Phagozytoseansätzen ist eine etablierte Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung der Phagozytose apoptotischer Zellen [26], [28], [70]. Auch in dieser Arbeit konnte mit dieser Methode die Aufnahme apoptotischer Lymphozyten durch Makrophagen dargestellt werden (Abb. 3.2). Die Fähigkeit von PMN, Bakterien zu phagozytieren, konnte ebenfalls gezeigt werden, und zwar lichtmikroskopisch, fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch. (Abb. 3.3, Abb. 3.4).

Die Apoptose der Lymphozyten in den Vorversuchen wurde durch den bekannten Apoptoseinduktor Staurosporin induziert [10]. Die Auslösung der Apoptose in PMN erfolgte durch UV-Bestrahlung. Mit einer Bestrahlungsdosis von 200 mJ/cm^2 und anschließender vierstündiger Inkubation unter Zellkulturbedingungen konnte ein hoher Anteil frühapoptotischer (Annexin-V-positiv, PI-negativ) PMN generiert werden. Vergleichbare Apoptoseraten von PMN sind mit dieser Methode bereits von Devitt et al. [26] beschrieben. Es wurde darauf Wert gelegt, dass sich die Zielzellen in einem frühen Stadium der Apoptose befanden und nicht bereits sekundär-nekrotisch waren, denn die Phagozytose membranintakter apoptotischer Zellen sollte untersucht werden. Außerdem sollte vermieden werden, dass PMN durch Membranfragmente oder freigesetzte Enzyme aus nekrotischen Zellen beeinflusst/aktiviert werden.

4.2 Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN

4.2.1 Morphologische Darstellung mittels Mikroskopie

Während die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Makrophagen lichtmikroskopisch gezeigt werden konnte, erwies sich die Darstellung der Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN als schwieriger. So konnten in Giemsa-gefärbten Präparaten keine PMN gefunden werden, die apoptotische Zellen offensichtlich aufgenommen hatten.

Jedoch konnten fluoreszenzmikroskopische Bilder die Phagozytose apoptotischer Zellen zeigen (Abb. 3.6 B). Auch durchflusszytometrisch konnte die Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN gezeigt werden, sowohl im Phagozytoseansatz mit isolierten Zellen als auch im Vollblutphagozytoseansatz.

Diese Daten zeigen erstmalig, dass aufgereinigte PMN in der Lage sind, *in vitro* apoptotische Zellen zu phagozytieren. Zwar konnten *in vivo* Experimente bereits zeigen, dass massiver Anfall von apoptotischen Zellen im Thymus von Mäusen zu einem Einstrom von PMN führt, deren Bedeutung konnte jedoch nicht geklärt werden [102]. Misawa et al. führten Experimente durch, bei denen apoptotische Zellen in die Bauchhöhle von Mäusen injiziert wurden und untersuchten anschließend die Peritoneallavage. Darin konnten sie neben Makrophagen auch eingewanderte PMN finden. Sie konnten jedoch nur in den Makrophagen aufgenommene apoptotische Zellen zeigen, nicht in den PMN [71].

Es stellt sich hier die Frage, warum der morphologische Nachweis der Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN so schwierig ist, lichtmikroskopisch sogar überhaupt nicht gelang. Obwohl in dieser Arbeit fluoreszenzmikroskopische Bilder präsentiert werden konnten, so waren diese auf den Präparaten nicht in der Menge zu finden, wie die durchflusszytometrischen Phagozytoseraten vermuten ließen. Tatsächlich ließ sich in weniger als 5 % der Effektorzellen eindeutig apoptotisches Material abgrenzen.

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass das apoptotische Material nach der Phagozytose so schnell abgebaut wird, dass es in den mikroskopischen Präparaten schon nicht mehr zu identifizieren ist. Die Erkennung, Aufnahme und der Abbau apoptotischer Zellen durch Makrophagen ist ein Prozess, der innerhalb von Minuten abläuft. In *in vitro*-Phagozytoseversuchen kann schon nach wenigen Minuten die Phagozytose apoptotischer PMN durch Makrophagen beobachtet werden und nach 60 Minuten sind die aufgenommenen Zellen bereits zum größten Teil abgebaut [75], [91].

Da die Phagozytose bei PMN nach ähnlichen Prinzipien erfolgt, wie die bei Makrophagen, ist anzunehmen, dass auch die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN

entsprechend schnell verläuft. Mit dem schnellen Abbau der phagozytierten Zellen verteilt sich der Farbstoff im gesamten Zellplasma und ist damit nicht mehr abgrenzbar, möglicherweise wird auch der Farbstoff selbst abgebaut. Auch mit den apoptotischen Zellen aufgenommene Zellkerne können nach deren Zersetzung nicht mehr angefärbt und im Giemsa-gefärbten Präparat erkannt werden.

Die fehlende Erkennbarkeit in Giemsa-gefärbten lichtmikroskopischen Präparaten lässt sich (neben dem schnellen Abbau von Kernmaterial) aber auch damit begründen, dass die PMN apoptotische Zellen nicht *in toto* phagozytieren, sondern in Form von „*apoptotic bodies*“. Diese sind zu klein und enthalten zu wenig dunkelblau abgrenzbares Kernmaterial, um in den Effektorzellen lichtmikroskopisch erkennbar zu sein. Für diese Begründung sprechen die mikroskopischen Bilder (Abb. 3.6 B) in dieser Arbeit, die in phagozytierenden Zellen stets nur kleinere Einschlüsse, nie jedoch ganze Zellen zeigten.

4.2.2 Durchflusszytometrische Darstellung

Die durchflusszytometrische Analyse ist eine etablierte Methode zur Darstellung und Quantifizierung der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen [3], [42], [100], die dementsprechend in dieser Arbeit für PMN angewandt wurde. Mit der Durchflusszytometrie konnten die mikroskopischen Befunde bestätigt werden. Darüber hinaus konnte das Ausmaß der Phagozytose quantifiziert und die Phagozytoseraten aus verschiedenen Ansätzen miteinander verglichen werden. Der prozentuale Anteil der durchflusszytometrisch doppelt-positiven PMN an der Gesamtzahl der Effektorzellen gab dabei an, wie viele PMN apoptotische Zellen phagozytiert hatten.

Es zeigten sich bei nativen, unstimulierten PMN Phagozytoseraten von 15-20 %. In Kontrollansätzen, in denen statt apoptotischen Zellen unbestrahlte Zielzellen verwendet wurden, waren die Phagozytoseraten deutlich geringer, dennoch konnten auch dort stets doppelt-positive Effektorzellen beobachtet werden. Dies ist nicht erstaunlich, denn auch ohne Bestrahlung war vier Stunden nach der Isolation schon ein kleiner Teil der PMN apoptotisch (vgl. Abb. 3.5).

Ebenso wie die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sprechen auch die durchflusszytometrischen Auswertungen der Phagozytoseversuche dafür, dass nicht ganze Zellen, sondern nur Teile der apoptotischen Zellen aufgenommen werden. Auf den Punktediagrammen ist zu erkennen, dass die meisten doppelt-positiven Effektorzellen nicht die volle Fluoreszenzintensität der Zielzellen annehmen, sondern nur leicht positiv sind. Ein schneller Abbau des phagozytierten Farbstoffes würde dieses Phänomen jedoch auch erklären.

Schließlich soll noch der mögliche Einwand erörtert werden, dass es sich bei den doppelt-positiven Effektorzellen auch um einen unspezifischen Übertritt von Farbstoff oder Membrananteilen apoptotischer Zellen auf die vitalen PMN handeln könnte. Auch wenn einige mikroskopische Bilder die Aufnahme von *apoptotic bodies* morphologisch nahe legen, so könnte argumentiert werden, dass der Hauptteil der doppelt-positiven Zellen im Wesentlichen durch passiven Farbstoffübertritt zustande kommt. Bei bovinen PMN konnte von Whale et al. gezeigt werden, dass sie Membranbestandteile apoptotischer PBMC passiv annehmen [108]. Die dort präsentierten Ergebnisse konnten für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche jedoch nicht nachvollzogen werden: Während bei Whale et al. in serumfreiem Medium ein Übertritt von PKH-Farbstoff und Membranproteinen auf alle PMN im Koinkubationsansatz beobachtet wurde, waren in den Versuchen dieser Arbeit in Abwesenheit von Serum keine doppelt-positiven Zellen zu finden.

Die in dieser Arbeit gezeigte Zunahme bzw. Abnahme der doppelt-positiven Fraktion der Effektorzellen durch Stimulation mit phagozytosefördernden Zytokinen, durch Ausschaltung von Serumkomponenten und durch Blockade eines relevanten Phagozytoserezeptors belegt weiterhin, dass die doppelt-positiven Zellen durch Phagozytose apoptotischen Materials entstanden sind.

4.2.3 Vollblutphagozytoseversuche

Der Vollblutphagozytoseversuch stellte eine weitere Möglichkeit dar, die Phagozytose apoptotischer Zellen unter Bedingungen darzustellen, die der *in vivo*-Situation ähnlich sind. Dabei konnte gezeigt werden, dass neben PMN auch Monozyten, nicht jedoch Lymphozyten apoptotische Zellen aufnehmen.

Ähnliche Vollblutphagozytoseversuche mit vergleichbaren Ergebnissen wurden von Galati et al. durchgeführt [40]. Bei diesen wurden als Zielzellen jedoch apoptotische Jurkat-Zellen, das sind Zellen einer humanen T-Zelllinie, eingesetzt. Negativkontrollen erfolgten dort, indem die Phagozytoseansätze bei 4°C durchgeführt wurden, was eine aktive Phagozytose verhindern sollte. Die Autoren fanden, dass Monozyten und PMN von Tumorpatienten, die mit GM-CSF therapiert wurden, apoptotische Zellen aufnahmen, in geringerem Ausmaß aber auch PMN und Monozyten untherapierter Patienten und gesunder Spender.

Wenngleich die Ergebnisse der Vollblutphagozytoseversuche von Galati et al. prinzipiell mit den hier erzielten Ergebnissen übereinstimmen, waren die Phagozytoseraten im Vollblut gesunder, nicht mit GM-CSF behandelter Probanden bei Galati et al. etwas geringer als die in dieser Arbeit beobachteten.

4.3 Stimulation zur Phagozytose

Die Phagozytoserate reflektiert die Größe der Subpopulation der Effektor-PMN, die apoptotische Zellen phagozytiert haben. Sie lag bei unstimulierten PMN des peripheren Blutes bei etwa 15 % und ließ sich durch Vorbehandlung der Effektorgranulozyten mit GM-CSF, IFN- γ und LPS auf etwa 45 % steigern. Dies zeigt, dass PMN zur Phagozytose apoptotischer Zellen stimuliert werden können. GM-CSF und IFN- γ sind proinflammatorische Zytokine, die wichtige Rollen im Entzündungsablauf spielen [5]. LPS ist Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien und trägt über eine Aktivierung von Immunzellen mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren auch zum Fortschrei-

ten der Entzündung bei [89]. Alle drei Substanzen haben eine aktivierende Wirkung auf PMN und steigern deren Phagozytosefähigkeit [16], [30], [38], [109].

Ren und Savill haben den Einfluss von Zytokinen auf die Phagozytose apoptotischer PMN untersucht und gefunden, dass proinflammatorische Zytokine wie GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β und TNF- α *in vitro* die Phagozytose apoptotischer PMN durch Makrophagen steigern [85]. Wie bereits im Abschnitt 4.2 diskutiert, konnten auch Galati et al. nach *in vivo* Gabe von GM-CSF positive Auswirkungen auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN und Monozyten zeigen [40]. Eine gesteigerte Phagozytose apoptotischer T-Zellen durch Mikroglia unter Einfluss von IFN- γ ist von Chan et al. beschrieben [21].

Obwohl sie in für *in vitro*-Versuche üblichen Konzentrationen [6], [37] eingesetzt wurden, zeigten die Zytokine G-CSF und M-CSF keine Auswirkung auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN. Direkte Effekte von G-CSF oder M-CSF auf die Aufnahme apoptotischer Zellen sind in der Fachliteratur auch nicht beschrieben.

In vivo ist die Phagozytose apoptotischer PMN ein wesentlicher Bestandteil bei der Beendigung der Entzündung. Wie die hier gefundenen Daten zeigen, verstärken die proinflammatorischen Zytokine GM-CSF und IFN- γ sowie LPS die Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN *in vitro*. Da diese Substanzen in entzündetem Gewebe in hoher Konzentration vorkommen [20], könnten sie auch *in vivo* diesen Effekt haben und damit zur Eindämmung der Entzündung beitragen. Insofern könnten PMN als Entzündungszellen mit hohem gewebetoxischem Potenzial im Rahmen einer Entzündung selbst antiinflammatorisch wirken.

4.4 Mechanismen der Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN

4.4.1 Effekte von Serum

Die Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN bedarf der Anwesenheit von Serum. Da Hitzeinaktivierung des Serums im Phagozytoseansatz die Phagozytose hemmt, aber nicht vollständig verhindert, kann geschlussfolgert werden, dass hitzestabile und hitzelabile Faktoren eine Rolle spielen.

Im Gegensatz zu den hier erzielten Ergebnissen ist die allgemeine Phagozytosefähigkeit von PMN nicht an Serumfaktoren gebunden. Die serum- und opsoninunabhängige Aufnahme von Mikroorganismen ist aus zahlreichen Untersuchungen bekannt [64], [77].

Auch die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Makrophagen setzt nicht die Anwesenheit von Serum im Phagozytoseansatz voraus [28], [49], (eigene Ergebnisse). Gleichwohl sind Serumfaktoren dabei durchaus von Bedeutung, da sie über eine Opsonisierung apoptotischer Zellen deren Phagozytose vermitteln können [49], [87]. Als solche Opsonine sind Komplementproteine [70], [100], Antikörper [62], Pentraxine [73] und antikoagulatorische Proteine [3] beschrieben. Serumfaktoren scheinen auch *in vivo* für die Phagozytose apoptotischer Zellen wichtig zu sein. Das wird am Beispiel der SLE-Erkrankung deutlich, bei der pathogenetisch eine verminderte Aufnahme apoptotischer Zellen aufgrund eines Defektes im Komplementsystem diskutiert wird [13].

Schließlich ist auch die serumunabhängige Opsonisierung apoptotischer Zellen beschrieben: Hanayama et al. zeigten, dass Makrophagen das Protein MFG-E8 produzieren, das apoptotische Zellen bindet und damit deren Phagozytose vermittelt [45]. Es kann spekuliert werden, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN unter serumfreien Bedingungen deshalb nicht möglich ist, weil Neutrophile selbst nicht zur Synthese und Sekretion dieser Opsonine fähig sind, sondern auf solche im Serum an-

gewiesen sind. Alternativ ist denkbar, dass die Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN grundsätzlich anderen Mechanismen unterliegt als die durch Makrophagen.

4.4.2 Rezeptoren, CD32, CRP, SAP und Immunkomplexe

Durchflusszytometrisch konnten auf der Oberfläche von nativen PMN die Rezeptoren CD14, die Fc γ Rezeptoren II und III und die Komplementrezeptoren CR1, CR3 und CR4 nachgewiesen werden. Die Blockierung dieser Rezeptoren mit monoklonalen Antikörpern führte nur beim Fc γ RII (CD32) zu einer Reduktion der Phagozytose apoptotischer Zellen. Damit konnte gezeigt werden, dass dieser Rezeptor an der Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN beteiligt ist.

Da durch Blockierung dieses Rezeptors die Phagozytose nur zum Teil reduziert wurde, ist es wahrscheinlich, dass noch weitere Rezeptoren an der Aufnahme beteiligt sind. Allerdings ist eine vollständige Hemmung der Phagozytose apoptotischer Zellen in Phagozytoseansätzen auch in der Literatur nirgends beschrieben, selbst wenn mehrere blockierende Antikörper kombiniert wurden [49].

Fc γ Rezeptoren sind wichtige Phagozytoserezeptoren auf Monozyten, Makrophagen und PMN. Die Bindung von IgG-Immunkomplexen an Fc γ Rezeptoren führt zu deren Quervernetzung und die leitet die Phagozytose ein. Auf nativen PMN sind die Fc γ Rezeptoren III (CD16) und II (CD32) exprimiert. Fc γ RI (CD64) befindet sich auf Monozyten und Makrophagen [58].

Die Fc γ Rezeptoren unterscheiden sich voneinander in ihrer Größe und Struktur, im Verteilungsmuster der Rezeptoren auf den Zellen sowie in der Affinität und Spezifität zu ihren Liganden [90]. Während sowohl Fc γ RII als auch Fc γ RIII mit humanem IgG1 und IgG3 interagieren, zeichnet sich der Fc γ RII dadurch aus, dass er auch IgG2-Immunkomplexe bindet [79], [106].

Auch die strukturverwandten Pentraxine C-reaktives Protein CRP und Serum Amyloid P (SAP) sind Liganden von CD32 [11], [12]. Sie sind bedeutsam als Akute-Phase-Proteine und werden unter Zytokineinfluss im Rahmen systemischer Entzündungsre-

aktionen von der Leber in die Blutbahn abgegeben. Beide Pentraxine können apoptotische Zellen opsonisieren und darüber zu einer gesteigerten Phagozytose durch Makrophagen beitragen [42], [73]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnten jedoch keine Auswirkungen von CRP oder SAP auf die Phagozytose apoptotischer Zellen gezeigt werden.

Auf der Suche nach Serumfaktoren, die apoptotische Zellen binden und zum Fc γ RII passen, wurden schließlich die Immunglobuline untersucht. Es ist bekannt, dass es im humanen Serum natürliche Antikörper vom IgM-Isotyp gibt, die an apoptotischen Zellen binden [62]. Außerdem wurde gefunden, dass IgG-Immunkomplexe an apoptotische PMN binden, was zur erhöhten Aufnahme durch Makrophagen führt [47], [48].

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass im IgG-depletierten Serum die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN reduziert ist. Dieses Ergebnis muss jedoch vorsichtig interpretiert werden, denn es wurde in den depletierten Seren auch eine verminderte Komplementaktivität festgestellt. Möglicherweise sind darüber hinaus weitere potenzielle Opsonine entfernt worden. Der Hinweis auf IgG-Beteiligung konnte schließlich nicht erhärtet werden, denn der Versuch, eine Opsonisierung von apoptotischen PMN durch IgG im Serum darzustellen, gelang nicht (Abb. 3.17).

Während also gezeigt werden konnte, dass der Fc γ RII für die Aufnahme apoptotischer Zellen bedeutsam ist, bleibt die Frage nach den Serumfaktoren, die apoptotische Zellen opsonisieren und deren Phagozytose durch PMN vermitteln, offen.

4.5 Schlussbetrachtung

In der vorliegenden Arbeit ist Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN erstmals umfassend analysiert worden. Im Wesentlichen konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

1. PMN phagozytieren apoptotische PMN *in vitro*.
2. Durch Vorbehandlung der Effektorzellen mit LPS, GM-CSF und IFN- γ konnte die Phagozytose gesteigert werden.
3. Hitzelabile und hitzestabile Serumfaktoren sind für die Phagozytose von Bedeutung.
4. Der Fc γ Rezeptor II (CD32) ist bei der Aufnahme apoptotischer Zellen durch PMN involviert.

Die Ergebnisse zeigen zwischen der hier untersuchten Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN und der in der Literatur beschriebenen Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen Gemeinsamkeiten, aber auch deutliche Unterschiede. Eine Übersicht darüber gibt Tab. 4.1.

Makrophagen	PMN
Phagozytose ganzer apoptotischer Zellen [70], [91], Abb. 3.2	Vermutlich Phagozytose von <i>apoptotic bodies</i>
Lichtmikroskopisch darstellbar auf Giemsa- oder myeloperoxidasegefärbten Präparaten [28], [50], [70], [91]	Lichtmikroskopisch auf Giemsa-gefärbten Präparaten nicht darstellbar
Unter serumfreien Bedingungen möglich, Serumfaktoren erhöhen aber die Phagozytose [3], [28], [49]	Unter serumfreien Bedingungen nicht möglich
Fc γ R II nicht explizit untersucht, Fc γ -Rezeptoren scheinen aber bedeutsam zu sein [49]	Fc γ R II als beteiligter Rezeptor
Stimulation durch IFN- γ und GM-CSF erhöht die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen [21], [85] und PMN	

Tabelle 4.1: Vergleich: Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen und PMN.

5 Zusammenfassung

Apoptotische Zellen entstehen in vielen physiologischen Prozessen, zum Beispiel im Rahmen der Embryonalentwicklung, beim Gewebe-Remodeling und bei der Entwicklung des Immunsystems. Im gesunden Organismus werden sie rasch und effizient durch Phagozyten abgeräumt, ohne dass begleitende Entzündungsreaktionen bemerkbar sind. Neutrophile Granulozyten werden dabei in der Regel nicht gefunden und scheinen auch keine wesentliche Rolle zu spielen.

Apoptotische Zellen entstehen aber auch im Rahmen entzündlicher Prozesse, in denen PMN in hoher Anzahl vorkommen. Die Apoptose von Entzündungszellen und deren schnelle und effiziente Entfernung sind zur Begrenzung der Entzündung wichtig, um kollaterale Gewebeschäden zu verhindern. Während die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen oder dendritische Zellen weitgehend untersucht ist, war die Bedeutung von PMN für die Phagozytose apoptotischer Zellen bislang unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob PMN apoptotische Zellen *in vitro* phagozytieren.

Dazu wurden humane PMN mit autologen PMN, bei denen die Apoptose durch UV-Strahlung ausgelöst worden war, im Verhältnis 1:4 bei 37°C in Medium mit 50 % autologem Serum inkubiert. Die frischen PMN wurden mit dem grün fluoreszierendem Farbstoff PKH67, die apoptotischen Zellen mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff PKH26 gefärbt.

Die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN konnte fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch gezeigt werden. Nach 90-minütiger Koinkubation hatten

15–20 % der PMN apoptotische Zellen aufgenommen. Durch Vorstimulation der PMN mit LPS, GM-CSF und IFN- γ konnte die Phagozytoserate auf 40–50 % gesteigert werden.

Hitzelabile und hitzestabile Serumfaktoren sind für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN notwendig, denn Hitzeinaktivierung des Serums bei 56°C für 30 Minuten reduzierte die Phagozytose um etwa 50 %. Ohne Serum konnte keine Phagozytose apoptotischer Zellen beobachtet werden. Durch Blockierungsexperimente mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Membranrezeptoren auf PMN konnte gezeigt werden, dass der Fc γ Rezeptor II (CD32) an der Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN beteiligt ist.

Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass PMN apoptotische Zellen erkennen und phagozytieren können und belegen, dass PMN eine wichtige Rolle bei der Entfernung apoptotischer Zellen in entzündeten Geweben spielen und damit einen Beitrag zur Begrenzung der Entzündung beitragen könnten.

6 Summary

Apoptotic cells that arise in many physiological processes including embryogenesis, tissue remodeling and development of immune system are rapidly and efficiently removed by phagocytes without induction of inflammatory reactions. Neutrophil granulocytes (PMN) are not found in these tissues and do not seem to play a fundamental role for the clearance of apoptotic cells.

In inflamed tissues apoptotic cells also arise in high numbers and are rapidly removed by phagocytes. The engulfment and subsequent clearance of apoptotic cells by macrophages or dendritic cells have been intensively investigated. Although in many inflamed tissues neutrophil granulocytes (PMN) are the most abundant leukocytes, little is known about the ability of PMN to ingest apoptotic cells. The aim of this study was to investigate whether PMN can phagocytose apoptotic cells *in vitro*.

Human PMN were co-incubated with UV-induced autologous apoptotic PMN in a ratio 1:4 in the presence of 50 % autologous serum. Fresh PMN were labelled with the green fluorescent dye PKH67 and apoptotic cells were labelled with the red fluorescent dye PKH26.

Phagocytosis of apoptotic cells by PMN was assessed by fluorescence-microscopy and FACS-analysis. After 1,5 h of coincubation 15–20 % of PMN ingested apoptotic cells. Pre-treatment of the PMN with LPS, GM-CSF and IFN- γ enhanced the phagocytosis rate to 40–50 %.

Phagocytosis required heat-labile and heat-stabile serum factors since heat inactivation of the serum at 56°C for 30 min reduced the phagocytosis by about 50 %. In the

complete absence of serum no phagocytosis was observed. Blocking experiments with monoclonal antibodies directed against various membrane receptors of granulocytes revealed that the Fc γ receptor II (CD32) is involved in the uptake of apoptotic cells by PMN.

These data demonstrate that neutrophil granulocytes can recognize and phagocytose apoptotic cells and suggest the PMN can play a major role in the clearance of apoptotic cells at sites of inflammation.

Literaturverzeichnis

- [1] Albert ML, Pearce SFA, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhargava N: Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via avb5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T-lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1359–1368 (1998)
- [2] Albert ML, Kim JI, Birge RB: Alphabeta5 integrin recruits the CrkII-Cock 180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* 2, 899–905 (2000)
- [3] Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H, Shacter E: Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol* 4, 87–91 (2003)
- [4] Antal JM, Cunningham JV, Goodrum KJ: Opsonin-independent phagocytosis of group B streptococci: Role of complement receptor type three. *Infect Immun* 60, 1114–1121 (1992)
- [5] Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T: Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 59, 783–836 (1990)
- [6] Araki H, Katayama N, Yamashita Y, Mano H, Fujieda A, Usui E, Mitani H, Ohishi K, Nishii K, Masuya M, Minami N, Nobori T, Shiku H: Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors. *Blood* 103, 2973–2980 (2004)

- [7] Athens JW, Haab OP, Raab SO, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE, Wintrobe MM: Leukokinetic Studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest* 40, 989–995 (1961)
- [8] Babior BM: The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 73, 599–601 (1984)
- [9] Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG: The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 134, 907–934 (1971)
- [10] Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW, Pommier Y: Induction of a common pathway of apoptosis by Staurosporine. *Exp Cell Res* 211, 314–321 (1994)
- [11] Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW: The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fc γ receptor II. *J Exp Med* 190, 585–590 (1999)
- [12] Bharadwaj D, Mold C, Markham E, Du Clos TW: Serum amyloid P component binds to Fc γ receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol* 166, 6735–6741 (2001)
- [13] Bijl M, Reefman E, Limburg PC, Kallenberg CG: Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus: correlates with decreased serum levels of complement. *Ann Rheum Dis* 65, 57–63 (2006)
- [14] Böse J, Gruber AD, Helming L, Schiebe S, Wegener I, Hafner M, Beales M, Köntgen F, Lengeling A: The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J Biol* 3, 15.1–15.18 (2004)

- [15] Boggs DR, Athens JW, Cartwright GE, Wintrobe MM: Leukokinetic studies. IX. Experimental evaluation of a model of granulopoiesis. *J Clin Invest* 44, 643–656 (1965)
- [16] Bohmer RH, Trinkle LS, Staneck JL: Dose effects of LPS on neutrophils in a whole blood flow cytometric assay of phagocytosis and oxidative burst. *Cytometry* 13, 525–531 (1992)
- [17] Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Bastholm L, Nielsen MH, Bainton DF: Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol* 51, 187–198 (1993)
- [18] Brown S, Heinisch I, Ross E, Shaw K, Buckley CD, Savill J: Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* 418, 200–203 (2002)
- [19] Cassatella MA: Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* 73, 369–409 (1999)
- [20] Cavaillon JM, Annane D: Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res* 12, 151–170 (2006)
- [21] Chan A, Magnus T, Gold R: Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and modulation by different cytokines: mechanism for removal of apoptotic cells in the inflamed nervous system. *Glia* 33, 87–95 (2001)
- [22] Cohen JJ: Apoptosis. *Immunol Today* 14, 126–130 (1993)
- [23] Cox G, Crossley J, Xing Z: Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation *in vivo*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12, 232–237 (1995)

- [24] Cui P, Qin B, Liu N, Pan G, Pei D: Nuclear localization of the phosphatidylserine receptor protein via multiple nuclear localization signals. *Exp Cell Res* 293, 154–163 (2004)
- [25] Denk H, Zatloukal K: Zell- und Gewebsreaktionen. In: Böcker W, Denk H, Heitz PhU: Pathologie. 2. Aufl., 35–68, Urban & Fischer, München, 2001
- [26] Devitt A, Pierce S, Oldreive C, Shingler WH, Gregory CD: CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: The role of phosphatidylserine. *Cell Death Differ* 10, 371–382 (2003)
- [27] Dini L, Lentini A, Diez GD, Rocha M, Falasca L, Serafino L, Vidal-Vanaclocha F: Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *J Cell Sci* 108, 967–973 (1995)
- [28] Duvall E, Wyllie AH, Morris RG: Macrophage recognition of cells undergoing cell death (apoptosis). *Immunology* 56, 351–358 (1985)
- [29] Edwards SW, Moulding DA, Derouet M, Moots RJ: Regulation of neutrophil apoptosis. In: Cassatella MA (ed): The neutrophil. 204–224, Chem Immunol Allergy. Karger, Basel, 2003
- [30] Ellis TN, Beaman BL: Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology* 112, 2–12 (2004)
- [31] Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM: Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2 and PAF. *J Clin Invest* 101, 890–898 (1998)
- [32] Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM: The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5, 551–562 (1998)

- [33] Fadok VA: Clearance: The last and often forgotten stage of apoptosis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 203–211 (1999)
- [34] Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM: A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85–90 (2000)
- [35] Fadok VA, Xue D, Henson P: If phosphatidylserine is the death knell, a new phosphatidylserine-specific receptor is the bellringer. *Cell Death Differ* 8 : 582–587 (2001).
- [36] Fietta P: Many ways to die: passive and active cell death styles. *Riv Biol* 99, 69–83 (2006)
- [37] Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM: Granulocyte colony-stimulating factor improves deficient *in vitro* neutrophil transendothelial migration in patients with advanced liver disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 433–439 (2002)
- [38] Fleischmann J, Golde DW, Weisbart RH, Gasson JC. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* 68, 708–711 (1986)
- [39] Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ: Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286, 264–265 (1980)
- [40] Galati G, Rovere P, Citterio G, Bondanza A, Scaglietti U, Bucci E, Heltai S, Fascio U, Rugarli C, Manfredi AA: *In vivo* administration of GM-CSF promotes the clearance of apoptotic cells: effects on monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Leuk Biol* 67, 174–182 (2000)
- [41] Galligan C, Yoshimura T: Phenotypic and functional changes in cytokine-

- activated neutrophils. In: Cassatella MA (ed): The neutrophil. 24–43, Chem Immunol Allergy. Karger, Basel, 2003
- [42] Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon, KB: C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 192, 1353–1364 (2000)
- [43] Goldstein IM, Malmsten CL, Kindahl H, Kaplan HB, Radmark O, Samuelson B, Weissmann G: Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 148, 787–792 (1978)
- [44] Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC: Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007–3017 (1998)
- [45] Hanayama R, Tanaka M, Miwaiwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S: Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417, 182–187 (2002)
- [46] Harada H, Grant S: Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol* 7, 117–138 (2003)
- [47] Hart, SP, Jackson C, Kremmel LM, McNeill MS, Jersmann H, Alexander KM, Ross JA, Dransfield I: Specific binding of an antigen-antibody complex to apoptotic human neutrophils. *Am J Pathol* 162, 1011–1018 (2003)
- [48] Hart SP, Alexander KM, Dransfield I: Immune complexes bind preferentially to Fc γ RIIA (CD32) on apoptotic neutrophils, leading to augmented phagocytosis by macrophages and release of proinflammatory cytokines. *J Immunol* 172, 1882–1887 (2004)
- [49] Hart SP, Smith JR, Dransfield I: Phagocytosis of opsonized apoptotic cells: roles

- for 'old-fashioned' receptors for antibody and complement. *Clin Exp Immunol* 135, 181–185 (2004)
- [50] Haslett C: Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 160, S5–S11 (1999)
- [51] Henson PM, Bratton DL, Fadok VA: Apoptotic cell removal. *Curr Biol* 11, R795–R805 (2001)
- [52] Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR: Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41, 1241–1250 (1998)
- [53] Hoffmann PR, de Cathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, Ridley AJ, Fadok VA, Henson PM: Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* 155, 649–659 (2001)
- [54] Holland SM, Gallin JI: Störungen der Granulozyten und Monozyten. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL: *Harrisons Innere Medizin*. Deutsche Auflage (Hg.: Dietel M, Dudenhausen J, Suttorp N). 15. Aufl., 411–418, McGraw-Hill/ABW Wissenschaftsverlag, Berlin 2003
- [55] Homburg CH, de Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D: Human neutrophils lose their surface Fc γ RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis *in vitro*. *Blood* 85, 532 (1995)
- [56] Horan PK, Slezak SE: Stable cell membrane labelling. *Nature* 340, 167–168 (1989)
- [57] Hughes J, Liu Y, van Damme J, Savill J: Human glomerular mesangial cell phagocytosis of apoptotic cells is mediated by a CD36-independent vitronectin

- receptor/thrombospondin recognition mechanism. *J Immunol* 158, 4389–4397 (1997)
- [58] Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ: *Immunologie*. 5. Aufl., 367–405, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2002
- [59] Kabir J, Lobo M, Zachary I: Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *J Biochem* 367, 145–155 (2002)
- [60] Kar S, Ren Y, Savill JS, Baker A, Haslett C: Inhibition of macrophage phagocytosis *in vitro* of aged neutrophils increases release of neutrophil contents. *Clin Sci* 85, 27 (1995)
- [61] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239–257 (1972)
- [62] Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N, Elkon KB: I-PLA2 activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphatidylcholine leading to binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation. *J Exp Med* 195, 655–665 (2002)
- [63] Kulms D, Schwarz T: Molecular mechanisms involved in UV-induced apoptotic cell death. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15, 342–347 (2002)
- [64] Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jesenius J, Solbach W, Laskay T: Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after opsonin-independent uptake. *Infect Immun* 70, 826–835 (2002)
- [65] Lloyd AR, Oppenheim JJ: Poly's lament: The neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today* 13, 169–172 (1992)

- [66] Maderna P, Godson C: Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1639, 141–151 (2003)
- [67] Manfredi AA, Rovere P, Galati G, Heltai S, Bozzolo E, Soldini L, Davoust J, Balestrieri G, Tincani A, Sabbadini MG: Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. I. Opsonization by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum* 41, 205–214 (1998)
- [68] Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, La Face DM, Green DR: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182, 1545–1556 (1995)
- [69] Messmer UK, Pfeilschifter J: New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays* 22, 878–881 (2000)
- [70] Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB: Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med* 188, 2313–2320 (1998)
- [71] Misawa R, Kawagishi C, Watanabe N, Kobayashi Y: Infiltration of neutrophils following injection of apoptotic cells into the peritoneal cavity. *Apoptosis* 6, 411–417 (2001)
- [72] Moffatt OD, Devitt A, Bell ED, Simmons DL, Gregory CD: Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes. *J Immunol* 162, 6800–6810 (1999)
- [73] Mold C, Baca R, Du Clos TW: Serum amyloid P component and C-reactive protein opsonize apoptotic cells for phagocytosis through Fc γ receptors. *J Autoimmun* 19, 147–154 (2002)
- [74] Moreira MEC, Barcinski MA: Apoptotic cell and phagocyte interplay: recogni-

- tion and consequences in different cell systems. *An Acad Bras Cienc* 76, 93–115 (2004)
- [75] Newman SL, Henson JE, Henson PM: Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J Exp Med* 156, 430–442 (1982)
- [76] Nicholson DW, Thornberry NA: Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299–306 (1997)
- [77] Ofek I, Goldhar J, Keisari Y, Sharon N: Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 49, 239–276 (1995)
- [78] Oka K, Sawamura T, Kikuta K, Itokawa S, Kume N, Kita T, Masaki T: Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9535–9540 (1998)
- [79] Parren PWHI, Warmerdam PAM, Boeijs LCM, Arts J, Westerdal NAC, Vlug A, Capel PJA, Aarden LA, van de Winkel JGJ: On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fc γ RIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. *J Clin Invest* 90, 1537–1546 (1992)
- [80] Payne CM, Glasser L, Tischler ME, Wyckoff D, Cromey D, Fiederlein R, Bohnert O: Programmed cell death of the normal human neutrophil: an *in vitro* model of senescence. *Microsc Res Tech* 28, 32 (1994)
- [81] Pepper C, Thomas A, Tucker H, Hoy T, Bentley P: Flow Cytometric assessment of three different methods for the measurement of *in vitro* apoptosis. *Leukemia Res* 22, 439–444 (1998)
- [82] Platt N, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S: Role for the class A

- macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 93, 12456–12460 (1996)
- [83] Ramprasad MP, Fischer W, Witztum JL, Sambrano GR, Quehenberger O, Steinberg D: The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. Proc Natl Acad Sci USA 92, 9580–9584 (1995)
- [84] Ravetch JV, Kinet JP: Fc-Receptors. Annu Rev Immunol 9, 457–492 (1991)
- [85] Ren Y, Savill J: Proinflammatory cytokines potentiate thrombospondin-mediated phagocytosis of neutrophils undergoing apoptosis. J Immunol 154, 2366–2374 (1995)
- [86] Renehan AG, Booth C, Potten CS: What is apoptosis, and why is it important? BMJ 322, 1536–1538 (2001)
- [87] Roos A, Xu W, Castellano G, Nauta AJ, Garred P, Daha MR, van Kooten C: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. Eur J Immunol 34, 921–929 (2004)
- [88] Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MKB, Dower SK: Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: A critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. J Immunol 168, 4701–4710 (2002)
- [89] Saluk-Juszczak J, Wachowicz B: The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. Postepy Biochem 51, 280–287 (2005)
- [90] Sanders LAM, Feldman RG, Voorhorst-Ogink MM, de Haas M, Rijkers GT, Capel PJA, Zegers BJM, van de Winkel JGJ: Human immunoglobulin G (IgG)

- Fc γ Receptor IIa (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infect Immun* 63, 73–81 (1994)
- [91] Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C: Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. *J Clin Invest* 83, 865–875 (1989)
- [92] Savill JS, Dransfield I, Hogg N, Haslett C: Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 342, 170–173 (1990)
- [93] Savill JS, Hogg N, Ren Y, Haslett C: Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 90, 1513–1522 (1992)
- [94] Serhan CN, Sheppard KA: Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase *in vitro*. *J Clin Invest* 85, 772–780 (1990)
- [95] Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ: The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 1, 469–474 (2000)
- [96] Smith JA: Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56, 672–686 (1994)
- [97] Squier MK, Sehnert AJ, Cohen JJ: Apoptosis in leukocytes. *J Leukoc Biol* 57, 2–10 (1995)
- [98] Stepczynska A, Lauber K, Engels IH, Janssen O, Kabelitz D, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K: Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene* 20, 1193–1202(2001)

- [99] Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, Browne KA, Trapani JA: Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med* 192, 1403–1414 (2000)
- [100] Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HT, Andrews M, Carroll MC, Savill JS, Henson PM, Botto M, Walport MJ: A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells *in vivo*. *J Exp Med* 192, 359–366 (2000)
- [101] Terashima T, Wiggs B, English D, Hogg JC, van Eeden SF: Polymorphonuclear leukocyte transit times in bone marrow during streptococcal pneumonia. *Am J Physiol* 271 (Lung Cell Mol Physiol 15), L578–L592 (1996)
- [102] Uchimura E, Watanabe N, Niwa O, Muto M, Kobayashi Y: Transient infiltration of neutrophils into the thymus in association with apoptosis induced by whole-body X-irradiation. *J Leukoc Biol* 67, 780–784 (2000)
- [103] Vandivier RW, Fadok VA, Hoffmann PR, Bratton DL, Penvari C, Brown KK, Brain JD, Accurso FJ, Henson PM: Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J Clin Invest* 109, 661–670 (2002)
- [104] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39–51 (1995)
- [105] Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I: Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 350–351 (1997)
- [106] Warmerdam PAM, van de Winkel JGJ, Vlug A, Westerdaal NAC, Capel PJA:

- A single amino acid in the second Ig-like-domain of the human Fc γ receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol* 147, 1338–1343 (1991)
- [107] Weiss SJ: Mechanisms of disease: tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320, 365–376 (1995)
- [108] Whale TA, Beskorwayne TK, Babiuk LA, Griebel PJ: Bovine polymorphonuclear cells passively acquire membrane lipids and integral membrane proteins from apoptotic and necrotic cells. *J Leuk Biol* 79, 1226–1233 (2006)
- [109] Wilson ME: Effects of bacterial endotoxins on neutrophil function. *Rev Infect Dis* 7, 404–418 (1985)
- [110] Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L: Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80, 617–653 (2000)
- [111] Wolf A, Schmitz C, Böttger A: Changing story of the receptor for phosphatidylserine-dependent clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep* 8, 465–469 (2007)
- [112] Wurzinger LJ, Zanner R: Blut. In: Junqueira LCU, Carneiro J, Grazl M (Hrsg): *Histologie*. 6. Aufl., 187–206, Springer, Heidelberg, 2004
- [113] Wurzinger LJ, Peschl C: Blutbildung. In: Junqueira LCU, Carneiro J, Grazl M (Hrsg): *Histologie*. 6. Aufl., 207–220, Springer, Heidelberg, 2004
- [114] Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555–556 (1980)
- [115] Zurier RB: Prostaglandin release from human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 2, 815–818 (1976)

Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Originalarbeit:

Esmann L, Idel C, Sarkar A, Hellberg L, Behnen M, Möller S, van Zandbergen G, Klinger M, Köhl J, Bussmeyer U, Solbach W, Laskay T: Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: diminished proinflammatory neutrophil functions in the presence of apoptotic cells. *J Immunol* 184, 391–400 (2010)

Kongressbeitrag (Poster):

Esmann L, van Zandbergen G, Solbach W, Laskay T: Neutrophil Granulocytes phagocytose apoptotic cells. Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies of Immunology, Maastricht, Niederlande (2004)

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck unter der Leitung von Prof. Dr. Werner Solbach. Ich danke ihm für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der sehr guten Arbeitsbedingungen, seiner Unterstützung und seinem Interesse an meiner Arbeit. Prof. Dr. Tamás Laskay danke ich für die hervorragende Betreuung und Unterstützung, für seine Begeisterung für meine Arbeit, für konstruktive Kritik und besonders für seine geduldige Motivation. Dr. Ger van Zandbergen danke ich für viele wichtige methodische und fachliche Hilfestellungen und Tips. Für eine angenehme Zusammenarbeit im Labor und für freundschaftliche Hilfsbereitschaft bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Angeborene Immunität“, besonders bei Eresso Aga, Annalena Bollinger, Uta Bußmeyer, Sonja Dannenberg, Hannah Fsadni, Meike Gabert, Birgit Hansen, Christian Idel, Beate Lembrich, Sonja Lotz, Elisabeth Maniak und Inga Wilde. Ich danke PD Dr. Matthias Klinger für die elektronenmikroskopische Aufnahme, die die Idee zu dieser Arbeit gab. Den Mitarbeitern des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin danke ich für die Bereitstellung von *Buffy coats* und die Messung der Komplementaktivität der Seren. Dr. Antje Müller und den weiteren Mitarbeitern des Forschungslabors der Poliklinik für Rheumatologie danke ich für die jederzeit gewährte Nutzung ihres Stratalinker®. Diese Arbeit wurde gefördert durch das Promotionsstipendium „Experimentelle Medizin“ der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck. Dafür bedanke ich mich sehr herzlich. Schließlich danke ich meinen Eltern für ihr Verständnis und ihre zuverlässige Hilfe und Unterstützung und für die Ermöglichung meines Studiums.

Lebenslauf

Lars Esmann

Geboren am 07. 11. 1978 in Nordhorn

Schulbildung

08/1985 – 07/1989	Grundschule Uelsen
08/1989 – 07/1991	Orientierungsstufe Uelsen
08/1991 – 06/1998	Gymnasium Neuenhaus

Zivildienst

07/1998 – 07/1999	Altenpflegeheim „Haus Hilten“, Neuenhaus
-------------------	--

Studium

10/1999 – 03/2005	Medizin an der Universität zu Lübeck
04/2005 – 05/2006	Medizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg Praktisches Jahr am Klinikum Konstanz
05/2006	Ärztliche Prüfung

Doktorarbeit

09/2002 – 10/2004	Experimentelle Durchführung am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. W. Solbach). Gefördert durch das Promotionsstipendium „Experimentelle Medizin“ der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck.
-------------------	--

Ärztliche Tätigkeit

Seit 01/2007	Assistenzarzt, Amalie-Sieveling-Krankenhaus Hamburg, Abteilung für Innere Medizin (Chefärztin: Prof. Dr. I. Koop).
--------------	---